

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**MESTRADO ACADÊMICO**

**ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE LIPÍDICA EM MACRÓFAGOS  
ESTIMULADOS POR LIPÍDIOS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

**IGOR MÜLLER DA SILVA SANTOS**

**Salvador - BA**

**2021**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa**

**ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE LIPÍDICA EM MACRÓFAGOS  
ESTIMULADOS POR LIPÍDIOS DO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

**IGOR MÜLLER DA SILVA SANTOS**

Dissertação apresentada à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa como requisito do curso de Mestrado Acadêmico.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz

**Salvador - BA**

**2021**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ – Bahia - Salvador

**S237a** Santos, Igor Müller da Silva

Alterações na homeostase lipídica em macrófagos estimulados por lipídios do *Mycobacterium tuberculosis*/ Igor Müller da Silva Santos. \_ Salvador, 2021.

56f.: il.: 30 cm

Orientador: Prof. Dr. Adriano Queiroz

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

1. Tuberculose. 2. Lipídios. 3. Operon *mce1*. 4. *Corpos lipídicos*. 5. Eicosanoides. I. Título.

CDU 616-002.5

“ALTERAÇÕES NA HOMEOSTASE LIPÍDICA EM MACRÓFAGOS ESTIMULADOS POR LIPÍDIOS DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS”.

**IGOR MÜLLER DA SILVA SANTOS**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 10 de fevereiro de 2021.

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Ricardo David Couto  
Professor Associado IV  
UFBA



---

Dra. Valeria de Matos Borges  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dra. Theolis Costa Barbosa Bessa  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 E da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) por meio do programa PPSUS

## AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho resulta de um conjunto de colaboradores que de alguma forma contribuíram para que os objetivos fossem alcançados. Alguns sequer tinham consciência do impacto de suas ações, portanto, dedicarei este espaço para destacar e eternizar suas colaborações em forma de agradecimento.

Ao eterno Deus, por ter me concedido forças, sabedoria, resiliência e coragem sempre que necessário, por ser meu refúgio em tempos turbulentos, e por ser suficientemente bom para comigo.

Aos meus pais, que mesmo sem compreender, por muitas vezes, as entrelinhas da vida acadêmica, sempre confiaram em mim, me incentivaram a continuar, e me deram o suporte que precisei.

Aos meus irmãos, amigos e familiares por preencherem as lacunas da academia com momentos memoráveis, felizes e descontraídos.

À minha querida Elen Nataly, por compreender minhas ausências, por todas as palavras de incentivo e por tornar essa caminhada mais leve;

À Neila Botelho, por todo o suporte, amizade e altruísmo que dificilmente caberiam em uma simples frase.

À família LASP, especialmente à Júlia Bitencourt, Luana Araújo, Jéssica Petrilli, Filipe Lima, Alice Sarno, Carlos Oliveira, Paulo Estevão, Elian Dantas e Alessandra Gonzalez, por todos os dias em que estenderam o expediente para me auxiliar nos experimentos, para dialogar sobre os percalços da vida acadêmica ou simplesmente para ouvirem minhas ideias embrionárias. Muitos conceitos se tornaram mais claros e sólidos após nossas discussões em grupo e sou muito grato por tê-los como parte crucial nessa trajetória.

Ao meu orientador Dr. Adriano Queiroz, por confiar em mim para realizar esse trabalho, por todo o tempo e esforço que dedicou em minha formação científica nos últimos cinco anos e por toda a paciência que o processo de orientação exige. Reconheço que a trajetória acadêmica não é para iniciados, mas um processo de permanente iniciação, e sou imensamente grato por estimular o pensamento crítico desde o início, por me inspirar e por me conceder as ferramentas necessárias para a trajetória bem-sucedida de um permanente aprendiz.

Ao Dr. Sérgio Arruda pelo suporte, pelas discussões produtivas e por ser um grande incentivador.

À equipe do LIE, na Fiocruz Pernambuco, por todo o auxílio no processo de extração de lipídios, especialmente, à Dr.<sup>a</sup> Lílian Montenegro por aceitar me receber em seu laboratório e pelo suporte que me proporcionou durante todo o período.

Ao José Luiz e demais componentes da equipe do NB3 da Fiocruz Pernambuco, por toda a prestatividade durante a realização dos meus experimentos no IAM.

À equipe do LAPEC pelo auxílio na realização de alguns experimentos.

À equipe das plataformas do IGM, por todo o apoio que me deu durante as análises;

Às secretárias do laboratório por todo o empenho na compra de materiais e no suporte aos estudantes, em especial à querida Rita de Cássia, por todo o carinho, incentivo e parceria para com os estudantes durante essa caminhada.

E a todos os outros que fizeram parte dessa rede de colaboradores e estão representados pelos nomes aqui mencionados. A vocês, meu carinho, admiração e gratidão!

Learning never ends

*(Autor desconhecido)*

SANTOS, Igor Müller da Silva. Alterações na homeostase lipídica em macrófagos estimulados por lipídios do *Mycobacterium tuberculosis*. 56 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causador da Tuberculose (TB), é capaz de modular metabolicamente o macrófago, induzir a formação de corpos lipídicos e persistir em uma infecção latente. Alterações no conteúdo de lipídios na parede celular do Mtb, desencadeadas pela repressão do operon *mce1*, são responsáveis por modular a resposta inflamatória em macrófagos murinos e em células T humanas. Entretanto, o papel desses lipídios na regulação do metabolismo de lipídios em macrófagos ainda é pouco compreendido. **OBJETIVO:** Esse trabalho tem como objetivo avaliar alterações no metabolismo de lipídios em macrófagos cultivados com extratos lipídicos das cepas de Mtb selvagem (WT) e mutante no operon *mce1* ( $\Delta mce1$ ). **MATERIAL E MÉTODOS:** Para isso, estimulamos macrófagos RAW 264.7 com os extratos lipídicos das cepas WT e  $\Delta mce1$ , avaliamos a formação de corpos lipídicos e os níveis de expressão de genes envolvidos no metabolismo e armazenamento de lipídios. Além disso, quantificamos os transcritos de genes responsáveis por codificar citocinas pró-inflamatórias e pela síntese de eicosanoides. Finalmente, a produção de Prostaglandina E2 (PGE2) e Leucotrieno B4 (LTB4) em sobrenadante desses macrófagos estimulados foi determinada. **RESULTADOS:** Ambos os extratos induziram de forma semelhante a formação de corpos lipídicos mas demonstraram capacidades distintas de estimular a expressão de genes envolvidos na síntese de lipídios no macrófago. Em relação ao controle não estimulado, enquanto os lipídios de WT regularam negativamente 2,1 e 2,5 vezes a expressão dos genes *Dgat1* e *Dgat2*, envolvidos na síntese de triacilglicerol, lipídios da cepa  $\Delta mce1$  aumentaram 3,5 vezes a expressão do gene *Dhcr7*, envolvido na síntese de colesterol. Além disso, os extratos demonstraram capacidades distintas de estimular a produção de mediadores lipídicos. Enquanto os lipídios da cepa WT induziram aumento de 26 vezes na produção de PGE2, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  reprimiram esse processo ( $p < 0,01$ ). Os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  também foram capazes de inibir ativamente a expressão de *Cox-2*, *Il-1 $\beta$*  e *Tnf- $\alpha$*  mesmo na presença de lipídios da cepa selvagem. **CONCLUSÃO:** Nossos resultados indicam que os lipídios de Mtb são capazes de estimular ou reprimir o metabolismo lipídico do macrófago, especialmente a produção de mediadores lipídicos e, portanto, regular a resposta inflamatória do hospedeiro.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Lipídios. Operon *mce1*. Corpos lipídicos. Eicosanoides.

SANTOS, Igor Müller da Silva. Macrophage lipid homeostasis alterations stimulated by *Mycobacterium tuberculosis* lipids 56 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), the causative agent of Tuberculosis (TB), can modulate metabolically the macrophage, to induce lipid body formation and to persist in a latent infection. Changes in the Mtb cell wall lipid content, triggered by operon *mce1* repression are responsible for modulating the inflammatory response in murine macrophages and human T cells. However, the role of these lipids in regulating lipid metabolism in macrophages is still poorly understood. **AIM:** This work aims to evaluate changes in lipid metabolism in macrophages cultivated with lipid extracts from wild Mtb (WT) and mutant strains in the *mce1* operon ( $\Delta mce1$ ). **MATERIAL AND METHODS:** We stimulate RAW 264.7 macrophages with the lipid extracts of the WT and  $\Delta mce1$  strains, and evaluate the lipid body formation and the gene expression levels of targets involved in lipid metabolism and storage. Besides, we quantified the transcripts of genes responsible for encoding pro-inflammatory cytokines and eicosanoids synthesis. Finally, the production of Prostaglandin E2 (PGE2) and Leukotriene B4 (LTB4) in the supernatant of these stimulated macrophages was determined. **RESULTS:** Both extracts similarly induced the lipid body formation but demonstrated different capacities to stimulate the expression of genes involved in lipid synthesis in macrophages. Regarding to unstimulated controls, while the lipids of WT strain down regulated 2.1 and 2.5 times the expression of *Dgat1* and *Dgat2* genes, involved in triacylglycerol synthesis,  $\Delta mce1$  strain lipids increased 3.5 times the *Dhcr7* gene expression, involved in cholesterol synthesis. Besides that, the extracts demonstrated different capacities to stimulate the lipid mediators production. While the lipids of the WT strain induced a 26-fold increase in the production of PGE2, the lipids of the  $\Delta mce1$  strain repressed this process ( $p < 0.01$ ). The lipids of the  $\Delta mce1$  strain were also able to actively inhibit the expression of *Cox-2*, *Il-1 $\beta$*  and *Tnf- $\alpha$*  even in the presence of lipids from the wild strain. **CONCLUSION:** Our results indicate that Mtb lipids are able to stimulate or repress the lipid metabolism in macrophages, especially the lipid mediators production, therefore regulating the host inflammatory response.

**Keywords:** Tuberculosis. Lipids. *Mce1* operon. Lipid bodies, Eicosanoids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b>	Incidência estimada de TB no mundo em 2019	19
<b>Figura 2</b>	Infecção por Mtb	21
<b>Figura 3</b>	Biogênese de corpos lipídicos no retículo endoplasmático	24
<b>Figura 4</b>	Vias reguladas pelo Mtb para a formação de corpos lipídicos no hospedeiro	26
<b>Figura 5</b>	Vias de síntese de eicosanoides ocorrendo dentro de corpos lipídicos	28
<b>Figura 6</b>	Parede celular do Mtb rica em lipídios	30
<b>Figura 7</b>	Representação esquemática do locus <i>mce</i> de Mtb H37Rv	31
<b>Figura 8</b>	Formação de corpos lipídicos em macrófagos estimulados com lipídios da parede celular do Mtb	39
<b>Figura 9</b>	Regulação no metabolismo e/ou armazenamento de colesterol/triacilglicerol e ácidos graxos em macrófagos estimulados por lipídios da parede celular do Mtb	41
<b>Figura 10</b>	Regulação da síntese de mediadores lipídicos em macrófagos induzidos por lipídios da parede celular do Mtb	43
<b>Figura 11</b>	Controle da resposta inflamatória em macrófagos estimulados pelos lipídios da parede celular do Mtb	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Desenho de primers para RT-qPCR.....	37
-----------------	--------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>15-Lo</i>	<i>15-lipoxigenase</i>
<i>5-Lo</i>	<i>5-lipoxigenase</i>
<i>Acat1</i>	<i>Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1</i>
<i>Acat2</i>	<i>Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2</i>
AM	Ácidos micólicos
<i>Cd36</i>	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CL	Corpos lipídicos
<i>Cox-2</i>	<i>Cicloxygenase 2</i>
DAT	Diaciltrealose
<i>Dgat1</i>	<i>Diacylglycerol O-Acyltransferase 1</i>
<i>Dgat2</i>	<i>Diacylglycerol O-Acyltransferase 2</i>
<i>Dhcr7</i>	<i>7-Dehydrocholesterol Reductase</i>
<i>Gapdh</i>	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
IL-12	Interleucina 12
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	<i>Interleucina 1<math>\beta</math></i>
<i>Il-6</i>	<i>Interleucina 6</i>
LAM	Lipoarabinomanana
LTB4	Leucotrieno B4
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
ME	Macrófagos espumosos
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAT	Poliaciltrealose

PDIM	Ptiocerol dimicocerato
PGE2	Prostaglandina E2
PPAR- $\gamma$	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
SL-1	Sulfolipídio-1
TB	Tuberculose
TDM	Trealose dimicolato
<i>Tip47</i>	<i>Tail-interacting protein of 47 kDa</i>
TLR2	Receptor tipo toll 2
TMM	Trealose monomicolato
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	<i>Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math></i>
TR4	<i>Testicular receptor 4</i>
WT	Cepa selvagem de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
$\Delta$ mce1	Cepa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> mutante no operon mce1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 EPIDEMIOLOGIA .....	19
2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE .....	20
2.3 MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E A TUBERCULOSE .....	22
2.4 HOMEOSTASE LIPÍDICA E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS .....	23
2.5 EICOSANÓIDES .....	26
2.6 PAREDE CELULAR DO <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i> .....	28
2.7 REGULAÇÃO DO COMPLEXO MCE E SUA RELEVÂNCIA CLÍNICA.....	30
2.7.1 Regulação da parede lipídica do Mtb .....	32
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	33
3.1 GERAL .....	33
3.2 ESPECÍFICOS:.....	33
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	34
4.1 OBTENÇÃO E PLAQUEAMENTO DOS LIPÍDIOS DO MTB: .....	34
4.2 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS RAW 264.7: .....	34
4.3 IDENTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS .....	35
4.4 ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA: .....	35
4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR EM TEMPO REAL:.....	35
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PGE2 E LTB4 .....	35
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	36
<b>5 RESULTADOS</b> .....	38
5.1 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB INDUZEM A FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS.....	38

5.2 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB INTERFEREM NO METABOLISMO E/OU ARMAZENAMENTO DE COLESTEROL, TRIACILGLICEROL E ÁCIDOS GRAXOS PELOS MACRÓFAGOS .....	39
5.3 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB REGULAM A SÍNTESE DE MEDIADORES LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS.....	42
5.4 O EXTRATO LIPÍDICO DA CEPA $\Delta$ MCE1 CONTROLA NEGATIVAMENTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MACRÓFAGOS MURINOS, EM PARTE VIA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PPAR- $\gamma$ .....	43
6 <b>DISCUSSÃO</b> .....	46
7 <b>CONCLUSÃO</b> .....	50

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A tuberculose (TB) ainda permanece como um grave problema de saúde pública de alcance mundial (WHO, 2020). A infecção latente, especialmente, tem contribuído em grande parte para a manutenção desses índices. Cerca de 1,7 bilhão de pessoas no mundo têm a infecção latente e destes, estima-se que 5-15% desenvolverão TB em algum momento da vida, tornando-se capazes de infectar novos indivíduos (WHO, 2020).

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), agente causador da TB, possui a capacidade de alterar metabolicamente e residir em fagócitos especializados em erradicar a maioria das bactérias, fazendo do homem ao mesmo tempo hospedeiro e reservatório natural da infecção (EHRT; SCHNAPPINGER; RHEE, 2018). O sucesso do Mtb em persistir demonstra uma notável e bem adaptada relação com o hospedeiro a longo prazo e sua capacidade de tornar o macrófago um nicho adequado para a sobrevivência (GAGO; DIACOVICH; GRAMAJO, 2018).

Macrófagos infectados por Mtb adquirem um fenótipo espumoso e são comumente encontrados margeando o centro necrótico de granulomas de indivíduos com TB (PEYRON et al., 2008). Essa população de macrófagos resulta de uma desregulação no influxo e efluxo de lipídios e caracteriza-se pelo alto conteúdo de corpos lipídicos (CL) em seu citoplasma (RUSSELL et al., 2009; WELTE, 2015). Além de seu papel na homeostasia lipídica e energética da célula, os corpos lipídicos são descritos como reguladores críticos de processos infecciosos e inflamatórios devido sua atividade na síntese de eicosanoides (BOZZA et al., 2011; OLZMANN; CARVALHO, 2019).

Alguns lipídios da parede bacteriana têm sido descritos como importantes na formação de CL em infecção micobacteriana (PEYRON et al., 2008; RAJARAM et al., 2010). Mutação que confere ao *Mycobacterium Smegmatis* a capacidade de produzir ácidos micólicos também confere a capacidade de induzir a formação de macrófagos espumosos (ME) em modelo de infecção *in vitro* (PEYRON et al., 2008).

Os genes do operon *mce1* desenvolvem papel importante no transporte de lipídios através da parede celular do Mtb (DUNPHY et al., 2010). Interrupção no operon *mce1* do Mtb promove alterações em mais de 400 espécies lipídicas e o acúmulo de ácidos micólicos livres (AML) na superfície da cepa mutante em relação a cepa Erdman selvagem (CANTRELL et al., 2013; QUEIROZ et al., 2015). O controle de expressão do operon *mce1* pode ser naturalmente observado na cepa selvagem durante a infecção em macrófagos e camundongos (CASALI; WHITE; RILEY, 2006; UCHIDA et al., 2007), o que torna a cepa selvagem de Mtb

fenotipicamente similar à cepa mutante no operon *mce1* ( $\Delta mce1$ ), especialmente em estágios tardios da infecção. Análises recentes do nosso grupo mostraram que alterações lipídicas na parede da cepa  $\Delta mce1$  causam uma modulação da resposta pró-inflamatória em macrófagos murinos e em células T humanas (PETRILLI et al., 2020). Em conjunto, esses dados mostram um elaborado mecanismo de controle da função macrofágica pelos lipídios do Mtb e dependente do operon *mce1*.

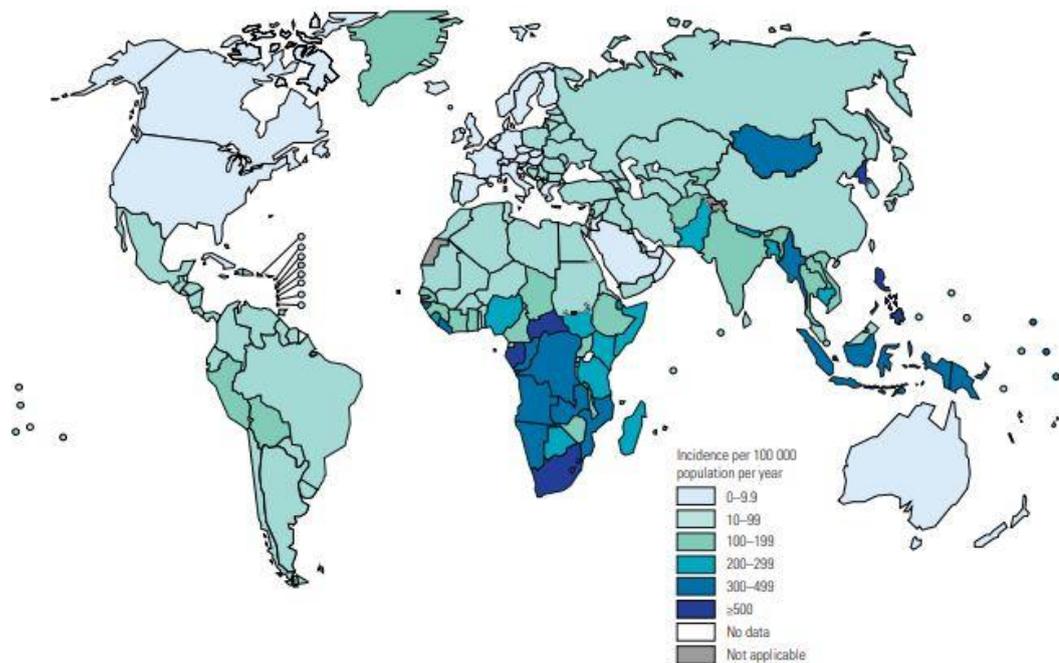
Apesar dos avanços na compreensão da capacidade do Mtb em explorar circuitos reguladores metabólicos do hospedeiro e induzir a formação de corpos lipídicos (PEYRON et al., 2008; SINGH et al., 2012), o papel do extrato lipídico da parede celular do Mtb e das alterações lipídicas desencadeadas pela interrupção do operon *mce1* na homeostase lipídica do hospedeiro ainda não foi explorado.

A hipótese que conduz este trabalho é que os lipídios da parede celular do Mtb são capazes de interferir na homeostase lipídica de macrófagos, levando à formação de macrófagos espumosos e determinado a atividade pró-inflamatória nessas células. A compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação da homeostase lipídica do hospedeiro durante a infecção por Mtb pode ser útil no desenvolvimento de estratégias farmacológicas baseadas nas necessidades metabólicas de persistência do bacilo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA

A TB é uma doença infecto contagiosa de caráter crônico moderado a grave. Causada por *Mtb*, encontra-se entre as dez principais causas de morte no mundo (WHO, 2020). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), somente no ano de 2019, 10 milhões de pessoas desenvolveram TB e está causou cerca de 1,4 milhão de mortes entre indivíduos HIV-negativos (WHO, 2020). A OMS também classificou 30 países como altamente incidentes para TB, responsáveis por 87% dos casos no mundo. Enquanto territórios de alta renda apresentam taxa de 10 novos casos por 100.000 habitantes, a maioria destes países notifica 150-400 novos casos de TB por 100.000 habitantes (**Figura1**).



**Figura 1** - Incidência estimada de Tuberculose no mundo em 2019  
**Fonte:** (WHO, 2020)

O Brasil encontra-se listado entre os 30 países com alta incidência de TB. Foi registrado um aumento na incidência entre os anos de 2017-2018 em comparação com os anos 2016-2017 (BRASIL, 2019) e só no ano de 2019, a TB foi responsável por mais de 73.000 novos casos e 4.000 óbito (BRASIL, 2020). Apesar dos programas de controle da TB, da disponibilidade de testes diagnósticos e dos tratamentos eficazes contra o bacilo, a TB permanece como um grave problema de saúde pública de alcance mundial (WHO, 2018).

A infecção latente tem sido descrita como um fator crucial para o sucesso da doença. Segundo Kaufmann (2012), a maioria dos casos de TB não são provenientes de uma infecção recente, mas de uma reativação de Mtb dormente em indivíduos latentemente infectados, o que os configura como potenciais reservatórios de infecção. Portanto, é crucial para a sobrevivência do Mtb, adaptar-se e persistir por um longo período no hospedeiro (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

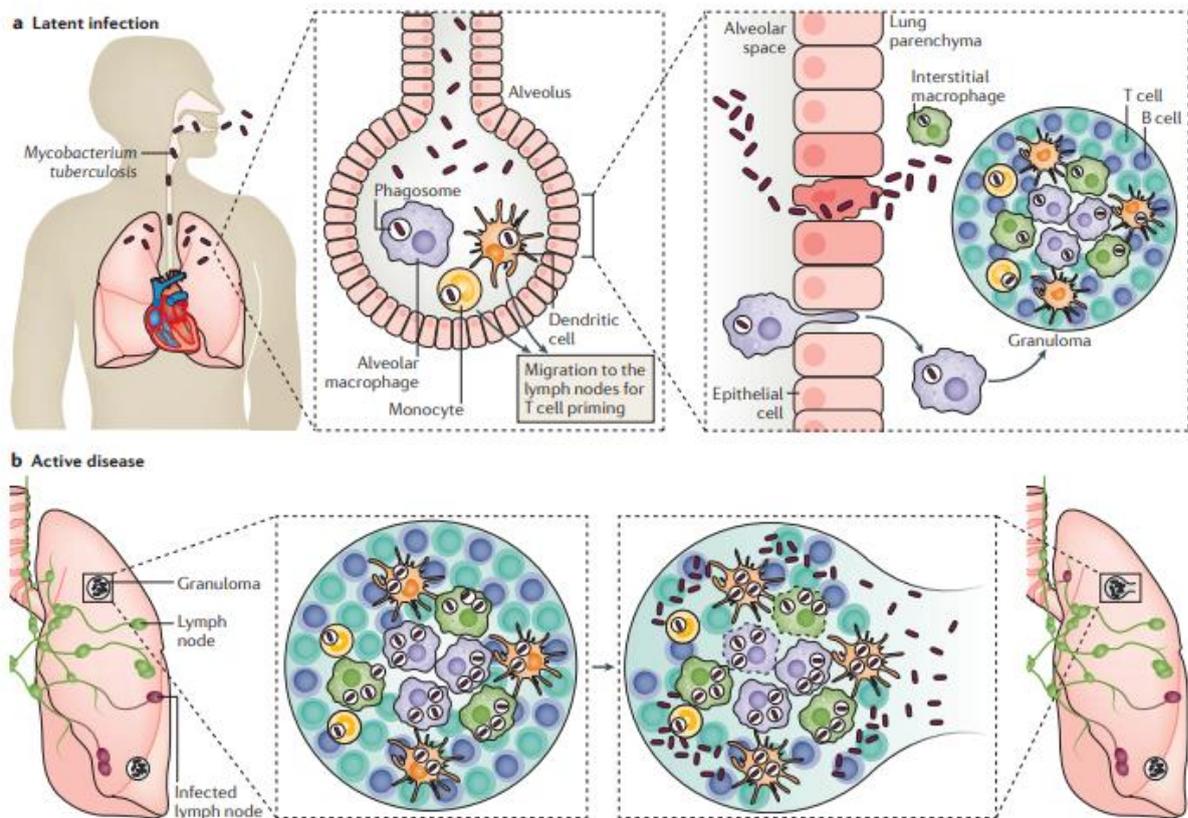
Os altos índices de infecção latente por Mtb ao redor do mundo refletem a alta capacidade do bacilo de interferir na resposta imune do hospedeiro, evadir dos mecanismos de destruição de patógenos, adaptar-se a um microambiente estressante e criar um nicho permissivo à sua persistência e replicação (GAGO; DIACOVICH; GRAMAJO, 2018).

## 2.2 IMUNOPATOGÊNESE DA TUBERCULOSE

O ciclo da doença inicia por vias aéreas, quando o indivíduo com TB pulmonar transmite o bacilo para indivíduos saudáveis, por meio de partículas infecciosas liberadas durante a fala, tosse ou espirro (CHURCHYARD et al., 2017; RILEY et al., 1995). Após atingir o trato respiratório do hospedeiro, o Mtb alcança o espaço alveolar e encontra os macrófagos alveolares residentes (**Figura 2**), a primeira linha de defesa e principal tipo celular infectado por Mtb (PAI et al., 2016).

A infecção pode levar, em análise ampla, a dois desfechos: a eliminação completa do bacilo com envolvimento ou não da resposta imune adaptativa; ou a persistência bacteriana, que por sua vez, se dá pelo desenvolvimento direto da doença ativa ou do estabelecimento de uma infecção latente; estado no qual o bacilo permanece dormente, e apesar de não se reproduzir, é capaz de sobreviver ao microambiente hostil imposto pelo hospedeiro (PAI et al., 2016).

A interação patógeno-hospedeiro no caso da infecção por Mtb é complexa e apesar dos avanços, ainda não há clareza quanto à fase inicial de infecção (PAI et al., 2016). No entanto, é comumente aceito que os macrófagos, apesar de especializados em conter infecções bacterianas, são, em grande parte dos casos, incapazes de conter a infecção por Mtb, tornando-se o principal nicho para crescimento e persistência do bacilo (RAJARAM, M. V. S. et al., 2014). Esse processo envolve diferentes mecanismos bacterianos de escape que subvertem a resposta imune do hospedeiro e permitem o estabelecimento da infecção (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012; RUSSELL, 2001).



**Figura 2 -** Infecção por Mtb.  
**Fonte:** (PAI, 2016)

a) Após atingir as vias respiratórias do indivíduo, o Mtb infecta monócitos, células dendríticas e principalmente macrófagos alveolares residentes. Os monócitos ou células dendríticas infectados migram para o linfonodo mais próximo, onde apresentam os antígenos processados para os linfócitos T. O Mtb invade o parênquima pulmonar por meio da migração de macrófagos alveolares infectados ou da infecção direta do epitélio alveolar, onde iniciará a formação do granuloma e persistirá em estado dormente. b) Na doença ativa, o bacilo continua replicando, as células imunes do indivíduo não conseguem conter a infecção e o granuloma evolui para um estado caseoso, até que ocorre o seu rompimento com a liberação do bacilo.

Dentro dos macrófagos, o Mtb é capaz de modular a atividade do fagossomo, retardando sua maturação (AXELROD et al., 2008), inibindo a fusão com lisossomos hidroliticamente ativos (VERGNE et al., 2005) e permeabilizando a membrana dessa organela (LERNER et al., 2018). Esses mecanismos são mediados por lipídios da parede celular bacteriana e facilitam a translocação do bacilo para o citosol, impedindo sua destruição por exposição a componentes ácidos dos lisossomos e permitindo sua replicação (AXELROD et al., 2008; LERNER et al., 2018; VERGNE et al., 2005).

A rápida replicação bacteriana induz uma resposta pro-inflamatória robusta e localizada (BOLD; ERNST, 2009), o recrutamento de células do sistema imune, tais como macrófagos, células dendríticas e linfócitos, para um foco inflamatório, e resulta na formação do granuloma, uma resposta coordenada do hospedeiro característica da infecção por Mtb (RUSSELL, 2007; WALZL et al., 2011).

### 2.3 MACRÓFAGOS ESPUMOSOS E A TUBERCULOSE

Dentro do granuloma, no centro da interação patógeno-hospedeiro, os macrófagos infectados por Mtb são metabolicamente reprogramados e acumulam CL em seu citoplasma, diferenciando-se em ME (RAMAKRISHNAN, 2012; SINGH et al., 2012). Os ME são frequentemente encontrados no centro da lesão necrótica em granulomas humanos (PEYRON et al., 2008) e comumente observados em outras condições inflamatórias crônicas tais como aterosclerose (MOORE; SHEEDY; FISHER, 2013).

O microambiente da infecção por Mtb também é capaz de promover a formação de ME. Macrófagos não infectados tratados com líquido pleural de pacientes com TB apresentam aumentada quantificação de CL e colesterol intracelular, além de elevada expressão de *Cluster of Differentiation 36 (Cd36)*, gene que codifica um receptor envolvido na importação de ácidos graxos para o ambiente intracelular (GENOULA et al., 2018).

A função desses macrófagos nos granulomas ainda não é bem compreendida e não há um consenso em relação ao papel desempenhado pelos ME na infecção por Mtb. Um estudo recente sugere que o processo de formação de CL não é induzido pelo bacilo, mas mediado pelo hospedeiro como um mecanismo de defesa resultante da ativação de macrófagos pelo Interferon- $\gamma$  (KNIGHT et al., 2018).

Em contrapartida, uma análise em granulomas de indivíduos com TB sugeriu que estas células constituem um reservatório rico em nutrientes usados pelo bacilo durante a infecção. O estudo apresentou evidências de que os ME possuem capacidade microbicida reduzida e abrigam bacilos que superexpressam genes envolvidos na fase de dormência (PEYRON et al., 2008).

Uma outra análise mostrou que a proteína ESAT-6, um fator de virulência do Mtb, é capaz de induzir a formação de ME ao estimular a captação de glicose pela célula hospedeira. Esses macrófagos também apresentaram atenuação da capacidade microbicida, além de inibição da autofagia e da acidificação de lisossomos (SINGH et al., 2012).

De forma similar, infecções por *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium avium* também levam à formação desses macrófagos, sugerindo uma associação entre essas células e a sobrevivência micobacteriana (D'AVILA et al., 2006; MATTOS et al., 2014; MÜLLER; KRÜGER, 1994). Apesar das divergências, é amplamente aceito que os ME são essenciais à persistência bacteriana e à progressão do granuloma (RUSSELL et al., 2009).

De fato, macrófagos alveolares infectados por Mtb, apresentam superexpressão de vias relacionadas ao metabolismo de colesterol e triacilglicerol e são permissivos à persistência do bacilo, tornando-se o principal nicho para replicação do Mtb (PISU et al., 2020). Curiosamente, os lipídios triacilglicerol, colesterol e éster de colesterol são encontrados aumentados na região caseosa do granuloma de animais e indivíduos com TB, em relação à região não envolvida do parênquima pulmonar (GUERRINI et al., 2018; KIM et al., 2010).

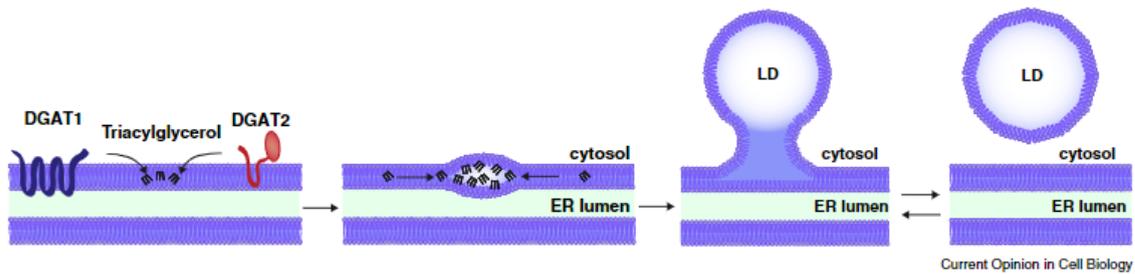
Além disso, genes envolvidos na síntese, catabolismo e captação de lipídios estão altamente expressos em granulomas de indivíduos com TB (KIM et al., 2010) e proteínas associadas com a formação de CL apresentam marcação expressiva em análises imunohistológicas de granulomas caseosos humanos (KIM et al., 2010), indicando incorporação de lipídios e formação de ME na região central do granuloma.

#### 2.4 HOMEOSTASE LIPÍDICA E FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS

Os ME são resultado do depósito aumentado de lipídios em organelas citoplasmáticas chamadas de CL (RUSSELL et al., 2009). Os CL foram considerados por muito tempo como um depósito inerte de gordura, no entanto, são considerados atualmente como organelas dinâmicas, complexas e com um papel central na regulação do metabolismo lipídico e energético (FARESE; WALTHER, 2009; OLZMANN; CARVALHO, 2019).

Eles são formados por um núcleo de lipídios neutros que se origina no centro da bicamada lipídica do retículo endoplasmático e resulta da ação de diferentes enzimas (WELTE, 2015). Os ésteres de colesterol são formados pelas Acetyl-Coenzyme A acetyltransferases 1 e 2 (Acat1 e Acat2) enquanto os triacilglicerois são produtos finais das Diacylglycerol O-Acyltransferases 1 e 2 (Dgat1 e Dgat2) (OLZMANN; CARVALHO, 2019).

Essas enzimas estão ligadas ao retículo endoplasmático, onde elas encontram e metabolizam seu substrato, levando à formação e armazenamento de lipídios neutros entre a bicamada lipídica do retículo (WELTE, 2015) (**Figura 3**).



**Figura 3** - Biogênese de corpos lipídicos no retículo endoplasmático.  
**Fonte:** (WILFLING et al., 2015)

Lipídios neutros são sintetizados por enzimas ligadas ao retículo endoplasmáticos e se acumulam entre as membranas do retículo, formando um núcleo de lipídios neutros. Devido ao aumento da concentração local, a bicamada do retículo se deforma e dá origem ao corpo lipídico.

O acúmulo de CL resulta do balanço dinâmico entre a síntese de lipídios neutros e a degradação desses lipídios por meio da lipólise (POL; GROSS; PARTON, 2014). Um conjunto de proteínas chamadas perilipinas compartilha a habilidade de se ligar na membrana dos corpos lipídicos e têm a função de regular a lipólise ao promover ou impedir o acesso de lipases aos CL (BICKEL; TANSEY; WELTE, 2009).

Entre as perilipinas, a Plin3, também conhecida como *Tail-interacting protein of 47 kDa* (Tip47), tem sido relatada como componente crucial no processo de formação de CL (NOSE et al., 2013). Ela é recrutada para o retículo endoplasmático durante a biogênese de CL e regula a formação dessas organelas (SKINNER et al., 2009).

A biogênese de CL é um processo dinâmico e altamente regulado, envolvendo diferentes vias de sinalização mediadas por diferentes receptores que culmina na compartimentalização de lipídios e proteínas. Esse processo em leucócitos e outras células envolvidas em reações inflamatórias resulta de uma interação entre componentes de ambos, patógeno e hospedeiro (BOZZA et al., 2009).

Membros da família dos receptores tipo Toll (TLR) têm mostrado relevância na biogênese de CL durante a resposta do hospedeiro à infecção. Células estimuladas por LPS perdem a capacidade de formar CL após nocaute para o receptor TLR4 (PACHECO et al., 2002). O mesmo ocorre em células nocaute para o receptor TLR2 quando estimuladas por *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) ou pelo lipídio lipoarabinomannan, ambos indutores da biogênese de corpos lipídicos (D'AVILA et al., 2006).

Interessantemente, apesar da ativação de TLR2 ser conhecida como essencial à formação dessas estruturas, ativação desse receptor com o agonista Pam<sub>3</sub>Cys apenas não foi

suficiente para promover a formação dos CL (ALMEIDA et al., 2009; D'AVILA et al., 2006), indicando que este é um processo sinérgico que requer tanto a estimulação realizada pelo patógeno, quanto a ativação do TLR.

Outro fator importante na biogênese de CL é a ativação de receptores nucleares ativados por lipídios (BOZZA et al., 2009). *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- $\gamma$ ) e *testicular receptor 4* (TR4), membros dessa família de receptores, são conhecidos por seu papel na regulação transcricional do metabolismo lipídico e da resposta inflamatória (ALMEIDA et al., 2012; MAHAJAN et al., 2012), representando a união ideal entre homeostase lipídica e resposta inflamatória (VARGA; NAGY, 2008).

Localizados no envelope nuclear da célula, esses receptores são ativados por metabólitos de ácidos graxos ou lipídios mais complexos e agem como fatores de transcrição, regulando a expressão de genes ligados à importação de ácidos graxos, bem como a biogênese e manutenção de CL (VARGA; NAGY, 2008; XIE et al., 2009).

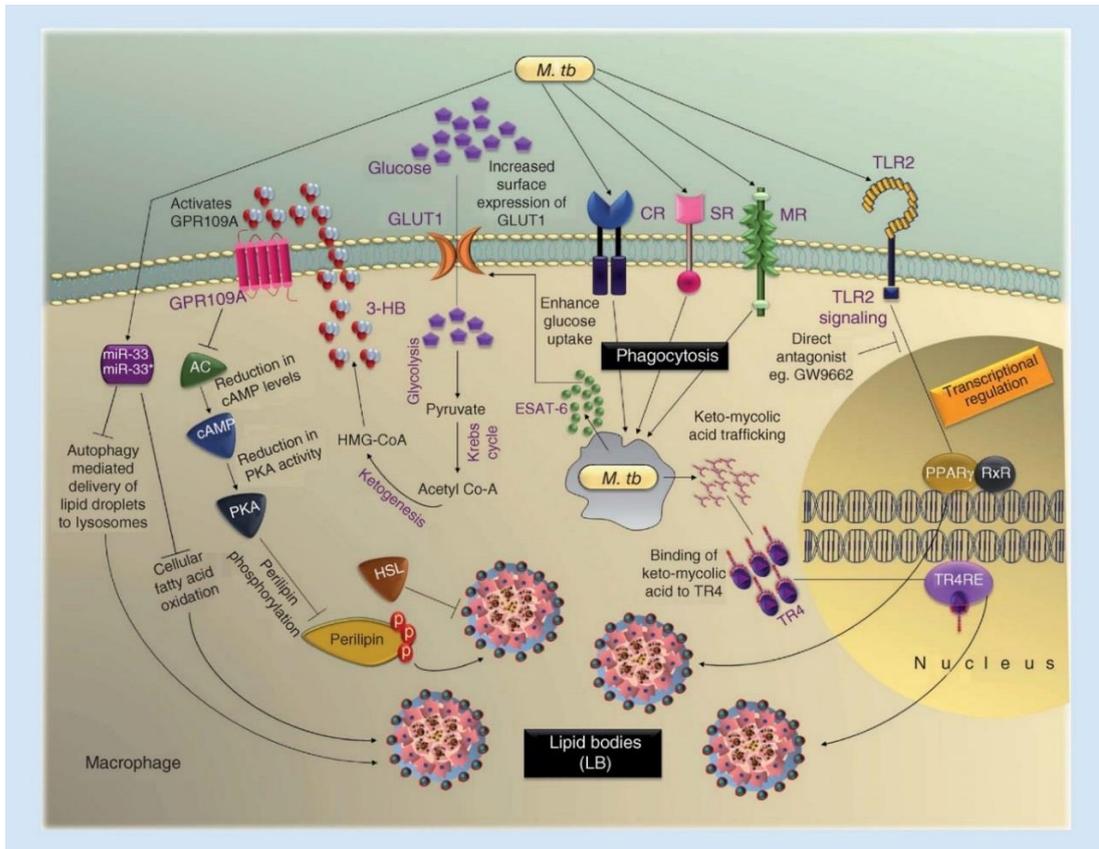
Esses receptores são altamente expressos em células com fenótipo espumoso, e células que falham em ativá-los, seja por tratamento com antagonista ou por nocaute, também apresentam falha na formação de CL (ALMEIDA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2009; XIE et al., 2009).

A relação entre TLR2 e PPAR- $\gamma$  ainda não é bem caracterizada, apesar disso, um estudo propôs que a ativação de TLR2 está envolvida na regulação da expressão de PPAR- $\gamma$  ao demonstrar que a expressão de PPAR- $\gamma$  e a formação de CL durante infecção com *M. bovis* são drasticamente diminuídos em camundongos com interrupção no gene *Tlr2* (ALMEIDA et al., 2009).

O Mtb é capaz de explorar diferentes vias metabólicas do hospedeiro a fim de promover a diferenciação de macrófagos infectados em ME através do acúmulo de lipídios no citoplasma dessas células (**Figura 4**). Por meio da desregulação no efluxo de glicose, o Mtb é capaz de suprimir os níveis de cAMP no macrófago e reduzir a fosforilação de perilipinas, promovendo a proteção dos lipídios armazenados da ação de lipases e favorecendo o acúmulo de CL em macrófagos infectados (SINGH et al., 2012).

O Mtb também é capaz de induzir a expressão de PPAR- $\gamma$  e a ativação heteróloga de PPAR- $\gamma$  e TR4 (MAHAJAN et al., 2012; RAJARAM, M. V. et al., 2010), promovendo sua persistência por meio da modulação do metabolismo lipídico e da função do macrófago (MAHAJAN et al., 2012). Macrófagos nocaute para PPAR- $\gamma$  ou TR4 apresentam expressão diminuída de *Cd36* e reduzida formação de CL em macrófagos estimulados por Mtb (MAHAJAN et al., 2012).

Ácidos micólicos (AM) da parede celular do *Mtb*, além de desempenharem um papel importante na regulação da resposta imune do hospedeiro, interferem diretamente no metabolismo energético da célula, induzindo a formação de CL e promovendo a diferenciação de macrófagos em células espumosas através da interação com TR4 (DKHAR et al., 2014).



**Figura 4** - Vias reguladas pelo *Mtb* para a formação de corpos lipídicos no hospedeiro.  
**Fonte:** (RAMESHWARAM et al, 2018)

A micobactéria é reconhecida pelo receptor TLR2, o que leva à ativação de PPAR- $\gamma$ . Após ativado, o PPAR- $\gamma$  age como regulador transcricional de genes ligados à biogênese de CL. O *Mtb* fagocitado também é capaz de promover a formação de CL ou pela ativação heteróloga de TR4 por meio da ligação de ácidos micólicos, ou pelo aumento da captação de glicose induzido pela proteína ESAT-6 (RAMESHWARAM et al., 2018).

## 2.5 EICOSANÓIDES

Além de proveem substratos para o metabolismo energético e para a síntese de membranas, os CL têm se destacado por seu envolvimento na sinalização celular e na regulação da resposta imune inata (BOZZA et al., 2011; POL; GROSS; PARTON, 2014). Esse

envolvimento os torna reguladores críticos de diferentes doenças inflamatórias e infecciosas e marcadores da ativação de leucócitos (BOZZA et al., 2011).

Compostos por um núcleo de lipídios neutros envoltos em uma monocamada fosfolipídica (WALTHER; FARESE, 2012), os CL representam o principal sítio para estoque de ácido araquidônico em leucócitos. O ácido araquidônico é encontrado esterificado em fosfolipídios da membrana e moléculas de triacilglicerol e pode ser metabolizado em eicosanoides durante o processo inflamatório (PEREIRA-DUTRA et al., 2019).

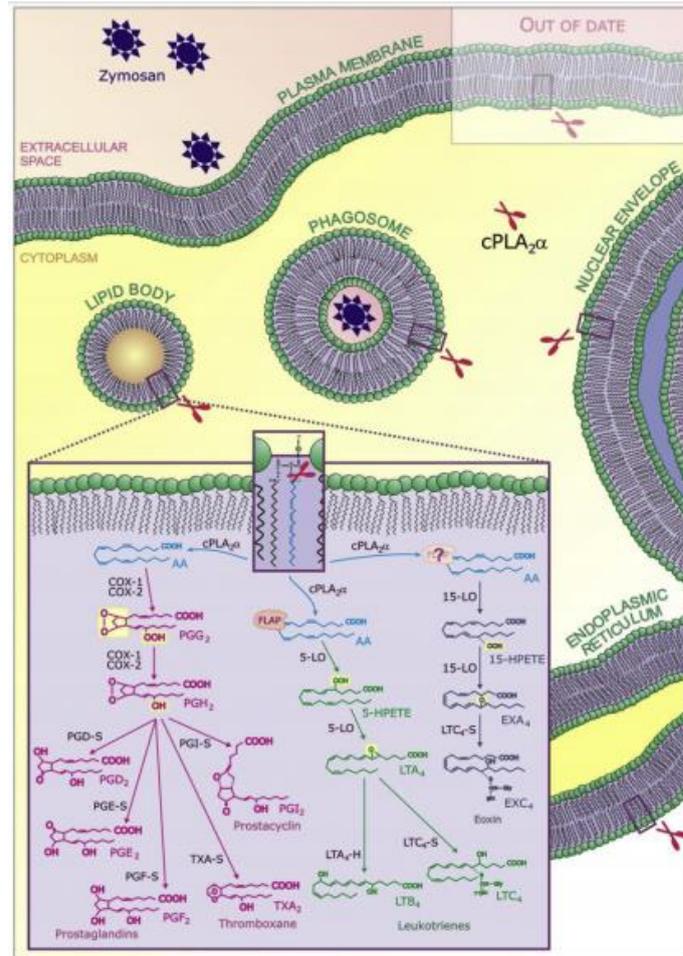
Os eicosanoides, incluindo leucotrienos e prostaglandinas, são potentes sinalizadores produzidos após ativação celular induzida principalmente por trauma mecânico, antígenos bacterianos e citocinas inflamatórias (BOZZA et al., 2011). Eles resultam da oxidação do ácido araquidônico e controlam processos importantes como o metabolismo, migração e ativação celular (BOZZA et al., 2011).

Aumentado número de CL está relacionado a uma elevada capacidade de produção de eicosanoides (BOZZA et al., 2009). Mas além da capacidade de gerar eicosanoides, o tipo de eicosanoide produzido pela célula pode regular o desfecho da infecção (BOZZA et al., 2009).

As principais enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico e produção de eicosanoides são a 5-lipoxigenase (5-LO), 15-lipoxigenase (15-LO) e cicloxigenase 2 (COX-2). Elas são compartimentalizadas em CL e competem pelo ácido araquidônico para a produção dos mediadores (BOZZA et al., 2011) (**Figura 5**).

De acordo com o tipo celular e o estímulo, os CL podem sintetizar diferentes mediadores que resultam na amplificação ou modulação da resposta inflamatória (BOZZA, P. et al., 2009). A atividade da 5-LO resulta na síntese de LTB<sub>4</sub>, um potente indutor do recrutamento e ativação de leucócitos (PALMBLAD et al., 1981), enquanto a COX-2 medeia a produção de PGE<sub>2</sub>, um potente vasodilatador com atividade pro- e anti-inflamatória (HARRIS et al., 2002).

No contexto da infecção por Mtb, a PGE<sub>2</sub> tem sido descrita como um mediador importante para conter a replicação do Mtb durante a infecção (MAYER-BARBER et al., 2014). Em sua análise, Mayer-Barber (2014) estabeleceu que a ação coordenada de PGE<sub>2</sub> e IL-1 $\beta$  regula processos importantes que culminam na contenção da replicação do bacilo durante a infecção e permitem a sobrevivência dos camundongos infectados (MAYER-BARBER et al., 2014).



**Figura 5** - Vias de síntese de eicosanoides ocorrendo dentro de CL  
**Fonte:** (Bozza et al, 2011)

Após a liberação do ácido araquidônico mediada pela fosfolipase A<sub>2</sub>, as enzimas 5-LO, 15-LO e COX2 competem para metabolizá-lo e produzir diferentes mediadores lipídicos envolvidos no processo inflamatório.

## 2.6 PAREDE CELULAR DO MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

A formação de CL é um fenômeno induzido por ambos, bacilo e lipídios de sua parede celular (PEYRON et al., 2008; RAJARAM et al., 2010). Curiosamente, as bactérias não patogênicas são incapazes de induzir a formação dessas estruturas (PEYRON et al., 2008).

Notavelmente, mutações em genes que permitem a síntese de AM, conferiram ao *Mycobacterium Smegmatis* a capacidade de induzir o fenótipo espumoso em macrófagos (PEYRON et al., 2008), sugerindo que componentes da parede bacteriana são cruciais no processo de formação de CL.

O Mtb, diferentemente de outros patógenos, possui uma parede celular rica em lipídios (**Figura 6**), contendo aproximadamente 40% de seu peso seco composto por essas moléculas (GOREN, 1972). Grande parte da capacidade codificada do seu genoma bacteriano é dedicado a vias de biossíntese, degradação e transporte desses lipídios.

Enquanto o genoma de uma *Escherichia coli* apresenta ~50 enzimas distintas dedicadas a vias de biossíntese e degradação de ácidos graxos, o genoma do Mtb apresenta uma quantidade muito maior, ~250 genes com as mesmas funções (COLE et al., 1998). Além disso, em sua base de dados chamada MycoMass, Layre (2011), catalogou mais de 5.000 espécies lipídicas do Mtb. Juntos, esses dados atestam a abundância de lipídios na parede celular do Mtb e sugerem um papel importante dessas moléculas em seu ciclo de vida (LAYRE et al., 2011).

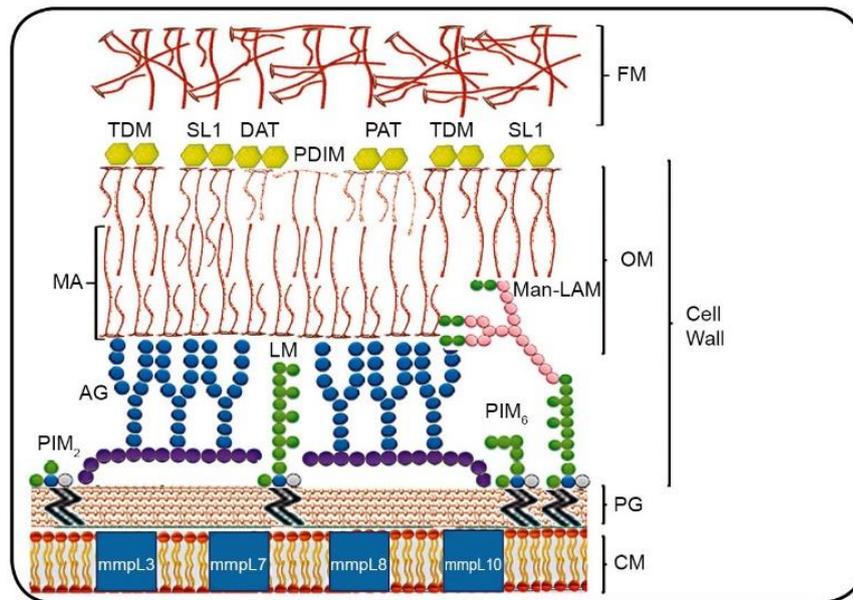
A arquitetura hidrofóbica espessa da parede celular do Mtb confere as características específicas de coloração do bacilo e provê uma robusta barreira de permeabilidade seletiva a muitas moléculas, incluindo agentes terapêuticos (HOFFMANN et al., 2008). Além disso, representa a principal interface de comunicação entre o bacilo e a célula hospedeira.

Diversos trabalhos têm abordado o potencial dessas moléculas não só na patogênese do Mtb – como importantes fatores de virulência – mas na regulação da resposta imune do hospedeiro (BLANC et al., 2017; KARAKOUSIS; BISHAI; DORMAN, 2004; LERNER et al., 2018), caracterizando-as como moléculas bioativas. A função na regulação da resposta imune varia entre as espécies lipídicas, atribuindo características particulares a cada uma delas (QUEIROZ; RILEY, 2017)

Presentes em abundância na parede do Mtb, AM são ácidos graxos de cadeia longa e alto peso molecular ligados covalentemente a arabinogalactana (BARRY et al., 1998; FORRELLAD et al., 2013). Eles dividem-se em três classes: alfa, keto e metoxi-AM. A ausência de keto e metoxi-AM é capaz de atenuar o crescimento do Mtb em modelo murino e pequenas alterações estruturais nessas moléculas podem interferir na resposta inflamatória (QUEIROZ; RILEY, 2017). Em sua análise, Sequeira (2014) mostrou que os AM são responsáveis pela inibição da resposta imune mediada por receptores tipo toll 2 (TLR2) em células epiteliais alveolares e da produção de citocinas inflamatórias em macrófagos. Os AM também podem apresentar-se na forma livre ou esterificados em moléculas de trealose, formando a trealose monomicolato (TMM), ou dimicolato (TDM) (SEQUEIRA; SENARATNE; RILEY, 2014).

Diferentemente dos AM, TDM, o mais estudado glicolípido da parede bacteriana também conhecido como fator corda, tem sido descrito como potente indutor da resposta inflamatória, induzindo altos níveis de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-6 (IL-

6), quimiocinas e óxido nítrico em macrófagos (ISHIKAWA et al., 2009; LIMA et al., 2001). Além disso, tem sido mostrado o papel desses lipídios na indução da angiogênese e recrutamento de células, sugerindo um papel importante na formação do granuloma (LIMA et al., 2001; SAITA et al., 2000).

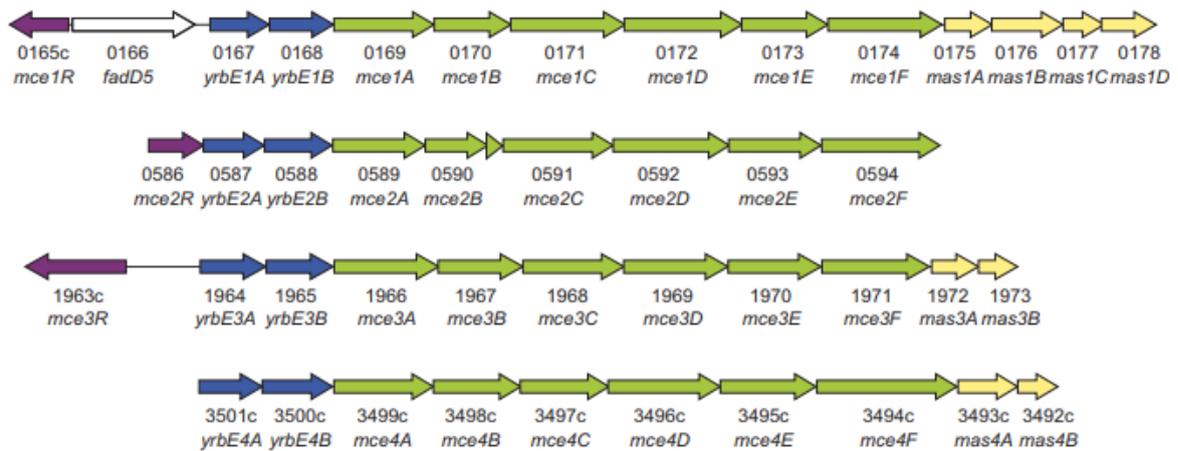


**Figura 6** - Parede celular do *Mycobacterium tuberculosis* rica em lipídios.  
**Fonte:** (QUEIROZ; RILEY, 2017)

Outras espécies lipídicas como o ptiocerol dimicocerato (PAT), Sulfolipídio-1 (SL-1), lipoarabinomanana (LAM) Di- e Poliaciltrealose (DAT e PAT) são reconhecidas por modular a resposta imune do hospedeiro por meio da inibição da formação do fagolisossomo, da ativação de células T, produção de citocinas e da capacidade microbicida do macrófago (QUEIROZ; RILEY, 2017).

## 2.7 REGULAÇÃO DO COMPLEXO MCE E SUA RELEVÂNCIA CLÍNICA

O *Mtb* contém em seu genoma quatro cópias homólogas do operon *mce*, conhecidas como *mce1-4*. Estas codificam proteínas transmembranares com extensões hidrofóbicas que se assemelham a transportadores ABC putativos, possivelmente envolvidos no transporte de lipídios (**Figura 7**) (A. CANTRELL, 2013; COLE et al., 1998).



**Figura 7** - Representação esquemática do locus *mce* de Mtb H37Rv.

**Fonte:** (CASALI; RILEY, 2007)

Com o objetivo de avaliar o papel do operon *mce1* na patogênese do Mtb, Shimono (2003) realizou ensaios de infecção com Mtb WT e  $\Delta mce1$ , os resultados mostraram que diferentemente da cepa WT, a cepa  $\Delta mce1$  foi incapaz de induzir a formação de granulomas organizados, promoveu a migração anormal de células inflamatórias e apresentou capacidade reduzida de estimular a produção de citocinas com perfil inflamatório como TNF- $\alpha$  e IL-6. O estudo sugeriu que esse efeito imunomodulador pode ter sido desencadeado por componentes não proteicos da parede celular, transportados pelo complexo Mce1 (SHIMONO et al., 2003).

Análises posteriores com interrupção do operon *mce1* mostraram que o Mtb  $\Delta mce1$  acumula 10x mais AM livres em sua parede do que o Mtb WT (A. CANTRELL, 2013; CANTRELL et al., 2013). Também foi observado a cepa  $\Delta mce1$  acumula as três formas de ácidos micólicos encontradas em Mtb (alfa, keto e metoxi-AM) e apresenta diminuição dos níveis de lipídios conhecidos por induzir a resposta proinflamatória em comparação com a cepa WT (QUEIROZ et al., 2015).

O controle transcricional do operon *mce1* se dá pela ativação de seu regulador, o Mce1R. Uma análise realizada em um modelo de infecção de macrófagos murinos com Mtb selvagem revelou que, a expressão do operon *mce1* está significativamente diminuída após 4h de infecção (CASALI; WHITE; RILEY, 2006). Semelhantemente, em um ensaio com camundongos, Uchida (2007) mostrou que o operon *mce1* é naturalmente reprimido após 8 semanas de infecção, o que torna o Mtb selvagem fenotipicamente similar ao mutante no operon *mce1* durante o curso natural da infecção. Além disso, este trabalho sugere que o controle da expressão do operon *mce1* pode regular a arquitetura da parede bacteriana *in vivo* e induzir uma

resposta granulomatosa que permite o estabelecimento de uma infecção a longo prazo (UCHIDA et al., 2007).

### 2.7.1 Regulação da parede lipídica do Mtb

Variações linhagem específicas no conteúdo lipídico da parede do bacilo têm sido associadas à capacidade distinta de induzir a resposta imune inata e a diferentes graus de virulência entre linhagens do Mtb (KRISHNAN et al., 2011).

O dinamismo da parede celular do Mtb foi explorado em uma análise recente. O estudo reuniu evidências que indicam que o perfil lipídico expresso na parede celular do Mtb é regulado entre as fases de crescimento rápido e estático (DULBERGER; RUBIN; BOUTTE, 2020). Mtb recuperado de ME induzidos por hipóxia ou por infecção com Mtb apresentou crescimento lento e expressou um fenótipo de dormência (DANIEL et al., 2011; PEYRON et al., 2008). De fato, o perfil lipídico do Mtb em dormência induzida por hipóxia é alterado e a bactéria passa a expressar menos TDM (GALAGAN et al., 2013).

Similarmente, Eoh (2017) mostrou que o Mtb regula o conteúdo lipídico de sua parede celular, diminuindo consideravelmente a quantidade de TDM e aumentando os níveis de AM livres durante a hipóxia. Ele também observou que a infecção de macrófagos com Mtb recuperado de culturas em condições de hipóxia regulou a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-12 (EOH et al., 2017).

Semelhantemente, em uma análise metabolômica, Queiroz (2015) mostrou que a cepa de Mtb com interrupção no operon *mce1* apresenta redução na expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo de lipídios indutores da resposta proinflamatória e aumento da expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo de ácidos micólicos (QUEIROZ et al., 2015).

Em uma análise mais recente, lipídios isolados da parede celular do Mtb  $\Delta mce1$  modularam a expressão de genes ligados à resposta inflamatória em macrófagos murinos e em células T humanas, sugerindo que a regulação da parede lipídica dependente do operon *mce1* é um mecanismo importante pelo qual o Mtb explora vias metabólicas do hospedeiro (PETRILLI et al., 2020).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar a homeostase lipídica de macrófagos estimulados com extratos lipídicos da parede celular de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a expressão de genes envolvidos no metabolismo de lipídios de macrófagos estimulados com extratos lipídicos de cepas de Mtb WT e  $\Delta mce1$ ;
- II. Avaliar a formação de corpos lipídicos em macrófagos estimulados com extratos lipídicos de cepas de Mtb WT e  $\Delta mce1$ ;
- III. Avaliar a produção de leucotrienos e prostaglandinas em macrófagos estimulados com extratos lipídicos de cepas de Mtb WT e  $\Delta mce1$ ;
- IV. Avaliar a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória de macrófagos tratados ou não com bloqueador de PPAR- $\gamma$ , estimulados com extratos lipídicos das cepas de Mtb WT e/ou  $\Delta mce1$ .

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO E PLAQUEAMENTO DOS LIPÍDIOS DO MTB

A obtenção dos lipídios do Mtb foi realizada conforme modelo padronizado por Queiroz (2015). As cepas de Mtb Erdman selvagem e mutante no operon *mce1* foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 broth (Difco, MD) contendo 10% de ADC (Beckton-Dickinson, MD) e 0.2% de glicerol (Fisher Scientific, NJ) à 37°C até alcançar a fase estacionária. Depois disso, 300µL da cultura saturada foram cultivados em Erlenmeyer de cultura (Corning) contendo 30 mL de meio Sauton e incubados à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 19 dias para formação de biofilme. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 5 mL de metanol: 0,3% NaCl (100:10). A essa solução foram acrescentados 2,5 mL de éter de petróleo e homogeneizadas por 30 min em temperatura ambiente. A formação da camada superior composta por éter de petróleo e contendo os lipídios apolares foi acelerada mediante centrifugação e coletada para as análises de estimulação das células. Após evaporação do éter, o extrato lipídico foi suspenso em hexano:isopropanol (1:1) numa concentração de 0,02mg/mL. Finalmente, 500µL desta solução foram transferidos para placas de 24 poços (0,01mg/poço) e deixados em temperatura ambiente para permitir a completa evaporação do solvente. Poços controles foram plaqueados com hexano:isopropanol sem extratos lipídicos.

### 4.2 ENSAIOS COM MACRÓFAGOS RAW 264.7

Macrófagos murinos RAW 264.7 foram cultivados em meio Dulbecco's modified Eagles (DMEM; Gibco) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal à 37°C e 5%CO<sub>2</sub>. A quantidade e viabilidade de macrófagos foi avaliada pelo método de exclusão utilizando o corante trypan blue (Gibco). Antes dos experimentos, os macrófagos foram cultivados em frascos de 25cm<sup>2</sup> até alcançar a confluência de 70%. Em seguida, foram transferidas para as placas de 24 poços previamente sensibilizadas com 0,01mg do extrato lipídico da cepa WT ou  $\Delta$ mce1 ou ambos. Alternativamente, os macrófagos foram pré-tratados com 10 µM de GW9662 por 60 minutos, antes do desafio com lipídios. Conforme padronizado, nas análises de expressão gênica e quantificação de mediadores lipídicos, foi utilizado 0,01 mg do extrato lipídico para estimular um total de  $3,7 \times 10^5$  macrófagos RAW 264.7 enquanto nas análises de microscopia confocal, foram utilizados  $0,5 \times 10^5$  macrófagos, ambos incubados por um período de 72 horas à 37° C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.3 IDENTIFICAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS

Para a identificação de corpos lipídicos por microscopia confocal,  $0,5 \times 10^5$  macrófagos foram desafiados com 0,01mg de lipídios das cepas WT ou  $\Delta mce1$ . Após 72h, os macrófagos foram fixados em paraformaldeído à 4% por 1h, lavados com PBS e finalmente corados com BODIPY 493/503 em uma concentração de 0,3  $\mu\text{g/mL}$  e DAPI. As lâminas foram estocadas por 12h, e então analisadas em microscopia confocal na objetiva de 63x.

#### 4.4 ISOLAMENTO DE RNA E SÍNTESE DE CDNA

O RNA das células estimuladas com os extratos lipídicos foi isolado com o reagente Trizol (Life technologies) de acordo com as instruções do fabricante. O RNA extraído foi tratado com DNase (Qiagen) para assegurar ausência de DNA nas amostras. RNA livre de DNA (500ng) foi então homogeneizado com 50 $\mu\text{M}$  de iniciadores random hexamers e oligo(dT) (Invitrogen) para um volume final de 10 $\mu\text{l}$ . O RNA foi reversamente transcrito para cDNA total por meio da Superscript III e de acordo com as instruções do fabricante (Life Technologies).

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO DOS TRANSCRITOS POR PCR EM TEMPO REAL

Os transcritos foram quantificados por RT-qPCR baseados na incorporação do SYBR Green no sistema de detecção 7500 Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems®). A reação de RT-qPCR foi realizada com 25ng de cDNA total gerado previamente e o Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão dos genes alvos foi normalizada pela média entre os genes de referência *gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase* (GAPDH) e  *$\beta$ -actina*. Mudanças relativas na expressão gênica entre transcritos das células estimuladas pelos lipídios e não estimuladas foram calculadas de acordo com o método de análise  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os primers utilizados nas análises desse trabalho estão descritos na **Tabela 1**.

#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DE PGE2 E LTB4

Os mediadores lipídicos PGE2 e LTB4 foram quantificados em sobrenadante de cultura de macrófagos estimulados por lipídios das cepas WT e  $\Delta mce1$  de Mtb e não estimulados, utilizando os Kits Prostaglandina E2 ELISA-monoclonal (Item No. 514010, Cayman Chemical

Company, Estados Unidos) e Leucotrieno B4 ELISA (Item No. 520111, Cayman Chemical Company, Estados Unidos) conforme recomendações do fabricante. Após a leitura das placas, os valores de densidade óptica foram convertidos em picogramas por meio de software disponibilizada pelo fabricante.

#### 4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA). Para verificação a normalidade das variáveis quantitativas foi utilizado o teste de *Shapiro-Wilk*. Em seguida, a significância estatística entre duas variáveis foi avaliada pelo teste t não pareado, para distribuições paramétricas ou Mann-Whitney para distribuições não paramétricas. Os dados apresentados são representativos de quatro a seis experimentos independentes. Variáveis com distribuição paramétrica foram expressas na forma de média  $\pm$  desvio padrão (DP) e variáveis com distribuição não paramétrica foram expressas na forma de mediana  $\pm$  intervalo interquartil (IQR). As diferenças entre grupos foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

**Tabela 1** – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na análise de RT-qPCR

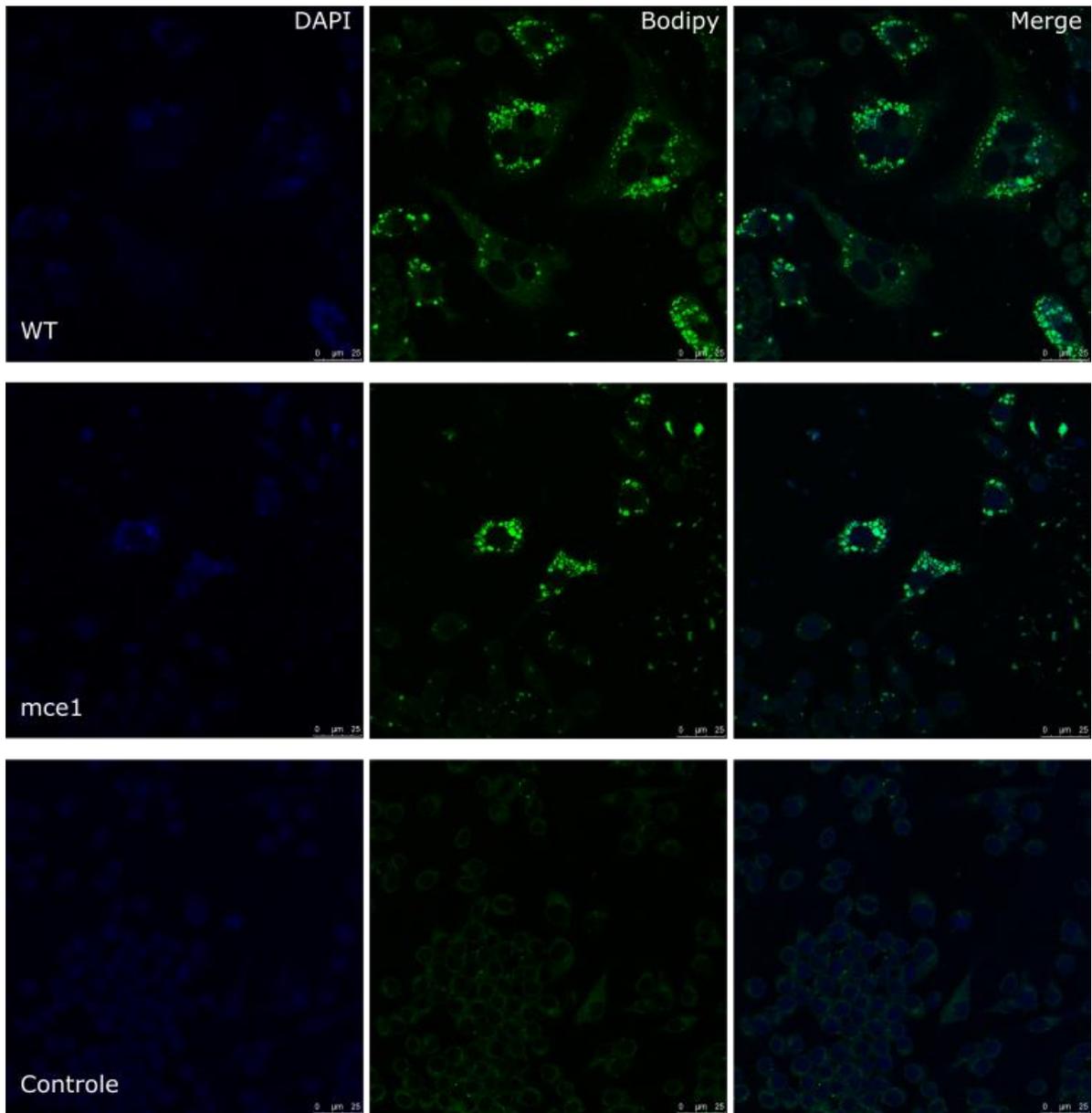
Gene		Sequencia (5' to 3')
<i>Acat1</i>	Forward primer	CCGAGACAACCTACCCAAGGA
	Reverse primer	CACACACAGGACCAGGACAC
<i>Acat2</i>	Forward primer	ATGTTCTACCGGGACTGGTG
	Reverse primer	CCCGAAAACAAGGAATAGCA
<i>Dhcr7</i>	Forward primer	GACCATCGACATCTGCCATGACC
	Reverse primer	GGAGCCTAGCTCACCAGGATGG
<i>Lpin1</i>	Forward primer	CCCTCGATTTCAACGTACCC
	Reverse primer	GCAGCCTGTGGCAATTCA
<i>Dgat1</i>	Forward primer	TCCGCCTCTGGGCATTC
	Reverse primer	GAATCGGCCCAACAATCCA
<i>Dgat2</i>	Forward primer	GCTGAGTCCCTGAGCTCCAT
	Reverse primer	CAAAGCCTTTGCGGTTCTTC
<i>Tip47</i>	Forward primer	ATGGAATCCGTGAAACAGGGTGTG
	Reverse primer	TGAGAGGTCCTGGAAGGAGTGAAT
<i>Cd36</i>	Forward primer	GGAGTGCTGGATTAGTGGTTAG
	Reverse primer	GCTGTGAGCAGACGTATAGAAG
<i>5-lo</i>	Forward primer	CTCCAACCTATGCGGGC
	Reverse primer	CTTGCGGAATCGGATCA
<i>Cox-2</i>	Forward primer	CAGGTCATTGGTGGAGAGGTG
	Reverse primer	TGCTCATCACCCCACTCAGG
<i>15-lo</i>	Forward primer	CTCTCAAGGCCTGTTCAGGA
	Reverse primer	GTCCATTGTCCCCAGAACCT
<i>Tnf-<math>\alpha</math></i>	Forward primer	CTACCTTGTTGCCTCCTCTTT
	Reverse primer	GAGCAGAGGTTTCAGTGATGTAG
<i>Il-6</i>	Forward primer	CGAGAGTCCTTCAGAGAGATACA
	Reverse primer	CCTTCTGTGACTCCAGCTTATC
<i>Il-1<math>\beta</math></i>	Forward primer	TCGTGCTGTCGGACCCATAT
	Reverse primer	GTCGTTGCTTGGTTCTCCTTGT
<i>Gapdh</i>	Forward primer	TCAACGGCACAGTCAAGG
	Reverse primer	ACTCCACGACATACTCAGC
<i><math>\beta</math>-actin</i>	Forward primer	GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA
	Reverse primer	CACACGCAGCTCATTGTAGA

**Fonte:** Elaborado pelo o autor

## 5 RESULTADOS

### 5.1 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB INDUZEM A FORMAÇÃO DE CORPOS LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS

A figura 8 mostra a formação de corpos lipídicos em macrófagos estimulados com os extratos lipídicos das cepas WT e  $\Delta mce1$  do Mtb, e não estimulados. Comparado com os macrófagos não estimulados, ambos os extratos lipídicos induziram a formação de corpos lipídicos. A alteração na composição lipídica da parede celular do Mtb, regulada pelo operon *mce1*, manteve o fenótipo espumoso observado nos macrófagos estimulados pelo extrato lipídico da cepa WT.



**Figura 8 - Formação de corpos lipídicos em macrófagos estimulados com lipídios da parede celular do Mtb.** Macrófagos Raw 264.7 estimulados com extrato lipídico da cepa WT ou  $\Delta mce1$  do Mtb por 72h. Núcleo visualizado em azul marcado com DAPI e lipídios neutros visualizados em verde marcados com BODIPY 493/503. Imagens obtidas por microscopia confocal sob aumento de 63x. Imagens representativas de seis réplicas.  
**Fonte:** Elaborado pelo o autor

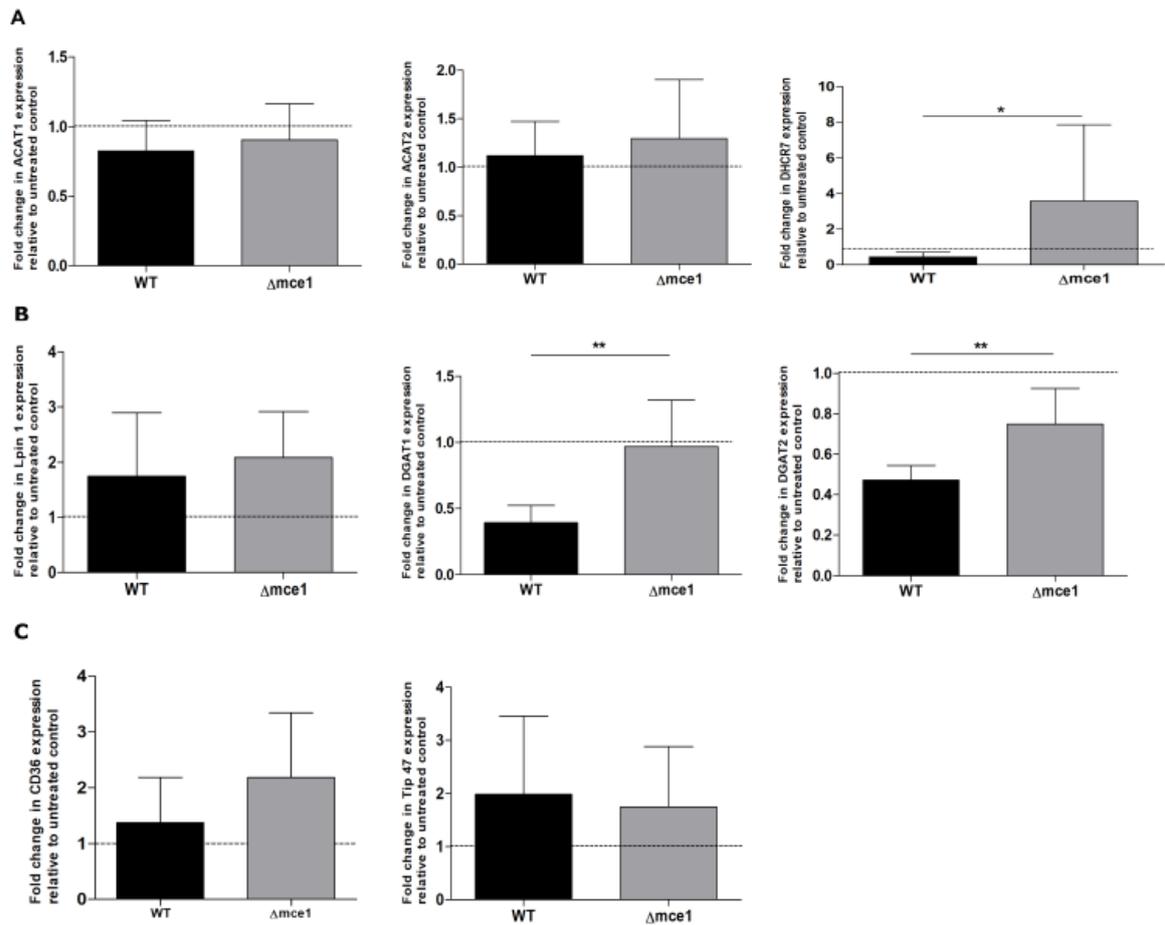
## 5.2 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB INTERFEREM NO METABOLISMO E/OU ARMAZENAMENTO DE COLESTEROL, TRIACILGLICEROL E ÁCIDOS GRAXOS PELOS MACRÓFAGOS

Uma vez que os lipídios do Mtb induzem a formação de corpos lipídicos, buscamos avaliar se esses extratos alteram a expressão de genes envolvidos no armazenamento (*Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1 e 2* [*Acat1* e *Acat2*]) e síntese (*7-Dehydrocholesterol Reductase* [*Dhcr7*]) de colesterol. Com relação ao controle não estimulado, os lipídios de ambas as cepas

WT e  $\Delta mce1$  do Mtb não alteraram o nível de expressão basal dos genes *Acat1* e *Acat2* em macrófagos murinos, após 72h de cultivo (**Figura 9A**). Em contrapartida, o gene *Dhcr7*, envolvido na síntese de colesterol, teve seu nível de expressão reprimido em macrófagos estimulados por lipídios da cepa WT em 2,2 vezes, enquanto que os macrófagos estimulados pelos lipídios da cepa  $\Delta mce1$  apresentaram aumento de 3,5 vezes, ambos relativos ao controle não estimulado. A razão  $\Delta mce1$ /WT para o gene *Dhcr7* foi de 8,0 (**Figura 9A**).

O papel dos lipídios na síntese de intermediários do triacilglicerol, tais como o diacilglicerol foi determinado por meio da quantificação dos transcritos do gene *Lpin1*. Os macrófagos apresentaram aumento da expressão em 2 e 1,7 vezes quando estimulados pelos extratos lipídicos das cepas  $\Delta mce1$  e WT do Mtb, respectivamente (**Figura 9B**). Em contrapartida, em relação ao controle não estimulado, o extrato da cepa WT reprimiu em 2,5 e 2,1 vezes a expressão dos genes *Diacylglycerol O-Acyltransferase 1* e *2* (*Dgat1* e *Dgat2*), os quais estão são responsáveis pela etapa final de síntese e armazenamento de triacilglicerol em corpos lipídicos. Comparado com os níveis de expressão nas culturas com o extrato da cepa WT, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  não inibiram ou inibiram apenas parcialmente a expressão de *Dgat1* ( $p < 0,01$ ) e *Dgat2* ( $p < 0,01$ ), respectivamente. (**Figura 9B**).

Além disso, avaliamos o papel dos lipídios do Mtb na expressão de genes envolvidos na importação através da membrana plasmática (*Cd36*), e no controle do armazenamento de ácidos graxos em corpos lipídicos (*Perilipin 3* [*Tip47*]). Em relação ao controle não estimulado, os lipídios da cepa WT induziram aumento da expressão dos genes *Cd36* e *Tip47* em 1,9 e 1,4 vezes e os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  em 2,1 e 1,7 vezes, respectivamente (**Figura 9C**).



**Figura 9 - Regulação no metabolismo e/ou armazenamento de colesterol, triacilglicerol e ácidos graxos em macrófagos estimulados pelos lipídios da parede celular do Mtb.** Análise de qPCR de genes relacionados ao armazenamento e metabolismo de colesterol (A), triacilglicerol (B) e ao armazenamento de ácidos graxos (C) em macrófagos estimulados por 72h com extrato lipídico da cepa selvagem WT ou  $\Delta mce1$  do Mtb, em relação ao grupo controle. Cinco a nove replicatas de cada reação estão representados como média  $\pm$  DP. A expressão dos genes foi normalizada pela média de expressão de glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) e  $\beta$ -actina. Significância avaliada pelo teste Mann Whitney\*\* $p < 0,01$ .

**Fonte:** Elaborado pelo autor

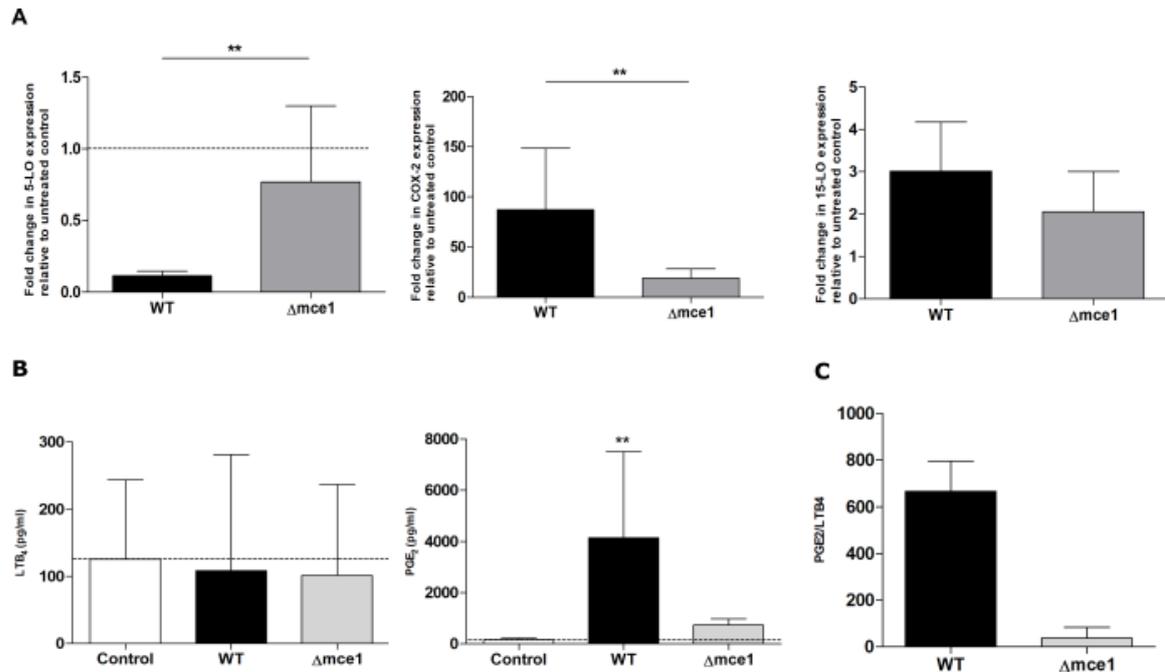
Em conjunto, os dados até aqui apresentados indicam que ambos lipídios da parede do Mtb são capazes de induzir a produção de intermediários como o diacilglicerol, apesar de modularem negativamente a síntese e armazenamento de triacilglicerol. Além disso, sugerem que a cepa  $\Delta mce1$  é capaz de estimular a síntese de colesterol pelos macrófagos.

### 5.3 LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DO MTB REGULAM A SÍNTESE DE MEDIADORES LIPÍDICOS EM MACRÓFAGOS

Conforme observado nos resultados apresentados acima, os lipídios do Mtb são capazes de estimular a formação de corpos lipídicos, assim como interferir no metabolismo de ácidos graxos e colesterol. Além disso, os corpos lipídicos constituem sítios ativos para a síntese de eicosanoides, o que nos levou a questionar se os lipídios da parede celular do Mtb têm um papel na síntese desses mediadores. Em relação ao controle não estimulado, macrófagos estimulados pelo extrato lipídico da cepa WT apresentaram modulação negativa da expressão do gene *5-lipoxigenase (5-Lo)* em 8,9 vezes (**Figura 10A**). Por outro lado, os macrófagos estimulados pelos lipídios da cepa  $\Delta mce1$  do Mtb apresentaram nível de expressão do mesmo gene similar à do controle não estimulado. A diferença entre os níveis de expressão do *5-Lo* foi significativa ( $p < 0,01$ ) e a razão WT/  $\Delta mce1$  foi de 6,8.

O gene *15-lipoxigenase (15-Lo)* apresentou aumento da expressão em 3,0 e 2,0 vezes em macrófagos estimulados por lipídios das cepas WT e  $\Delta mce1$  do Mtb, respectivamente (**Figura 10A**). Em contrapartida, o extrato lipídico da cepa  $\Delta mce1$  reduziu a expressão do gene *cicloxygenase-2 (Cox-2)* em relação ao estímulo com os lipídios da cepa WT na razão (WT /  $\Delta mce1$ ) de 4,6 vezes ( $p < 0,01$ ) (**Figura 10A**).

Como esperado, a concentração do mediador lipídico LTB<sub>4</sub> - produto da enzima 5-Lo - foi reduzida no sobrenadante da cultura de macrófagos estimulados pelos lipídios da cepa WT ou  $\Delta mce1$  do Mtb, em relação ao controle não tratado (**Figura 10B**). O extrato da cepa WT causou um aumento considerável na produção do PGE<sub>2</sub> (cerca de 26 vezes), com relação ao controle não estimulado. Os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  do Mtb modularam em 5,6 vezes a produção desse mediador, em relação ao estímulo com o extrato da cepa WT ( $p < 0,01$ ) (**Figura 10B**). O PGE<sub>2</sub> é produto da enzima Cox-2. A razão LTB<sub>4</sub>/PGE<sub>2</sub> revelou desbalanço na síntese desses mediadores após os estímulos com os lipídios das cepas WT e  $\Delta mce1$  (**Figura 10C**).



**Figura 10 - Regulação da síntese de mediadores lipídicos em macrófagos induzidos por lipídios da parede celular do Mtb.** Expressão relativa de genes que codificam as enzimas 5-Lo, Cox-2 e 15-Lo (A); concentração dos mediadores lipídicos LTB<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> no sobrenadante de cultura relativa ao controle não estimulado (B) e razão PGE<sub>2</sub>/LTB<sub>4</sub> (C) produzidos por macrófagos estimulados por 72h com extratos lipídicos da cepa WT ou  $\Delta mce1$  do Mtb. Seis replicatas de cada reação estão representados como média  $\pm$  DP. A expressão dos genes foi normalizada pela média de expressão de *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* e  $\beta$ -actina. Níveis de mediadores lipídicos foram quantificados por ELISA. Significância avaliada pelo teste Mann Whitney\*\*p<0,01.

Fonte: Elaborado pelo o autor

#### 5.4 O EXTRATO LIPÍDICO DA CEPA $\Delta MCE1$ CONTROLA NEGATIVAMENTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM MACRÓFAGOS MURINOS, EM PARTE VIA ATIVAÇÃO DO RECEPTOR PPAR- $\gamma$

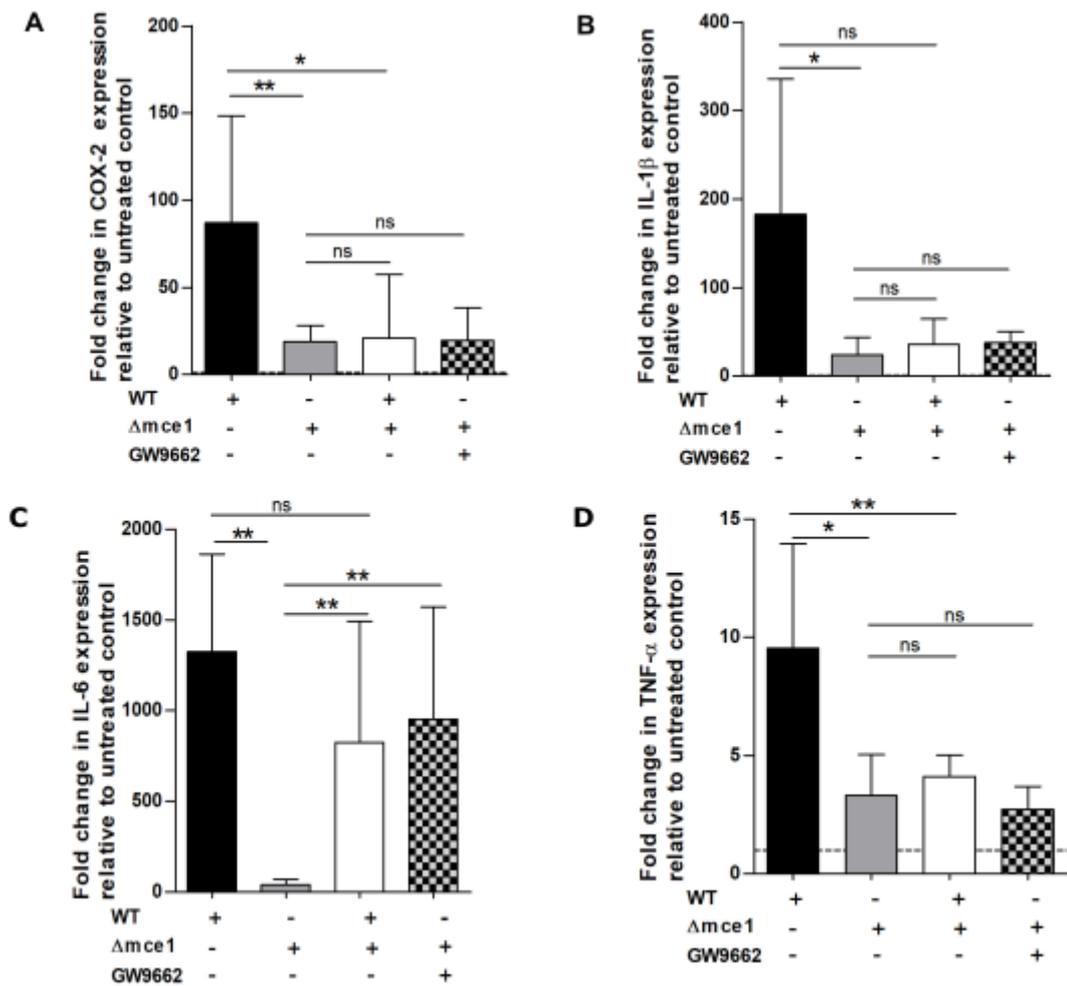
O controle da resposta inflamatória em macrófagos murinos e em células T humanas pelos lipídios do Mtb foi demonstrado em estudo recentemente (PETRILLI et al., 2020). No entanto, dois aspectos ainda não estavam bem compreendidos e foram avaliados nesse estudo: 1- se o PPAR- $\gamma$  participa como intermediário no controle da inflamação; 2- se o extrato da cepa  $\Delta mce1$  é anérgico ou se reduz a ativamente a expressão dos marcadores moleculares. Assim, foi avaliada a resposta inflamatória por meio de análise da expressão dos genes *Cox-2*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6* e *Tnf- $\alpha$* , em macrófagos expostos as seguintes condições: extratos lipídicos das cepas WT e  $\Delta mce1$  separados, os mesmos extratos juntos ou o extrato da cepa  $\Delta mce1$  + bloqueador de PPAR- $\gamma$  (GW9662).

Os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  modularam a expressão dos genes *Cox-2*, *Il-1 $\beta$* , *Il-6* e *Tnf- $\alpha$*  nas razões (WT /  $\Delta mce1$ ) de 4,6 (p<0,01), 7,5 (p<0,05), 31,3 (p<0,01) e 2,8 (p<0,01), respectivamente (Figuras 11A a 11D). Comparado com o extrato da cepa  $\Delta mce1$ , os níveis de

expressão dos macrófagos estimulados por ambos os extratos lipídicos WT e  $\Delta mce1$  juntos se mantiveram indistinguíveis ( $p > 0,05$ ) para os marcadores *Cox-2*, *Il-1 $\beta$* , e *Tnf- $\alpha$*  (**Figuras 11A, 11B e 11D**). Observou-se um aumento significativo na expressão do gene *Il-6* quando foram usados os extratos de ambas as cepas, se comparado à estimulação com o  $\Delta mce1$  sozinho ( $P < 0,01$ ) (**Figura 11C**).

Interessantemente, *Il-6* foi o único gene, entre todos que foram testados, cujo nível de expressão aumentou nos macrófagos tratados com o extrato  $\Delta mce1$  + bloqueador de PPAR- $\gamma$ , com relação ao tratamento com o extrato da cepa mutante sem o bloqueador ( $P < 0,01$ ) (**Figura 11C**).

Em conjunto, esses dados sugerem que algum componente do extrato da cepa  $\Delta mce1$  é capaz de ativamente reduzir os níveis de expressão dos genes inflamatórios *Cox-2*, *Il-1 $\beta$* , e *Tnf- $\alpha$* , mesmo na presença do extrato da cepa WT e que esse controle independe do receptor nuclear PPAR- $\gamma$ . Em contrapartida, o controle da inflamação pelo gene *Il-6* depende da interação de algum componente do extrato da cepa  $\Delta mce1$  com o receptor nuclear PPAR- $\gamma$ . Novos estudos precisam ser realizados para determinar qual o lipídio presente nesse extrato que é responsável por estes desfechos.



**Figura 11 - Controle da resposta inflamatória em macrófagos estimulados pelos lipídios da parede celular do Mtb.** Expressão relativa de genes envolvidos na resposta inflamatória: *Cox-2* (A), *Il-1β* (B), *Il-6* (C) e *Tnf-α* (D), em macrófagos estimulados por 72h com extratos lipídicos da cepa WT e/ou  $\Delta mce1$  do Mtb, tratados ou não com bloqueador de PPAR- $\gamma$  (GW9662). Quatro a seis replicatas de cada reação estão representadas em média  $\pm$  DP. A expressão dos genes foi normalizada pela média de expressão de *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* (*Gapdh*) e  $\beta$ -*actina*. Significância avaliada pelo teste Mann Whitney\*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ . ns: não significativo.

Fonte: Elaborado pelo o autor

## 6 DISCUSSÃO

A capacidade do Mtb de modular o metabolismo de macrófagos é amplamente conhecida e explorada (GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). Apesar de capazes de conter infecções bacterianas, os macrófagos infectados por Mtb tornam-se nicho ideal para a persistência do bacilo, são caracteristicamente localizados no centro de granulomas de indivíduos com TB e abrigam a micobactéria dormente em seu citoplasma (PEYRON et al., 2008).

Lipídios isolados do Mtb têm sido relatados como capazes de induzir a formação de CL em macrófagos *in vitro* (PEYRON et al., 2008; RAJARAM, M. V. et al., 2010), porém, o papel do conjunto de lipídios do Mtb, bem como a influência da regulação de sua parede lipídica no controle da homeostase lipídica do hospedeiro até então nunca haviam sido explorados.

Estudos prévios mostraram que o Mtb sofre interrupção do operon *mce1* durante o curso da infecção (UCHIDA et al., 2007). Interrupção nesse operon resulta em um perfil lipídico distinto, com alterações em cerca de 400 lipídios em relação à cepa selvagem, e característico acúmulo de AM na parede celular (QUEIROZ et al., 2015).

Os AM medeiam a formação de macrófagos espumosos por meio da transativação de receptores nucleares ativados por lipídios (DKHAR et al., 2014). Em um trabalho anterior, foi observado que os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  induzem a expressão desses receptores (PETRILLI et al., 2020) e geraram a hipótese de que o conjunto de lipídios do Mtb controlam o metabolismo lipídico dos macrófagos.

De fato, os resultados revelaram que o extrato lipídico do Mtb é capaz de induzir a formação de CL em macrófagos murinos e, apesar de todas as alterações na parede lipídica mediadas pela interrupção do operon *mce1*, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  mantêm a capacidade de promover o fenótipo espumoso nesses macrófagos.

Os CL têm sido investigados com frequência nos últimos anos devido ao reconhecimento das complexas funções dessa organela em diversos processos celulares (FARESE; WALTHER, 2009). Antigamente considerados como uma estrutura inerte dedicada ao armazenamento de lipídios, hoje, os CL são conhecidas como organelas dinâmicas, reguladas mediante alternância entre períodos de crescimento e degradação, e que exercem função direta no metabolismo e sinalização celular (OLZMANN; CARVALHO, 2019).

Os ésteres de colesterol e os triacilgliceróis são os principais componentes dessas organelas (OLZMANN; CARVALHO, 2019) e são importantes fontes de nutrientes utilizados pelo Mtb durante a infecção para prover energia (DANIEL et al., 2011), para aliviar o stress

metabólico causado pelo acúmulo de intermediários tóxicos (LEE et al., 2013), ou para a síntese de lipídios de membrana (LEE et al., 2013).

O *Mtb* possui em seu genoma genes que codificam complexos transportadores de lipídios importantes para a sobrevivência do bacilo (MENDUM et al., 2015; PANDEY; SASSETTI, 2008). A ausência do transportador de colesterol *Mce4* compromete a captação de colesterol e o crescimento bacteriano durante a fase crônica da infecção (PANDEY; SASSETTI, 2008).

Interessantemente, o centro caseoso de lesões granulomatosas causadas por *Mtb* é conhecido por apresentar grande quantidade de triacilglicerol e colesterol, além de superexpressar genes ligados ao metabolismo lipídico (KIM et al., 2010), e os macrófagos permissivos à infecção por *Mtb* superexpressam vias ligadas ao metabolismo de colesterol e triacilglicerol (PISU et al., 2020).

Notavelmente, os extratos lipídicos do *Mtb* foram capazes de interferir no metabolismo de triacilglicerol e colesterol dos macrófagos murinos. Porém, ao passo que os lipídios da cepa WT modularam a capacidade da célula de sintetizar e armazenar triacilglicerol por meio da repressão dos genes *Dgat1* e *Dgat2*, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  restauraram essa capacidade e induziram aumento da expressão de *Dhcr7*.

Os genes *Dgat1* e *Dgat2* codificam enzimas responsáveis pelo passo final da síntese de triacilglicerol, promovendo a conversão de diacilglicerol em triacilglicerol e mediando a incorporação desses lipídios entre a bicamada do retículo endoplasmático (POL; GROSS; PARTON, 2014). Enquanto isso, o gene *Dhcr7* codifica uma redutase crucial na via de síntese de colesterol, responsável por catalisar a conversão de 7-dehidrocolesterol em colesterol e tem sido associado com a polarização de macrófagos para um perfil M2 (GERRICK et al., 2018).

De fato, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  têm sido associados com a indução de um perfil de resposta menos inflamatório (PETRILLI et al., 2020), corroborando com os achados em relação à expressão de *Dhcr7*. Curiosamente, macrófagos estimulados com WT apresentaram aumento na expressão de *Lpin1*, que codifica uma ácido fosfatídico fosfatase responsável pela conversão de ácido fosfatídico em diacilglicerol, indicando que o metabolismo de intermediários se mantém, porém, o passo final da síntese de triacilglicerol é drasticamente inibido.

A utilização de triacilglicerol pelo *Mtb* tem sido claramente descrita nos últimos anos (DANIEL et al., 2004; DANIEL et al., 2011), porém, esse é um processo relacionado ao *Mtb* em estado dormente, que caracteristicamente é encontrado em ambiente hipóxico, apresenta superexpressão de lipases como a *tgsl* (DANIEL et al., 2011) e alteração no perfil lipídico representada pela diminuição de TDM e aumento de AM na parede celular (EOH et al., 2017).

Essas são características ligadas a cepa  $\Delta mce1$ , e não à cepa WT, portanto, era esperado que os lipídios da cepa WT não induzissem a formação de triacilglicerol em macrófagos (QUEIROZ et al., 2015).

Uma importante via de entrada de ácidos graxos na célula, o receptor CD36 representa uma fonte de lipídios para a incorporação em CL e formação de ME (KUNJATHOOR et al., 2002). A expressão de CD36 é modulada pela atividade de receptores nucleares ativados por lipídios, tais como PPAR- $\gamma$  e TR4, ativados por ligantes endógenos ou exógenos (XIE et al., 2009). A formação de ME mediada pela ativação de TR4 por AM do Mtb já havia sido descrita anteriormente (DKHAR et al., 2014) e corrobora com os resultados encontrados nesse trabalho.

Um conjunto de evidências sustenta a hipótese de que os ME desempenham um papel crucial na persistência do Mtb, servindo como fonte de nutrientes para o bacilo durante a infecção (DANIEL et al., 2011; PEYRON et al., 2008; SINGH et al., 2012).

Porém, uma análise recente sugeriu que, ao invés disso, a formação de ME não é um processo dirigido pelo bacilo, mas um mecanismo de defesa do hospedeiro que resulta da ativação imune de macrófagos (KNIGHT et al., 2018). Além disso, o estudo mostrou que a formação de CL em macrófagos é mediada por IFN- $\gamma$  e sustenta a produção de eicosanoides protetores para o hospedeiro.

Esse trabalho mostrou que os ME estimulados por diferentes extratos lipídicos também diferem em relação à produção de eicosanoides. Enquanto macrófagos estimulados por lipídios da cepa WT induziram alta produção de PGE2, os lipídios da cepa  $\Delta mce1$  regularam esse processo. Notavelmente, já havia sido mostrado que a produção de PGE2 induzida por IL-1 $\beta$  confere resistência ao hospedeiro por meio da redução de IFN tipo I (MAYER-BARBER et al., 2014), o que justifica a modulação na produção de PGE2 durante o curso da infecção.

Estudos desenvolvidos com *M. bovis* mostraram que a produção de PGE2 e a formação de corpos lipídicos induzidas após a infecção de macrófagos são dependentes da ativação de PPAR- $\gamma$  via TLR2 (ALMEIDA et al., 2009). Ativação de PPAR- $\gamma$  foi drasticamente inibida em camundongos nocautes para TLR2 e o bloqueio de PPAR- $\gamma$  após tratamento com o antagonista GW9662 significativamente inibiu a formação de corpos lipídicos e a produção de PGE2, favorecendo o crescimento intracelular do patógeno (ALMEIDA et al., 2009; D'AVILA et al., 2006).

Diferentemente, esse trabalho mostrou que a produção de PGE2 desencadeada pelo extrato lipídico da cepa WT do Mtb não é dependente de PPAR- $\gamma$ . Sugerindo que a modulação do macrófago pelos lipídios do Mtb provavelmente ocorre via TR4, conforme sugerido anteriormente (DKHAR et al., 2014).

Por fim, nossos resultados mostraram que os lipídios do Mtb são capazes de modular a expressão de marcadores da resposta inflamatória, em sua maioria, de forma independente de PPAR- $\gamma$ . Regulação da parede lipídica do Mtb mediada pelo operon *mce1* já havia sido descrita anteriormente como incapaz de induzir a resposta inflamatória (PETRILLI et al., 2020), porém, ainda não estava claro se os lipídios ativamente modulavam a resposta ou se apenas não eram capazes de induzi-la. Além disso, o papel do receptor PPAR- $\gamma$  na modulação da resposta inflamatória mediada pelos lipídios da cepa mutante ainda não havia sido explorado.

Os resultados mostraram que os lipídios ativamente inibem a expressão de genes envolvidos na resposta inflamatória mesmo após bloqueio do PPAR- $\gamma$ . Análises anteriores haviam mostrado que a cepa  $\Delta mce1$  é capaz de inibir a resposta inflamatória por meio da inibição de TLR2, e aqui, nós mostramos que essa inibição se mantém mesmo após adição de lipídios indutores da resposta inflamatória.

## 7 CONCLUSÃO

Os dados mostraram que o extrato lipídico do Mtb é capaz de induzir o fenótipo espumoso em macrófagos e mantém essa atividade mesmo após regulação da parede lipídica mediada pelo operon *mce1*. Esses macrófagos diferem quanto à expressão de enzimas envolvidas no metabolismo de colesterol e triacilglicerol, indicando uma possível mudança, mesmo que sutil, no conteúdo desses CL.

Nossos dados também mostraram que a regulação da parede lipídica pelo operon *mce1* é capaz de interferir não somente na formação de ME, mas na produção de eicosanoides, e consequentemente, na resposta inflamatória da célula. A modulação negativa da resposta inflamatória mediada pelos lipídios da cepa  $\Delta mce1$  se mantém mesmo na presença de lipídios indutores dessa resposta, e ocorre, em sua maioria, de forma independente do receptor nuclear PPAR- $\gamma$ .

## REFERÊNCIAS

- A. CANTRELL, S. Regulated alteration of mycolic acid structure in the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mycobacterial Diseases**, v. 02, n. 03, p., 2013.
- ALMEIDA, P. E. et al. PPAR $\gamma$  expression and function in mycobacterial infection: Roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. **PPAR Res**, v. 2012, n., p. 383829, 2012.
- ALMEIDA, P. E. et al. *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**, v. 183, n. 2, p. 1337-1345, 2009.
- AXELROD, S. et al. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 1530-1545, 2008.
- BARRY, C. E., 3rd et al. Mycolic acids: Structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog Lipid Res**, v. 37, n. 2-3, p. 143-179, 1998.
- BICKEL, P. E.; TANSEY, J. T.; WELTE, M. A. Pat proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1791, n. 6, p. 419-440, 2009.
- BLANC, L. et al. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 114, n. 42, p. 11205-11210, 2017.
- BOLD, T. D.; ERNST, J. D. Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? **Cell**, v. 136, n. 1, p. 17-19, 2009.
- BOZZA, P. et al. Lipid droplets in host-pathogen interactions. **Clinical Lipidology**, v. 4, n. 6, p. 791-807, 2009.
- BOZZA, P. T. et al. Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 85, n. 5, p. 205-213, 2011.
- BRASIL. Boletim epidemiológico de tuberculose 2020. v., n., p., 2020.
- \_\_\_\_\_. **Brasil livre da tuberculose: Evolução dos cenários epidemiológicos e operacionais da doença**. 2019
- CANTRELL, S. A. et al. Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the *mce1* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Microbiol**, v. 51, n. 5, p. 619-626, 2013.
- CASALI, N.; WHITE, A. M.; RILEY, L. W. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* *mce1* operon. **J Bacteriol**, v. 188, n. 2, p. 441-449, 2006.
- CHURCHYARD, G. et al. What we know about tuberculosis transmission: An overview. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl\_6, p. S629-S635, 2017.

COLE, S. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, n. 6685, p. 537-544, 1998.

D'AVILA, H. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: Intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **J Immunol**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

DANIEL, J. et al. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. **J Bacteriol**, v. 186, n. 15, p. 5017-5030, 2004.

DANIEL, J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* uses host triacylglycerol to accumulate lipid droplets and acquires a dormancy-like phenotype in lipid-loaded macrophages. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 6, p. e1002093, 2011.

DKHAR, H. K. et al. *Mycobacterium tuberculosis* keto-mycolic acid and macrophage nuclear receptor TR4 modulate foamy biogenesis in granulomas: A case of a heterologous and noncanonical ligand-receptor pair. **J Immunol**, v. 193, n. 1, p. 295-305, 2014.

DULBERGER, C. L.; RUBIN, E. J.; BOUTTE, C. C. The mycobacterial cell envelope - a moving target. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 47-59, 2020.

DUNPHY, K. Y. et al. Attenuation of *Mycobacterium tuberculosis* functionally disrupted in a fatty acyl-coenzyme a synthetase gene fadd5. **J Infect Dis**, v. 201, n. 8, p. 1232-1239, 2010.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; RHEE, K. Y. Metabolic principles of persistence and pathogenicity in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Rev Microbiol**, v. 16, n. 8, p. 496-507, 2018.

EOH, H. et al. Metabolic anticipation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Microbiology**, v. 2, n., p. 17084, 2017.

FARESE, R. V., Jr.; WALTHER, T. C. Lipid droplets finally get a little r-e-s-p-e-c-t. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 855-860, 2009.

FORRELLAD, M. A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

GAGO, G.; DIACOVICH, L.; GRAMAJO, H. Lipid metabolism and its implication in mycobacteria-host interaction. **Curr Opin Microbiol**, v. 41, n., p. 36-42, 2018.

GALAGAN, J. E. et al. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 178-183, 2013.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. *Mycobacterium tuberculosis*: Success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, n. 3, p. 514-532, 2012.

- GENOULA, M. et al. Formation of foamy macrophages by tuberculous pleural effusions is triggered by the interleukin-10/signal transducer and activator of transcription 3 axis through acat upregulation. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 459, p., 2018.
- GERRICK, K. Y. et al. Transcriptional profiling identifies novel regulators of macrophage polarization. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0208602, 2018.
- GOREN, M. B. Mycobacterial lipids: Selected topics. **Bacteriological reviews**, v. 36, n. 1, p. 33-64, 1972.
- GUERRINI, V. et al. Storage lipid studies in tuberculosis reveal that foam cell biogenesis is disease-specific. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 8, p. e1007223, 2018.
- HARRIS, S. G. et al. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.
- HOFFMANN, C. et al. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure **PNAS**, v. vol. 105 n. National Academy of Sciences p., 2008.
- ISHIKAWA, E. et al. Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by c-type lectin mincle. **J Exp Med**, v. 206, n. 13, p. 2879-2888, 2009.
- 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, 2004.
- KIM, M.-J. et al. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 258-274, 2010.
- KNIGHT, M. et al. Lipid droplet formation in mycobacterium tuberculosis infected macrophages requires IFN- $\gamma$ /HIF-1 $\alpha$  signaling and supports host defense. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 1, p. e1006874, 2018.
- 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.
- KUNJATHOOR, V. V. et al. Scavenger receptors class a-i/ii and cd36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages. **J Biol Chem**, v. 277, n. 51, p. 49982-49988, 2002.
- LAYRE, E. et al. A comparative lipidomics platform for chemotaxonomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & Biology**, v. 18, n. 12, p. 1537-1549, 2011.
- LEE, W. et al. Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* exploits host-derived fatty acids to limit metabolic stress. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 10, p. 6788-6800, 2013.

- LERNER, T. R. et al. Phthiocerol dimycocerosates promote access to the cytosol and intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* in lymphatic endothelial cells. **BMC Biol**, v. 16, n. 1, p. 1, 2018.
- LIMA, V. M. et al. Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and no in tuberculosis. **Infect Immun**, v. 69, n. 9, p. 5305-5312, 2001.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- MAHAJAN, S. et al. *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR $\gamma$  and TR4 for survival. **J Immunol**, v. 188, n. 11, p. 5593-5603, 2012.
- MATTOS, K. A. et al. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 6, p. 797-815, 2014.
- MAYER-BARBER, K. D. et al. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type i interferon crosstalk. **Nature**, v. 511, n., p. 99, 2014.
- MENDUM, T. A. et al. Lipid metabolism and type vii secretion systems dominate the genome scale virulence profile of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 372, 2015.
- MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 10, p. 709-721, 2013.
- MÜLLER, H.; KRÜGER, S. Immunohistochemical analysis of cell composition and in situ cytokine expression in hiv- and non-hiv-associated tuberculous lymphadenitis. **Immunobiology**, v. 191, n. 4-5, p. 354-368, 1994.
- NOSE, F. et al. Crucial role of perilipin-3 (tip47) in formation of lipid droplets and pge2 production in hl-60-derived neutrophils. **PLoS One**, v. 8, n. 8, p. e71542, 2013.
- OLZMANN, J. A.; CARVALHO, P. Dynamics and functions of lipid droplets. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 137-155, 2019.
- PACHECO, P. et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: Innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6498-6506, 2002.
- PAI, M. et al. Tuberculosis. **Nat Rev Dis Primers**, v. 2, n., p. 16076, 2016.
- PALMBLAD, J. et al. Leukotriene b4 is a potent and stereospecific stimulator of neutrophil chemotaxis and adherence. **Blood**, v. 58, n. 3, p. 658-661, 1981.
- PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 11, p. 4376-4380, 2008.

- PETRILLI, J. D. et al. Differential host pro-inflammatory response to mycobacterial cell wall lipids regulated by the *Mce1* operon. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. 1848, p., 2020.
- PEYRON, P. et al. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. **PLoS Pathog**, v. 4, n. 11, p. e1000204, 2008.
- PISU, D. et al. Dual rna-seq of Mtb-infected macrophages in vivo reveals ontologically distinct host-pathogen interactions. **Cell Rep**, v. 30, n. 2, p. 335-350 e334, 2020.
- POL, A.; GROSS, S. P.; PARTON, R. G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins, and sites. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.
- QUEIROZ, A. et al. Comparative metabolic profiling of *mce1* operon mutant vs wild-type *Mycobacterium tuberculosis* strains. **Pathog Dis**, v. 73, n. 8, p. ftv066, 2015.
- QUEIROZ, A.; RILEY, L. W. Bacterial immunostat: *Mycobacterium tuberculosis* lipids and their role in the host immune response. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50, n. 1, p. 9-18, 2017.
- RAJARAM, M. V. et al. *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor gamma linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. **J Immunol**, v. 185, n. 2, p. 929-942, 2010.
- RAJARAM, M. V. S. et al. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. **Seminars in immunology**, v. 26, n. 6, p. 471-485, 2014.
- RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012.
- RAMESHWARAM, N. R. et al. Lipid metabolism and intracellular bacterial virulence: Key to next-generation therapeutics. **Future Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1301-1328, 2018.
- RILEY, R. L. et al. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. **American Journal of Epidemiology**, v. 142, n. 1, p. 3-14, 1995.
- RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 569-578, 2001.
- \_\_\_\_\_. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 39-47, 2007.
- RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature immunology**, v. 10, n. 9, p. 943-948, 2009.
- SAITA, N. et al. Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats **Infection and Immunity**, v. Vol. 68, n. American Society for Microbiology, p. p. 5991-5997 2000.

SEQUEIRA, P. C.; SENARATNE, R. H.; RILEY, L. W. Inhibition of toll-like receptor 2 (tlr-2)-mediated response in human alveolar epithelial cells by mycolic acids and *Mycobacterium tuberculosis mce1* operon mutant. **Pathog Dis**, v. 70, n. 2, p. 132-140, 2014.

SHIMONO, N. et al. Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 26, p. 15918-15923, 2003.

SINGH, V. et al. *Mycobacterium tuberculosis*-driven targeted recalibration of macrophage lipid homeostasis promotes the foamy phenotype. **Cell Host Microbe**, v. 12, n. 5, p. 669-681, 2012.

SKINNER, J. R. et al. Diacylglycerol enrichment of endoplasmic reticulum or lipid droplets recruits perilipin 3/tip47 during lipid storage and mobilization. **J Biol Chem**, v. 284, n. 45, p. 30941-30948, 2009.

UCHIDA, Y. et al. Accelerated immunopathological response of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* disrupted in the *mce1* operon negative transcriptional regulator. **Cell Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 1275-1283, 2007.

VARGA, T.; NAGY, L. Nuclear receptors, transcription factors linking lipid metabolism and immunity: The case of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 38, n. 10, p. 695-707, 2008.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 4033-4038, 2005.

WALTHER, T. C.; FARESE, R. V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 687-714, 2012.

WALZL, G. et al. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 5, p. 343-354, 2011.

WELTE, Michael A. Expanding roles for lipid droplets. **Current Biology**, v. 25, n. 11, p. R470-R481, 2015.

WHO. **Global tuberculosis report 2018**. WHO. Geneva, 2018

\_\_\_\_\_. **Global tuberculosis report 2020**. WHO. Geneva, 2020

XIE, S. et al. Tr4 nuclear receptor functions as a fatty acid sensor to modulate cd36 expression and foam cell formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 32, p. 13353-13358, 2009.