

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

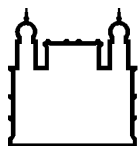
NATALIA ROBERTA ROQUE

Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por componentes da parede celular de *M.tuberculosis* e BCG e a sua interação com organelas da via endocítica

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

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

RIO DE JANEIRO
Março, 2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Natália Roberta Roque

Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por componentes da parede celular de *M.tuberculosis* e BCG e a sua interação com organelas da via endocítica

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

Aprovada em: 29/03/2011

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Carmen Penido (Presidente)

Prof. Dra. Ana Paula Ferreira

Prof. Dr. Flávio Lara

Prof. Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Prof. Dra. Clarissa Maya-Monteiro

Rio de Janeiro, 29 de março de 2011

“O que eu faço, é uma gota no meio de um oceano. Mas sem ela, o oceano seria menor”. *Madre Teresa de Calcutá.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, a Dr^a Patrícia Torres Bozza por ter acreditado em mim, por possibilitar o meu crescimento desde a iniciação científica e pela orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

À minha co-orientadora e amiga Dr^a Heloísa D'Ávila que apesar da distância sempre se faz presente quando eu preciso. Obrigada pela amizade, pela orientação, pelas conversas e pelos passeios em JF.

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

À amiga Rachel pelos conselhos e apoio não tenho palavras para descrever tudo o que ela me ensinou e me ajudou dentro e fora do laboratório

À amiga Clarissa, uma pessoa de coração enorme. Em primeiro lugar, obrigada por me agüentar. Obrigada também pelo carinho e por sempre procurar me ensinar, corrigir e checar se está tudo bem comigo sempre que tem um tempinho.

À amiga Pat Elaine que me ensinou muito desde que eu entrei no laboratório e que na hora do sufoco sempre foi a minha salva-vidas. Saudades.

À todos do laboratório de Imunofarmacologia, Cecilia, Valber, Livia, Dani, Patrícia Pacheco, Carla, Isabel, Barbára, Diogo, Diego, Clarissinha, Natassia, Mariana, Angélica, Nathalia, Alessandra, Drica, Claudia, Isaclaudia, André, Ligia, Marina, Pedro. Cada um da sua maneira contribuiu para a minha formação durante esse período.

À amiga Rose pelo carinho, preocupação e por sempre me ajudar a resolver qualquer problema.

As pessoas maravilhosas que conheci nesse período, Raphael Molinaro e Eugenio, que entre bolos, pães com mortadela, PCRs e doações de sangue fizeram dessa jornada muito mais divertida. Ah, Rapha, obrigada pela companhia noturna no lab.

À Gi e Nara por me proporcionarem vários momentos de diversão e fofocas infundáveis. E por riem junto comigo nos momentos tensos. Ah, Nara, obrigada por sempre me dar aquele *help* com o Western blotting.

À Carol por me socorrer sempre que me enrolo quando decido fazer mais experimentos do que deveria.

À Flora pelas coronas e pela “terapia” ponte rio-niterói.

Zanon e Susu, pelas conversas e conselhos em relação a vida. Adoro vocês!

Ao Edson, pelas gargalhadas, caronas e dosagens.

Aos novos estudantes e pesquisadores do laboratório Roberta, Glauce, Adriana Vallochi e Bia. Por ter enriquecido a minha tese pela troca de experiências.

As pessoas que não estão mais aqui, mas que contribuíram para a minha formação e que fazem uma falta tremenda, Kelly, Dri.

As secretárias do departamento e da pós-graduação Andréa, Tati, Josi e Danielle pela ajuda sempre que necessário.

Aos órgãos de apoio científico CNPq, FIOCRUZ, FAPERJ.

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

Ao Dr. Bernard Ryfel e a Dra. Valerie Quesniaux bem como, a cooperação internacional Fiocruz/CNRS.

À minha mãe pois é ela que me ajuda a ver o copo meio cheio quando às vezes parece estar é meio vazio (rs). Obrigada por existir na minha vida e ser a primeira a acreditar no meu potencial.

Ao meu Tio Wilson por acompanhar tão de perto a minha vida e com quem eu posso contar em qualquer situação. Obrigada pelos conselhos, por se preocupar e principalmente por sempre estar disponível pra mim.

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

Ao meu avô. Saudades suas. Tenho certeza que não se caberia de tanto orgulho.

À amiga Gláucia, poderia dizer que agradeço simplesmente por ser minha amiga. Mas não tem como. Obrigada por estar sempre por perto e disposta a jogar a corda pra me salvar. E quando não dá, por simplesmente ser uma ótima ouvinte. Obrigada pela sua amizade. Sempre!

À amiga Sophie que foi o meu “porto seguro” durante a minha estadia na França. Que apesar de já nos conhecermos a 6 anos, só descobri a pouco tempo o quanto temos em comum. Ah, e obrigada por fornecer o tão necessário acesso ao PUBMED.

À amiga Silvia, que apesar da distância, não houve 1 mês sequer que não tivéssemos notícias uma da outra. E se o barco parece estar afundando, não se preocupe, é só gritar que a gente escuta e liga. Obrigada pelas discussões de artigos, pelos conselhos, por simplesmente me ouvir e por sempre dizer a coisa certa.

As amigas Vânia, Janine e Nathalia por todo apoio, força e orações que foram fundamentais para que esse trabalho se concretizasse.

Ao Eduardo, meu amor, meu companheiro de realizações e aventuras. Obrigada por me compreender e estar comigo nessa viagem maluca que se chama vida.

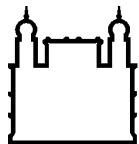
À Deus, por ter me dado perseverança e força para terminar mais essa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Abreviações	xii
Lista de Esquemas e Figuras	xvi
1) Introdução	1
1.1) Tuberculose.....	2
1.1.1) Epidemiologia e aspectos gerais.....	2
1.1.2) Imunopatogenia.....	5
1.1.3) Resposta Imune inata.....	9
1.1.4) Resposta imune adaptativa.....	14
1.1.5) Mecanismos de escape.....	16
1.2) Corpúsculos lipídicos.....	22
1.2.1) Estrutura e composição dos corpúsculos lipídicos.....	22
1.2.2) Biogênese dos Corpúsculos lipídicos.....	27
1.2.3) Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico em resposta às infecções.....	32
1.2.4) Papel dos corpúsculos lipídicos na infecção por <i>M. bovis</i> , BCG, <i>M.tuberculosis</i> e <i>M. leprae</i>	35
2) Objetivos	39
2.1) Objetivo geral.....	40
2.2) Objetivos específicos.....	40
3) Metodologia	41
3.1) Animais.....	42
3.2) <i>Mycobacterium bovis</i> , BCG.....	42
3.3) Pleurisia induzida por BCG.....	42
3.4) Cultura de macrófagos derivados de medula óssea e estímulo <i>in vitro</i>	43
3.5) Indução de Neutrófilo apoptótico.....	44
3.6) Quantificação da Apoptose.....	44
3.7) Estimulação <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneais.....	45
3.8) Análises por fluorescência.....	45

3.8.1)	Imunolocalização de Rab5, Rab7 e RILP em macrófagos pleurais	45
3.8.2)	Revestimento das partículas de látex fluorescentes com PIM e LAM.....	46
3.9)	Marcação de bactérias vivas e mortas.....	47
3.10)	Contagem de Corpúsculos Lipídicos.....	47
3.11)	Contagem de Leucócitos totais	48
3.12)	Contagem Diferencial de leucócitos	48
3.13)	Microscopia eletrônica	48
3.14)	Aquisição das imagens.....	50
3.15)	Análise Estatística	50
4)	Resultados	51
4.1)	<i>Indução de corpúsculos lipídicos na infecção por BCG in vivo.....</i>	<i>52</i>
4.2)	<i>A infecção experimental por BCG induz a migração de neutrófilos para a cavidade pleural.....</i>	<i>53</i>
4.3)	<i>Infecção por BCG induz apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório</i>	<i>54</i>
4.4)	<i>A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos in vitro</i>	<i>56</i>
4.5)	<i>A inibição da apoptose de neutrófilos reduz parcialmente a formação de corpúsculos lipídicos na infecção por BCG in vivo.....</i>	<i>58</i>
4.6)	<i>A formação de corpúsculos lipídicos não é um fenômeno dependente da fagocitose</i>	<i>60</i>
4.7)	<i>Componentes da parede micobacteriana foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos.....</i>	<i>61</i>
4.8)	<i>A biogênese dos corpúsculos lipídicos é parcialmente dependente do receptor CD36</i>	<i>62</i>
4.9)	<i>O co-receptor para TLR, CD14, está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos.....</i>	<i>64</i>
4.10)	<i>A infecção pleural por BCG apresenta uma aproximação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos em 24 h.</i>	<i>66</i>
4.11)	<i>A viabilidade bacteriana não é importante para que haja a interação do fagossoma com os corpúsculos lipídicos.....</i>	<i>70</i>
4.12)	<i>Partículas de látex revestidas com LAM e PIM foram observadas próximas aos corpúsculos lipídicos.....</i>	<i>71</i>
4.13)	<i>A proteína Rab7, mas não a Rab5 está co-localizada com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção in vivo</i>	<i>73</i>

4.14)	<i>A proteína Rab7 presente nos corpúsculos lipídicos está na sua forma ativa</i>	<i>77</i>
5)	Discussão.....	80
6)	Conclusões	90
7)	Referências Bibliográficas.....	92
8)	Anexo	111



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por componentes da parede celular de *M. tuberculosis* e BCG e a sua interação com organelas da via endocítica

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natália Roberta Roque

A formação de corpúsculos lipídicos é um evento que tem sido recentemente descrito durante a tuberculose tanto em condições clínicas quanto experimentais. O aumento no número dessas organelas é um fenômeno bem regulado que parece ter uma importante implicação na patogênese microbiana. Contudo, os mecanismos pelos quais as micobactérias desencadeiam a formação dos corpúsculos lipídicos bem como o seu papel na infecção ainda não estão totalmente compreendidos. Investigamos nesse trabalho os primeiros eventos da defesa do hospedeiro em resposta a infecção por BCG, bem como a formação de corpúsculos lipídicos, os receptores envolvidos na sua biogênese e o seu papel na modulação via endocítica. Durante a infecção experimental por BCG ocorreu uma intensa migração de neutrófilos nas 6 h iniciais. Em 24 h, um grande número de neutrófilos infectados (92%) apresentavam características de morte celular por apoptose. Nos experimentos *in vitro*, tanto os neutrófilos apoptóticos quanto a infecção com BCG sozinho foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos. Contudo, a resposta foi amplificada no grupo contendo tanto os neutrófilos apoptóticos quanto o BCG. Ainda, o pré-tratamento *in vivo* com um inibidor de pan-caspase, o zVAD, inibiu a apoptose de neutrófilos, sem modificar o recrutamento destas células nos camundongos C57Bl/6 infectados com BCG. Sob esta condição, a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos foi significativamente inibida nos animais infectados, indicando o papel da célula apoptótica na formação dos corpúsculos lipídicos durante a infecção. Além disso, foi observado o envolvimento dos receptores CD14 e CD36 na biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG *in vitro* e *in vivo* respectivamente. A parede celular das micobactérias tem sido apresentada como importante componente na interação patógeno-hospedeiro. Dessa forma, analisamos o papel de componentes da parede micobacteriana na indução de corpúsculos lipídicos. Foi observado que o LAM, TDM e TMM além do BCG, foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos após 24 h de estimulação *in vitro*. Porém, a micobactéria não patogênica *M. smegmatis* e partículas de látex não revestidas não foram capazes de induzir um aumento no número de corpúsculos lipídicos. A análise por microscopia eletrônica de transmissão demonstrou a associação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas além da imagem sugestiva de um corpúsculo lipídico internalizado por um fagossoma infectado durante a infecção experimental por BCG *in vivo*. Por imunofluorescência, foi observado que a interação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas não é dependente da viabilidade bacteriana. Partículas de látex revestidas com os componentes da parede micobacteriana LAM ou PIM apresentaram-se próximas dos corpúsculos lipídicos em diferentes tempos em experimentos *in vitro*. Após 24 h de infecção por BCG *in vivo* foi observada a presença da proteína da via endocítica Rab7 e do seu efetor a RILP, mas não da Rab5, co-localizada com os corpúsculos lipídicos, sugerindo que os corpúsculos lipídicos possam estar seqüestrando a Rab7, necessária para a maturação fagossomal. Nossos resultados mostraram diferentes mecanismos envolvidos na biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG sugerindo

que a modulação dessas organelas pelo patógeno pode representar um importante mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro e um futuro alvo terapêutico.

Abstract

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Natália Roberta Roque

Lipid body formation is an event that has been recently described during tuberculosis in both clinical and experimental conditions. The increase of these organelles is a well regulated phenomenon that seems to have an implication in microbial pathogenesis. However, the mechanisms by which the microbial trigger the lipid bodies formation as well as its role in the infection are still not fully understood. We investigated in this work the first events of the host defense in the BCG infection response, as well as the lipid bodies formation, the receptors involved in their biogenesis, and their role in endocytic pathway modulation. During the experimental infection by BCG a great neutrophils influx happened in the initial 6 h. In 24h, a great number of infected neutrophils (92%) showed apoptotic cell death features. In *in vitro* experiments, both apoptotic neutrophils and BCG infection alone were able to induce lipid bodies formation in macrophages. However, the response was amplified in the group containing both apoptotic neutrophils and BCG. Still, the pre treatment *in vivo* with pan-caspase inhibitor, zVAD, inhibited the neutrophils apoptosis, without modifying the influx of these cells in the BCG infected C57Bl/6 mice. Under this condition, the lipid body formation in macrophages was drastically inhibited in infected animals, indicating the role apoptotic cells in the lipid body biogenesis during the infection. Beyond that, was observed the involvement of CD14 and CD36 receptors in the lipid bodies biogenesis induced by BCG *in vitro* and *in vivo*, respectively. The mycobacteria cell wall has been presented as an important component of host-pathogen interaction. In this way, we analyzed the role of mycobacteria cell wall component in the lipid bodies induction. It was observed that LAM, TDM, and TMM, beside BCG, were able to induce the lipid bodies formation in macrophages after 24h of *in vitro* stimuli. However, the non-pathogenic mycobacteria *M. smegmatis* and non coated latex beads were not able to induce an increase in the numbers of lipid bodies. Transmission electronic microscopic analyze showed an interaction between the lipid bodies and phagosomes, beside a suggestive image of an infected phagosome with an internalized lipid body during the experimental BCG infection *in vivo*. By imunofluorescence, it was observed that the interaction between the lipid bodies and phagosomes is not dependent of bacterial viability. Latex beads coated with mycobacterial cell wall components LAM or PIM presented themselves close of the lipid bodies in different times in *in vitro* experiments. After 24h of *in vivo* BCG infection, was observed the presence of Rab7 endocytic pathway protein and its effector RILP, but not the Rab5, co-localized with the lipid bodies, suggesting that the lipid bodies could be highjacking the Rab7, needed for the phagosome maturation. Our results showed different mechanisms involved in the lipid bodies biogenesis induced by BCG, suggesting that modulation of these organelles by the pathogen could represent an important escape mechanism of the host immune response and a future therapeutic target.

Lista de Abreviações

AA	Ácido araquidônico
ACAT	Acetil-CoA:colesterol aciltransferase
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos
AKAP	Proteína ancoradora da quinase A
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
BCG	Bacilo Calmette Guérin
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupo de diferenciação
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor do complemento
DAG	Diacilglicerol
DGAT	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
G-CSF	Fator de crescimento de colônias de granulócitos
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Trifosfato de guanosina
HETE	Ácido -(S)-hidroxi-eicosatetraenóico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível

IFN- γ	Interferon – gama
IRF	Fator regulatório de interferons
i.t.	injeção intratorácica
KDa	Quilodaltons
LAM	Lipoarabinomanana
LAMP	Proteína de membrana associada ao lisossoma
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LM	Lipomanana
LO	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA	Ácido lipoteicóico
ManLam	Lipoarabidomanana com capa de manose
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos
MD	Diferenciador mielóide
MDR	Multidroga resistente
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MOI	Multiplicidade de infecção
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
MIP	Proteína inibitória de monócitos

MR	Receptor de manose
mTOR	Proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NK	Células matadoras naturais
NOS	Óxido nítrico sintase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PI(4,5)P ₂	Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PIM	Fosfatidil mioinositol manosídeo
PG	Prostaglandina
PK	Proteína quinase
PL	Fosfolipase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
RANTES	Quimiocina reguladas durante ativação, normalmente expressa e secretada por células T
RILP	do inglês “Rab7-interacting-lysosomal-protein”

RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
STF	Fator de tuberculose solúvel
TGF- β	Fator transformador de crescimento – beta
Th	Linfócitos T helper
TIP47	Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons
TIR	Toll/receptor de interleucina 1
TIRAP	do inglês “Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor protein”
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF
TRIF	do inglês “Toll/IL-1 receptor domain containing adaptor inducing interferon-beta”
UFC	Unidade formadora de colônia
XDR	Extensivamente resistente a drogas

Lista de Esquemas e Figuras

Esquema 1. Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2009..	4
Esquema 2. Fisiopatologia da tuberculose.	8
Esquema 3. Comparação entre a formação dos fagossomas de micobactérias patogênicas e não-patogênicas.....	21
Esquema 4. Imagem ultra-estrutural dos corpúsculos lipídicos.....	26
Esquema 5. Modelos hipotéticos para a formação dos corpúsculos lipídicos	31
Esquema 6 – Modelo proposto para a bigênese dos corpúsculos lipídicos e o seu papel na infecção experimental por <i>Mycobacterium bovis</i> , BCG.	89
Figura 1. Cinética da formação de corpúsculos lipídicos <i>in vivo</i> na infecção experimental por BCG.....	52
Figura 2. Cinética da migração de neutrófilos <i>in vivo</i> na infecção experimental por BCG	53
Figura 3. Infecção por BCG induz apoptose em células do lavado pleural	55
Figura 4. O papel do neutrófilo apoptótico na formação de corpúsculos lipídicos	57
Figura 5. Inibição da apoptose de neutrófilos pelo pré-tratamento com zVAD	58
Figura 6. Efeito da inibição da apoptose na formação de corpúsculos lipídicos nos animais infectados	59
Figura 7. Efeito da inibição da apoptose na migração de neutrófilos para a cavidade torácica.....	59
Figura 8. Indução da formação de Corpúsculos Lipídicos por BCG <i>in vitro</i>	60
Figura 9. Envolvimento dos lipídios TDM e TMM da parede de <i>M. bovis</i> e LAM da parede de <i>M. tuberculosis</i> na formação de corpúsculos lipídicos <i>in vitro</i>	61
Figura 10. Formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal é dependente de CD36 na infecção por BCG <i>in vivo</i>	63
Figura 11. Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos diferenciados de medula óssea induzida por BCG <i>in vitro</i> é dependente de CD14.....	65
Figura 12. Interação dos corpúsculos lipídicos com o fagossoma	67
Figura 13 Visualização de corpúsculos lipídicos no interior do fagossoma infectado por BCG	69
Figura 14. Interação de fagossomo contendo bactéria viva ou morta com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção <i>in vivo</i>	70
Figura 15. Interação de fagossomos contendo partículas de látex fluorescentes revestidas com componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos	72
Figura 16. A proteína Rab5 parece não co-localizar com corpúsculos lipídicos induzidos por BCG	74

Figura 17 Co-localização da proteína Rab7 em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG.....	75
Figura 18. Imunomarcção com ouro da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG 24 h <i>in vivo</i>	76
Figura 19. Co-localização da proteína Rilp em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG	78
Figura 20. Co-localização da proteína Rilp em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG	79

1) *Introdução*

1.1) Tuberculose

1.1.1) Epidemiologia e aspectos gerais

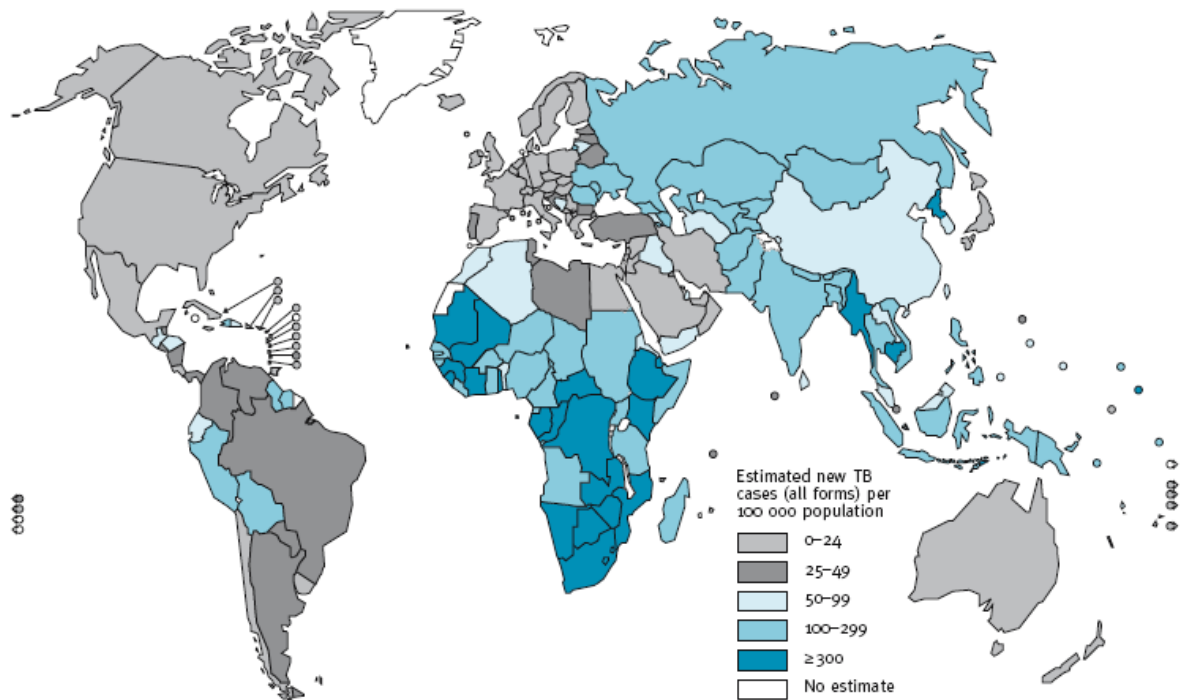
A tuberculose é a segunda maior causa de mortes (1,7 milhões em 2009) por doenças infecciosas em todo mundo podendo ser comparada somente com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (OMS 2009) (Esquema 1). O Brasil ocupa hoje a 19ª posição na classificação dos 22 países com maiores índices de incidência de tuberculose no mundo (OMS 2009). Nos últimos anos, a tuberculose tem se tornado um dos mais graves problemas de saúde pública do mundo, devido a suscetibilidade aumentada de infecção em pessoas portadoras do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), sendo reconhecida por ser a maior responsável pela morte de pessoas infectadas com o vírus HIV (Corbett et al., 2006; Corbett et al., 2003).

Além do impacto da AIDS, outra importante causa da mortalidade é a existência de cepas resistentes ao tratamento da tuberculose. O tratamento da tuberculose ativa compreende a utilização das drogas rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (Blaas et al., 2008; Gandhi et al., 2006; Olle-Goig, 2006; Shah et al., 2007). Contudo, a OMS registrou que 3,3% dos novos casos de tuberculose em 2009 eram de cepas multidroga resistente (MDR), caracterizado por ser resistente a pelo menos duas drogas da primeira linha de tratamento contra a tuberculose, como a isoniazida e rifampicina (Caminero, 2006; Chan et al., 2004; Eker et al., 2008). De maneira preocupante, a OMS tem registrado a presença de cepas extensivamente resistente a drogas (XDR) em pelo menos 58 países, que além de serem resistentes as drogas da primeira linha de tratamento, ainda são resistentes a pelo menos 3 das 6 drogas da segunda linha de tratamento (Blaas et al., 2008; Gandhi et al., 2006; Olle-Goig, 2006; Shah et al., 2007). A presença de um número crescente de bactérias resistentes foi responsável por 440.000 novos casos de MDR causando 150.000 mortes em 2008, que pode ser conseqüência do uso inadequado do tratamento. Por ser um tratamento longo, podendo durar de 2 a 6 meses, não é incomum o paciente parar a terapia logo após o desaparecimento dos sintomas sem que o tratamento seja finalizado (Blaas et al., 2008; Gandhi et al., 2006; Olle-Goig, 2006; Raviglione, 2006; Shah et al., 2007).

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

Em geral, o primeiro contato com a micobactéria desencadeia uma resposta inflamatória capaz de combater o agente infeccioso de maneira eficaz, raramente havendo o estabelecimento da tuberculose primária, que ocorre devido a falta de uma resposta imune eficiente. Contudo, alguns fatores estão envolvidos com o desenvolvimento da doença, como a diabetes, desnutrição, silicose, idade avançada e imunossupressão (Algood et al., 2003; Flynn and Chan, 2001; Small and Fujiwara, 2001). Dessa forma, o desenvolvimento da doença pode ocorrer devido a uma re-infecção ou quando o indivíduo é portador assintomático, por uma reativação do foco infeccioso primário. Segundo a OMS, entre 5% a 10% das pessoas infectadas pelo bacilo desenvolvem a forma ativa da doença em algum momento da vida.

Um único indivíduo portador da tuberculose ativa não tratado, pode transmitir a doença para 10 a 15 pessoas por ano (OMS 2009). Dessa forma, novas tentativas de prevenção e medicamentos com novos mecanismos de ação tornaram-se necessários. Enfatizando ainda mais a importância de pesquisas básicas, a fim de investigar as interações entre as micobactérias e as células hospedeiras, uma vez que essa é uma doença de patogenia complexa e que os seus mecanismos moleculares ainda não se encontram bem esclarecidos.



Esquema 1. Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2009. Figura adaptada da Organização Mundial de Saúde: Controle global da tuberculose, vigilância, planejamento e financiamento 2010 (WHO/HTM/2010.7).

1.1.2) Imunopatogenia

A tuberculose é causada por bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* onde são compreendidas as espécies patogênicas *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* (Frieden et al., 2003). São caracterizados por serem pequenos bacilos, aeróbios obrigatórios, sem motilidade, de lenta multiplicação e resistentes a colorações álcool-ácidas (Koch, 1890; Menezes-de-Lima-Junior and Henriques, 1997).

A transmissão ocorre através da liberação dos bacilos por pessoas com a tuberculose na forma ativa não tratadas através da tosse, espirro e fala. Os bacilos podem sobreviver no ambiente por várias horas e, para que haja a infecção é necessário que apenas um único bacilo seja inalado (Esquema 2) (Riley et al., 1995; Russell, 2007).

A infecção pela micobactéria ocorre através de uma série de etapas definidas. Após a inalação do bacilo, macrófagos alveolares residentes irão fagocitar o bacilo, induzindo uma resposta pró-inflamatória e a invasão do tecido pulmonar (Cosma et al., 2004; Flynn and Chan, 2001; Hocking and Golde, 1979a; Hocking and Golde, 1979b; Ulrichs and Kaufmann, 2006). O organismo do hospedeiro pode responder a esta infecção de 3 maneiras possíveis: a) com uma resposta imune eficiente, culminando com a eliminação do bacilo; b) com a replicação intracelular da bactéria, caracterizando a tuberculose primária, ou c) com a “dormência” da bactéria no interior de fagócitos, caracterizando a infecção latente. Porém, quando o sistema imune fica comprometido, seja por uma co-infecção por HIV, desnutrição, câncer, diabetes ou até pelo uso de medicamentos imunossupressivos, essa infecção latente pode ser reativada levando ao desenvolvimento da forma ativa da tuberculose (Algood et al., 2003; Small and Fujiwara, 2001).

Os macrófagos infectados no tecido pulmonar são capazes de produzir o fator de necrose tumoral (TNF- α), assim como quimiocinas capazes de recrutar diversos tipos celulares, como neutrófilos, células NK (células matadoras naturais), células T CD4⁺ e T CD8⁺. Uma vez no sítio de infecção, essas células continuam produzindo quimiocinas e citocinas amplificando o recrutamento celular e remodelando o sítio de infecção

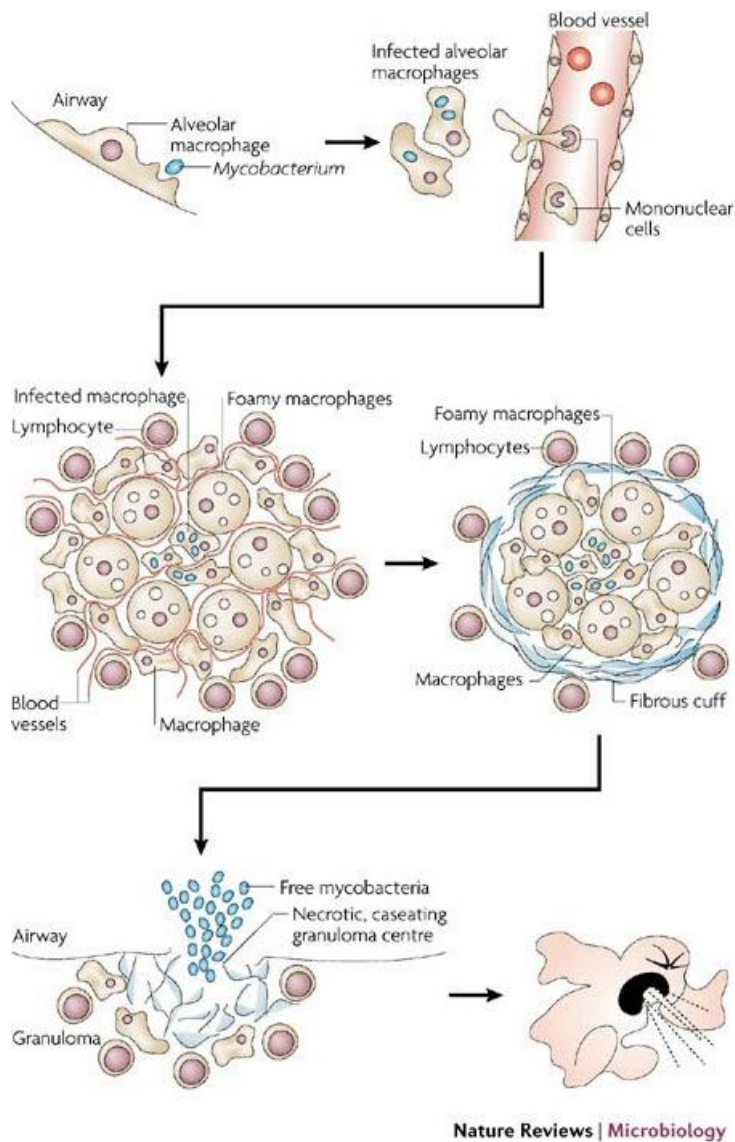
originando os granulomas (Algood et al., 2003; Flynn and Chan, 2005; Ulrichs and Kaufmann, 2006).

Os granulomas são lesões histopatológicas características da maioria das infecções micobacterianas. No curso da doença causada pelo *M. tuberculosis*, a formação do granuloma se caracteriza por ser um balanço entre o patógeno e o hospedeiro (Russell et al., 2002). Para o hospedeiro o granuloma representa uma tentativa de conter a disseminação da bactéria, por ser um ambiente pró-inflamatório com intenso recrutamento celular. Para o patógeno, as células recrutadas para o local podem ser hospedeiras em potencial para a sua sobrevivência e replicação. Contudo, ainda não está claro o estado de ativação do bacilo dentro dos granulomas. Flynn e Chan, hipotetizaram que a micobactéria pode estar em estado dormente (sem se replicar), se replicando ativamente porém sendo eliminada pelo sistema imune ativado, ou estar metabolicamente alterada, intercalando os ciclos replicativos (Flynn and Chan, 2001).

O granuloma é composto por diferentes tipos celulares. No fim do primeiro mês após a infecção com *M. tuberculosis*, pode ser observado um aumento das células CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺. Com a progressão da formação do granuloma, é possível encontrar macrófagos localizados em uma região central circundados por células T CD4⁺ e T CD8⁺, assim como um pequeno número de células B (Algood et al., 2003; Gonzalez-Juarrero et al., 2001). As células CD4⁺ encontram-se organizadas em conjuntos celulares e as células CD8⁺ podem ser observadas em menor quantidade na periferia do granuloma (Gonzalez-Juarrero et al., 2001). Os macrófagos possuem aparência ativada e podem se diferenciar em células epitelióides e/ou se fundirem se transformando em células multinucleadas também chamadas de células gigantes (Algood et al., 2003). Os macrófagos espumosos têm sido descritos tanto em situações clínicas quanto experimentais durante a infecção por micobactérias (Cardona and Ausina, 2000a; D'Avila et al., 2006; Hernandez-Pando et al., 1997; Ridley and Ridley, 1987). Tais macrófagos são caracterizados por possuírem grandes quantidades de corpos lipídicos também denominados corpúsculos lipídicos e parecem ter um importante papel durante a fase tardia da infecção.

Em uma fase avançada, o granuloma é caracterizado por uma neovascularização e o desenvolvimento de uma cápsula de fibras colágenas entre os macrófagos e os

linfócitos, células espumosas e células gigantes que delimitam o granuloma (Dheda et al., 2005; Ulrichs and Kaufmann, 2006). No próximo estágio, o centro do granuloma perde a sua vascularização e se torna necrótico (Russell, 2007). Cardona e col, sugerem que a aparente incapacidade dos linfócitos T em ativar os macrófagos espumosos favoreceria que os bacilos presentes no seu interior destruíssem essas células, alcançando o espaço alveolar e sendo expelidos para o meio (Cardona et al., 2003) (Esquema 2).



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

1.1.3) Resposta Imune inata

Para iniciar a resposta imune inata é necessário o reconhecimento e a adesão das micobactérias pelos fagócitos. Diversos receptores estão envolvidos neste reconhecimento, como os receptores de complemento, de manose, CD14, receptores *scavenger* e receptores do tipo toll (TLR) (Saiga et al., 2011; van Crevel et al., 2002), sendo responsáveis pela fagocitose do bacilo e/ou modulando a resposta do hospedeiro, via a síntese de citocinas e quimiocinas.

O reconhecimento de padrões moleculares na superfície da parede celular micobacteriana por receptores presentes em neutrófilos, macrófagos e células dendríticas é um evento crucial para desencadear a captura do microorganismo e o desenvolvimento de uma resposta imune inata e adaptativa.

O receptor de complemento (CR) 3 é considerado o principal receptor responsável pela internalização de micobactérias. Esse receptor que também é conhecido como integrina $\alpha_M\beta_2$, ou CD11b/CD18, é caracterizado por possuir uma superfície heterodimérica com vários sítios de ligação. E é descrito por ter um importante papel na fagocitose de micobactérias, tanto opsonizadas, quanto livres (Aderem and Underhill, 1999; Velasco-Velazquez et al., 2003).

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

Tem sido descrito que os receptores *scavenger* também têm um importante papel na internalização das micobactérias. Zimmerli e col observaram que, o bloqueio de MR e CR, não levou à uma inibição total da ligação do *M. tuberculosis* com os macrófagos (Zimmerli et al., 1996). Contudo, quando o receptor *scavenger* de classe A foi bloqueado após o bloqueio dos CR e MR, foi observada uma significativa inibição da ligação das micobactérias aos macrófagos. O receptor *scavenger* de classe B, CD36, também é requerido para a fagocitose de micobactérias (Philips et al., 2005). De

acordo, Neyrolles e col, observaram que o CD36 é importante para a fagocitose do *M.tuberculosis* em adipócitos (Neyrolles et al., 2006).

A literatura mostra que os receptores do tipo toll (TLR) também estão envolvidos no reconhecimento de micobactérias e são uma das principais armas do hospedeiro contra patógenos invasores.

Esses receptores fazem parte de uma família de pelo menos 13 receptores (Nilsen et al., 2008). O primeiro receptor da família toll foi identificado em *Drosophila melanogaster* como um componente da via de sinalização celular responsável pela imunidade contra infecções fúngicas (Hashimoto et al., 1988; Lemaitre et al., 1996). Após a identificação de uma família de proteínas similares ao toll de drosófilas em mamíferos, esses receptores foram então denominados “Toll-Like Receptors” (Rock et al., 1998). Os membros da família dos TLR são caracterizados por serem proteínas transmembranares, que contém motivos repetidos ricos em leucina no seu domínio extracelular, similar a outras proteínas de reconhecimento do sistema imune, e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de IL-1 dos mamíferos (TIR) (Gay and Keith, 1991). Os TLR agem através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), desencadeando a sinalização intracelular via TIR que após a associação com proteínas adaptadoras como o MYD88, TRIF, TIRAP ou TRAM ativam diferentes fatores de transcrição como, NF-kb, IRF3, IRF5 e IRF7 induzindo a expressão de uma variedade de citocinas, quimiocinas, moléculas co-estimulatórias e interferon (IFN), importantes para a resposta adaptativa (Akira and Hoshino, 2003; Hemmi et al., 2002; Kawai and Akira, 2005; Kobe and Deisenhofer, 1995; Medzhitov and Janeway, 1997).

A vasta literatura tem mostrado o reconhecimento de micobactérias, assim como o de componentes da sua parede na sinalização celular e modulação da resposta inflamatória induzida por TLR. Gilleron e col, demonstraram que tanto a lipoarabinomanana (LAM), quanto do mio-inositol manosídeo (PIM), importantes constituintes da parede celular micobacteriana, estão envolvidos no reconhecimento e ativação celular na resposta inata contra micobactérias de forma dependente do TLR2 (Gilleron et al., 2003). A produção de citocinas pró-inflamatórias na infecção *in vitro* por BCG em macrófagos é dependente de TLR2, mas não de TLR4 (Heldwein et al., 2003). Corroborando com esses dados, macrófagos deficientes de TLR2 infectados com

M.tuberculosis não são capazes de expressar o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II diferente do observado em macrófagos deficientes de TLR4 (Reiling et al., 2002). Dados do nosso grupo mostraram ainda que o TLR2, mas não o TLR4 está envolvido na migração celular induzida por BCG (D'Avila et al., 2007). A migração de eosinófilos, assim como a produção de eotaxina também foi drasticamente inibida em animais deficientes de TLR2 durante a infecção por BCG (D'Avila et al., 2007).

Outra molécula micobacteriana dependente da ativação do TLR2 é a lipoproteína purificada de 19kDa, que quando reconhecida pelo receptor desencadeia a ativação de NF- κ b e a secreção de interleucina (IL)-12 (Brightbill et al., 1999). De maneira interessante, o ManLan é capaz de ativar o NF- κ b, contudo de uma maneira independente de TLR2 e TLR4, sugerindo a participação de moléculas acessórias e/ou co-receptores no reconhecimento da micobactéria (Morris et al., 2003). Estudos com um outro componente micobacteriano, o fator de tuberculose solúvel (STF), sugere uma interação funcional entre TLR2 e TLR6 para que haja a ativação celular (Bulut et al., 2001). De fato, a formação de dímeros com TLR2, como TLR1/2 e TLR2/6, tem sido descrita na superfície celular e são capazes de reconhecer lipídios da membrana microbiana (Akira, 2006). Além disso, os TLRs podem se associar com moléculas acessórias e/ou co-receptores, como por exemplo CD14 (Compton et al., 2003).

O CD14 é uma proteína ancorada a um glicosilfosfatidilinositol (GPI) encontrado na superfície celular de monócitos e macrófagos (Hoheisel et al., 1995; Pauligk et al., 2004; Schluger and Rom, 1998). Alguns estudos têm demonstrado a capacidade do CD14 em interagir com vários TLRs durante infecções bacterianas e virais, resultando na síntese de citocinas (Compton et al., 2003; Pauligk et al., 2004). Ainda, tem sido demonstrado que a ligação do CD14, tanto com TLR2, quanto com o TLR4, não é dependente de ligante (Schmitz and Orso, 2002). Além disso, Peterson e col e Pugin e col, descreveram o reconhecimento do LAM de *M. tuberculosis* via CD14 desencadeando o processo de fagocitose em macrófagos e síntese de IL-8 (Peterson et al., 1995; Pugin et al., 1994).

O reconhecimento e/ou fagocitose micobacteriana induz a síntese de uma seqüência de citocinas e quimiocinas envolvidas na resposta inflamatória. Foi observado, em modelos *in vivo* e *in vitro*, a capacidade do *M. tuberculosis* em induzir

quimiocinas como RANTES, quimioatraentes para células T, eosinófilos e basófilos, as proteínas quimiotáticas de monócito (MCP)-1, MCP-3 e MCP-5 e a proteína inflamatória de macrófagos (MIP)- α e MIP2 (Orme and Cooper, 1999; Rhoades et al., 1995). Esses dados foram confirmados por estudos *in vitro* utilizando macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis*, onde foram produzidos RANTES, MCP-1 e MIP- α . No mesmo estudo, foi observada a síntese de IL-8, citocina responsável pelo recrutamento e ativação de neutrófilos, células de fundamental importância como primeira linha de defesa do hospedeiro (Sadek et al., 1998). Lipoarabinomanana (LAM), lipomanana (LM), e mio-inositol manosídeo (PIM) também têm sido descritos como poderosos indutores de IL-8 (Riedel and Kaufmann, 1997; Wickremasinghe et al., 1999; Zhang et al., 1995). Além disso, tem sido descrito que a depleção de neutrófilos em camundongos C57Bl/6 favorece a infecção pela micobactéria patogênica *M. avium* (Appelberg et al., 1995).

Peters e col, demonstraram que camundongos deficientes para o receptor para MCP-1 (CCR2 $-/-$) são capazes de recrutar menos macrófagos para o pulmão durante a infecção por *M. tuberculosis* do que os animais selvagens, demonstrando serem mais susceptíveis a infecção (Peters et al., 2001). No mesmo estudo, foi observado um impressionante aumento no número de unidade formadora de colônias (UFC) nos animais deficientes para MCP-1, quando comparados com os animais selvagens. Além disso, o MCP-1 é uma citocina de perfil pró-inflamatório responsável não só pela migração de macrófagos, mas também pela quimiotaxia de linfócitos T de memória e células NK para o sítio de inflamação.

Outra citocina pró-inflamatória produzida por monócitos e macrófagos quando expostos aos produtos do *M. tuberculosis* com uma importante função de conter a infecção é o (TNF)- α . Ele é responsável por ativar os macrófagos e estimular a produção da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2), importante para que o bacilo seja morto (Ding et al., 1988; Flesch et al., 1994). Experimentos utilizando camundongos deficientes em TNF- α e do receptor de TNF (TNFR) apresentaram um aumento na suscetibilidade ao *M. tuberculosis*, além de prejudicar a formação do granuloma (Bean et al., 1999; Flynn et al., 1995). Utilizando-se inibidores para o TNF- α foi confirmado o envolvimento dessa citocina no desenvolvimento da doença, uma vez que foi observada uma maior suscetibilidade à doença nos animais tratados, além do aumento

da reativação da doença nos pacientes com a tuberculose na forma latente (Means et al., 2001).

Diante da infecção por *M. tuberculosis*, os macrófagos e células dendríticas desempenham diferentes papéis. Enquanto os macrófagos possuem um papel mais efetivo na proteção do hospedeiro, com mecanismos anti-microbianos eficientes e secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, as células dendríticas são as responsáveis por ativar a resposta imune adaptativa via células T.

1.1.4) Resposta imune adaptativa

Assim que é ativada pelo *M. tuberculosis*, a célula dendrítica induz a síntese de IL-12, seguida pelo aumento da expressão de MHC-II, importante para a apresentação de antígenos para as células T (Michelsen et al., 2001; Thoma-Uszynski et al., 2000a; Thoma-Uszynski et al., 2000b; Tsuji et al., 2000). É importante ressaltar que outras células fagocíticas como monócitos, macrófagos e neutrófilos também são responsáveis por secretar IL-12 após a fagocitose do *M. tuberculosis* (Cooper et al., 2002; Trinchieri, 2003). A IL-12 é uma importante citocina indutora de uma resposta adaptativa de perfil T *helper* (Th)1, e principal resposta para o controle da infecção por *M. tuberculosis* (Flynn and Chan, 2001). Alguns estudos mostraram que tanto o linfócito T CD4+, quanto o T CD8+ são importantes para o controle da infecção por *M.tuberculosis*, apesar das células TCD4+ estarem em maior quantidade nos sítios de infecção (Peters et al., 2001; Randhawa, 1990). Alguns estudos mostram que o tratamento com IL-12 exógeno aumenta a resistência ao bacilo (Cooper et al., 1997) e que animais deficientes tanto em IL-12(p40), quanto em IL-12(p35) são mais suscetíveis à infecção (Berrington and Hawn, 2007). Além disso, tem sido descrito que a IL-12 possui um importante papel estimulando a produção de IFN- γ , sendo fundamental no controle da tuberculose (Trinchieri, 2003).

O IFN- γ é uma importante citocina para a proteção do hospedeiro. Ela pode ser produzida pelas células T CD4+, T CD8+ e células NK nos animais infectados (Raja, 2004). O IFN- γ estimula a produção da enzima óxido nítrico sintase (NOS) em resposta à infecção micobacteriana (Feng et al., 2006; Flynn and Chan, 2001). Além de ser capaz de ativar macrófagos induzindo a expressão de intermediários reativos de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (Flesch and Kaufmann, 1987). Tem sido descrito que o aumento da resistência à infecção dos animais tratados com IL-12 é inibido quando os animais são deficientes em IFN- γ (Flynn et al., 1995). Estudos demonstraram que o *M.tuberculosis* é capaz de inibir a via de sinalização ativada pelo IFN- γ evitando que os macrófagos sejam ativados de maneira adequada (Ting et al., 1999).

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

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

1.1.5) Mecanismos de escape

O *M. tuberculosis* é um dos patógenos intracelulares de maior sucesso quanto à habilidade de sobrevivência dentro dos fagócitos. A capacidade desse patógeno sobreviver e replicar nas células do hospedeiro tem sido relacionada a mecanismos de escape do sistema imune através de uma série de estratégias para modular as células do hospedeiro.

Após a fagocitose, o fagossomo formado adquire uma série de proteínas (como as Rab5, p150 e PI3K), advindas de vesículas da via endocítica denominadas endossomas primários por um mecanismo denominado “Kiss and run” (Desjardins, 1995). Com a progressão da via endocítica, há a troca de proteínas do fagossomo primário por proteínas características do fagossomo secundário (LAMP, Rab7 e RILP). A RILP (*rab-interecting lysosomal protein*) é a proteína efetora da Rab7, que faz a ligação entre a Rab 7 ativada (GTPase) e o complexo motor dineína-dinactina, promovendo o movimento centrípeto entre os fagossomas e lisossomas (Harrison et al., 2003; Jordens et al., 2001). Nesse momento, os microorganismos fagocitados estão sujeitos a um importante mecanismo altamente regulado, a degradação por hidrolases ácidas, (conforme demonstrado no Esquema 3) (Flannagan et al., 2009; Koul et al., 2004; Stenmark, 2009).

O *M. tuberculosis*, possui como importante mecanismo de sobrevivência intracelular a capacidade de inibir a acidificação fagossomal, sendo esse mecanismo fundamental para impedir a destruição do patógeno e o controle da doença. Alguns autores têm sugerido hipóteses para este evento. Vergne e col, demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de inibir a formação do fagolisossomo através da secreção de uma fosfatase chamada SapM, que atua hidrolizando o PI3P (fosfatidilinositol 3 fosfato) da membrana fagossomal, o que impede o ancoramento do fagossomo secundário com o lisossomo (Vergne et al., 2005), uma vez que é necessário a presença desse lipídio na forma fosforilada para que esse evento ocorra.

Hipóteses sobre os possíveis mecanismos de sobrevivência intracelular do bacilo também envolvem componentes da parede micobacteriana. Existem evidências de que o LAM, componente da parede de *M. tuberculosis*, é capaz inibir o influxo de cálcio

citosólico (Vergne et al., 2003). Tal processo é importante para a maturação fagossomal, pois o cálcio ativa o complexo $Ca^{++}/$ calmodulina quinase II que é responsável pelo recrutamento da proteína (EEA1) (do inglês, early endosome antigen 1) através da interação da PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase) com a calmodulina (Fratti et al., 2003). E, essas proteínas efetoras da pequena GTPase Rab 5, são em conjunto responsáveis pelo ancoramento de vesículas endossomais. Essas vesículas da via endocítica são responsáveis pela troca de proteínas, como a troca da Rab 5 pela Rab 7, da membrana fagossomal durante o curso de sua maturação. Esses resultados concordam com dados prévios da literatura, que descreveram a capacidade do *M. bovis* (Via et al., 1997) e *M. tuberculosis* (Fratti et al., 2001) em reter a Rab 5 (marcador de endossomo primário), não adquirindo a Rab 7, necessária para o ancoramento do fagossoma secundário com o lisossoma. Esses dados contribuem para a hipótese de que o LAM pode estar participando do processo de inibição da formação do fagolisossoma.

A ausência de determinados componentes da parede micobacteriana tem sido amplamente correlacionada com a diminuição da virulência do patógeno. Através de estudos com *M. tuberculosis* deficiente na síntese de moléculas de superfície específicas, tem sido sugerido que a parede celular do patógeno é um importante fator para a sobrevivência deste dentro da célula hospedeira (Glickman et al., 2000; Makinoshima and Glickman, 2005). Estudos *in vitro* também demonstraram a produção de grandes quantidades de amônia nos sobrenadantes de culturas infectadas com *M. tuberculosis*, podendo ser o fator responsável pela inibição da fusão do fagolisossomo, uma vez que o cloreto de amônia afeta o movimento dos lisossomos, assim como alcaliniza o compartimento lisossomal (Gordon et al., 1980; Hart et al., 1983). Sturgill-Koszycki e col ainda observaram que o *M. tuberculosis* pode estar modulando o compartimento fagossomal impedindo a sua maturação, devido a ausência da molécula de próton-ATPase; contudo, o mecanismo para que isso ocorra ainda é desconhecido (Sturgill-Koszycki et al., 1994).

A presença de colesterol no fagossoma micobacteriano também tem sido descrita como importante fator para a prevenção da maturação fagossomal (Gatfield and Pieters, 2000; Jayachandran et al., 2007). Ainda, Gatfield e Pieters observaram que vacúolos contendo micobactérias possuem uma grande quantidade de colesterol e que

a depleção do colesterol em macrófagos antes da infecção torna as células susceptíveis a infecção (Gatfield and Pieters, 2000). O colesterol tem se mostrado essencial para a interação dos fagossomas com a proteína do hospedeiro Coronina-1, também conhecida como P57 ou *tryptophan-aspartate-containing coat protein* (TACO). Essa proteína é expressa exclusivamente em leucócitos e está presente somente em fagossomas de macrófagos infectados com a bactéria viva (de Hostos, 1999; Ferrari et al., 1999; Nguyen and Pieters, 2005). Durante o estímulo de macrófagos com a bactéria morta, a coronina 1 é rapidamente dissociada do fagossomo seguida da fusão com os lisossomas e degradação da micobactéria (Ferrari et al., 1999; Tailleux et al., 2003). Além disso, a infecção por micobactéria nas células de Kupffer, macrófagos do fígado que não expressam coronina-1, são capazes de destruir efetivamente as micobactérias. Ainda, tem sido descrito que o colesterol das células hospedeiras pode estar funcionando como importante fonte de carbono para as micobactérias (Pandey and Sassetti, 2008) (Esquema 3).

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

De fato, tem sido descrito que uma grande parte do genoma do *M. tuberculosis* é direcionado para a produção de moléculas envolvidas com a síntese de lipídios (Cole et al., 1998) e o papel dos lipídios durante a infecção micobacteriana tem sido relacionado com a sobrevivência da micobactéria no interior de células do hospedeiro. Uma vez a bactéria estando em um ambiente com escassez de nutrientes como os fagossomas, eles se tornam restritos aos ácidos graxos como sua fonte de carbono. McKinney e col, identificaram o gene *icl1*, que codifica a enzima isocitrato liase ativando a via de glioxilato, a qual facilita a retenção de carbono através da síntese *de novo* de

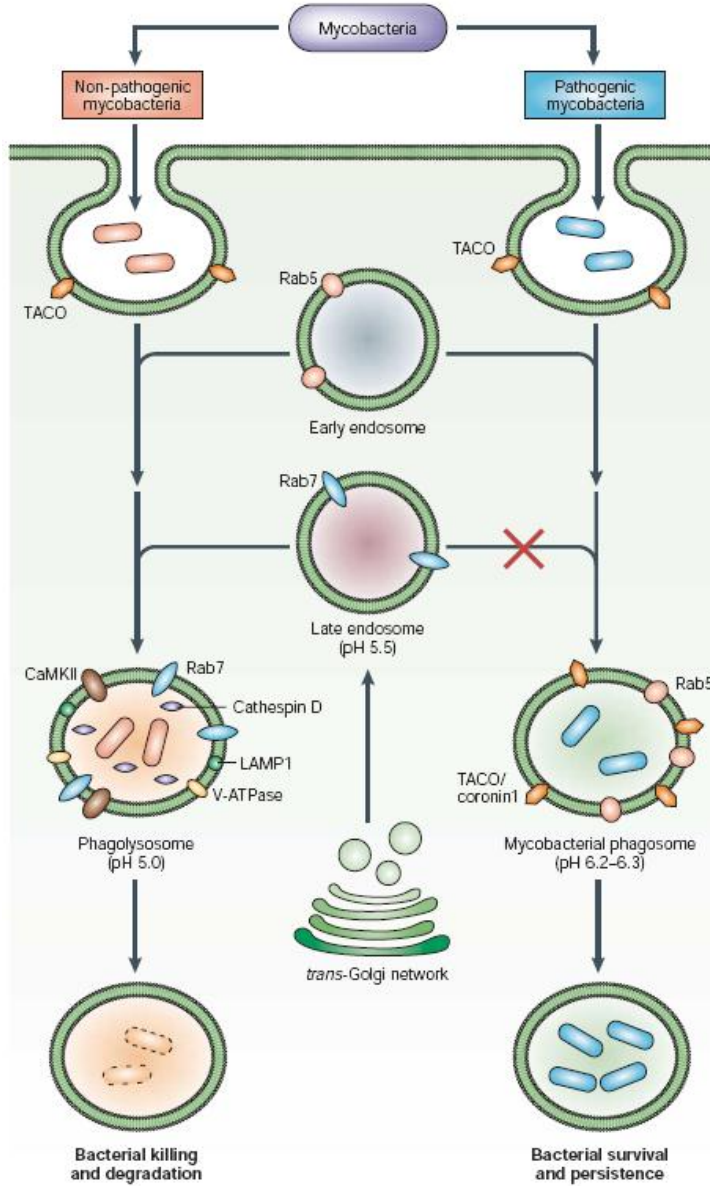
carboidrato (Honer zu Bentrup and Russell, 2001). O *M. tuberculosis* possui 2 genes que codificam essa enzima. Tem sido descrito que deleção desses 2 genes impede a replicação intracelular, resultando na eliminação do patógeno pelos pulmões (Munoz-Elias and McKinney, 2005). Esses resultados sugerem que a via da isocitrato liase é essencial para que o *M. tuberculosis* se estabeleça na infecção. É importante ressaltar ainda, que o que é alimento para o hospedeiro pode representar também uma fonte acessível de nutrientes para o patógeno (Russell, 2003).

A indução de apoptose em leucócitos tem sido considerado um outro mecanismo de escape que pode estar envolvido na sobrevivência e replicação micobacteriana durante a infecção. Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao sítio infeccioso iniciando a resposta imune contra a tuberculose. Apesar de vários estudos indicarem a eficiência dos neutrófilos em matar *M. tuberculosis* (Brown et al., 1987; Jones et al., 1990), a literatura mostra que os neutrófilos não são eficazes no controle da tuberculose em animais susceptíveis (Eruslanov et al., 2005).

Embora a literatura tenha mostrado o papel da apoptose de leucócitos como um mecanismo programado para a eliminação do bacilo infeccioso, uma vez que o meio intracelular é o local de replicação do *M. tuberculosis* (Keane et al., 1997; Rojas et al., 1997), o papel da apoptose durante a infecção ainda é contraditório. Aleman e col, observaram que a infecção por *M. tuberculosis* acelera a apoptose de neutrófilos (Aleman et al., 2002). Tem sido descrito que a apoptose de linfócitos e macrófagos pode estar favorecendo o crescimento micobacteriano uma vez que são pouco eficientes em destruir o bacilo (Eruslanov et al., 2005). Esse dado é interessante, pois a fagocitose de células apoptóticas é um processo fisiológico caracterizado pela remoção das células mortas antes destas liberarem o seu conteúdo citotóxico causando inflamação e dano nos tecidos. Antony e col, observaram a presença de neutrófilos infectados no citoplasma de macrófagos de coelhos infectados por BCG, sugerindo que esses poderiam estar atuando como carreadores do bacilo viável para o interior de macrófagos (Antony et al., 1985).

Os neutrófilos apoptóticos apresentam altos níveis de fosfatidilserina na sua membrana plasmática permitindo a sua identificação. Alguns receptores têm sido descritos no reconhecimento e fagocitose das células apoptóticas, como o receptor de vitronectina ($\alpha\beta 3$), trombospondina e o CD36 (Fadok et al., 1992; Savill et al., 1990;

Savill et al., 1991). O CD36 é um receptor *scavenger* de classe B que está envolvido em várias funções biológicas, como o transporte de ácidos graxos, inflamação, aterosclerose, fagocitose de micobactérias e de células apoptóticas (Febbraio et al., 2001). Além disso, o reconhecimento de células apoptóticas pelo CD36 induz a síntese de IL-10 e diminui a síntese de TNF- α , IL-1 e IL-12 em monócitos previamente estimulados por LPS (Voll et al., 1997). De maneira semelhante, Huynh e col observaram que a exposição de fosfatidilserina pelas células apoptóticas induz a síntese da citocina anti-inflamatória TGF- β , suprimindo a produção de mediadores pró-inflamatórios (Huynh et al., 2002). Sugerindo um papel para os neutrófilos apoptóticos na modulação negativa das células do hospedeiro e dessa forma favorecendo a infecção.



Esquema 3. Comparação entre a formação dos fagossomas de micobactérias patogênicas e não-patogênicas. Diferenças na composição protéica dos fagossomas resultando na inibição da maturação fagossomal pelas micobacterias patogênicas. Esquema de Koul et. al., 2004.

1.2) Corpúsculos lipídicos

1.2.1) Estrutura e composição dos corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos, também chamados de gotas lipídicas ou adipossomos puderam ser observados por centenas de anos nos tecidos adiposos através da microscopia de luz e colorações histológicas clássicas (Daddi, 1896). Nessa época, pensava-se nessas organelas somente como importante fonte de energia em situações de limitado fornecimento de nutrientes ou mais recentemente como locais de estoque de ácidos graxos livres a fim de evitar a formação de lipídios reativos capazes de promover eventualmente a morte celular (Kusminski et al., 2009). A observação da presença dessas organelas em tipos celulares não-adipocíticos só foi possível com o desenvolvimento de colorações específicas, uma vez que o álcool presente na maioria das técnicas de coloração é responsável pela dissolução dos corpúsculos lipídicos.

Dessa maneira, foi observado a presença dessa organela em virtualmente todos os organismos incluindo plantas, fungos, procariotos e células animais de mamíferos e não-mamíferos (Bozza et al., 2007; Christiansen and Jensen, 1972; Clausen et al., 1974; Roessler, 1988; Rubin and Trelease, 1976).

Os corpúsculos lipídicos possuem forma globular e seu número e tamanho podem variar de acordo com o tipo celular e com o estado de ativação celular. É constituído por uma membrana atípica osmiofílica e elétron-densa. Análises por crioeletron microscopia de corpúsculos lipídicos isolados demonstraram que a sua superfície era formada por uma membrana atípica, possuindo uma única fila elétron densa de átomos fósforos com a cabeça de fosfolipídios. Em contraste com as duas linhas paralelas que são vistas nas membranas celulares (Tauchi-Sato et al., 2002).

Essas organelas são constituídas principalmente por lipídios neutros, com maioria de triglicerídeos e ésteres de colesterol (Murphy, 2001; Ohsaki et al., 2006; van Meer, 2001). Contudo, quando analisados diferentes tipos celulares, estímulos, ou diferentes tempos de estudo, os corpúsculos podem apresentar o seu interior com diferentes aspectos osmiofílicos, podendo variar entre elétron-densos e elétron-lúcidos (Esquema 4) (Dvorak and Monahan-Early, 1992; Dvorak et al., 1992; Dvorak et al., 1993; Galli et

al., 1985; Melo et al., 2003; Weller et al., 1991a). Essa característica pode ser atribuída as diferentes composições lipídicas encontradas nos corpúsculos lipídicos, podendo ser relacionada a especificidade dessa organela com a atividade celular (Bozza et al., 2007).

Além da sua constituição lipídica, os corpúsculos lipídicos apresentam uma variada composição protéica. As principais proteínas descritas relacionadas com os corpúsculos são as proteínas estruturais da família das perilipinas, também denominadas como proteínas PAT. Constituídas pela perilipina, proteína relacionada a diferenciação de adipócitos (ADRP, também denominada adipofilina em humanos) e a “tail-interacting protein” de 47kDa (TIP47), estima-se que essas proteínas são responsáveis em revestir 15% da superfície dos corpúsculos lipídicos (Londos et al., 1999).

Apesar do papel das proteínas PAT não estar totalmente compreendido no contexto dos corpúsculos lipídicos, sabe-se que em adipócitos em condição de repouso a perilipina pode estar funcionando como uma proteção contra lipases citosólicas (Londos et al., 1995). A TIP47 tem sido descrita essencial para o estoque e metabolismo de lipídios (Londos et al., 2005). A proteína que tem sido melhor estudada, a ADRP, tem sido considerada um eficiente transportador de ácidos graxos livres (Atshaves et al., 2001; Gao and Serrero, 1999; Serrero, 2000), ligante de colesterol (Atshaves et al., 2001) e envolvida no empacotamento de lipídios neutros nos corpúsculos lipídios (Brasaemle et al., 1997), além de parecer diretamente envolvida na biogênese dessas organelas (Robenek and Severs, 2009). Ela vem sendo descrita como uma proteína específica para a marcação de corpúsculos lipídicos (Brasaemle et al., 1997; D'Avila et al., 2006; Heid et al., 1998; Vieira-de-Abreu et al., 2005).

Estudos de proteômica identificaram até agora mais de 200 proteínas diferentes nos corpúsculos lipídicos de células de mamíferos (Hodges and Wu). Além das proteínas PAT e proteínas relacionadas com o metabolismo, estoque e homeostasia de lipídios (Acetil-coenzima A carboxilase, proteína CGI, ligase de ácido graxo de cadeia longa, CGI-58), têm sido encontradas proteínas originalmente conhecidas na sinalização (PKC, Ras, MAPK), proteínas do citoesqueleto (actina e filamina A), do retículo endoplasmático e diversas proteínas envolvidas no tráfego de vesículas

(Snares, proteínas vps e Rabs) (Bartz et al., 2007; Bozza et al., 2009b; Hodges and Wu, ; Lass et al., 2006; Wan et al., 2007).

As proteínas Rab são reguladoras do tráfego vesicular e da interação com organelas. Oseki e col mostraram que a Rab18 é importante para a interação dos corpúsculos lipídicos com o retículo endoplasmático em células HepG2 (Ozeki et al., 2005). Ainda não se sabe o papel das outras proteínas da família das Rab encontradas nos corpúsculos lipídicos. Contudo, investigando a presença dessas proteínas nos corpúsculos lipídicos, 7 autores demonstraram a presença da Rab7 e 4 demonstraram a presença da Rab5 nos corpúsculos lipídicos em diferentes tipos celulares (Hodges and Wu). De maneira interessante, nas células A431 e U937 foi observada a presença da Rab7 mas não a Rab5 (Umlauf et al., 2004; Wan et al., 2007) e o oposto foi observado em relação a célula HuH7 (Fujimoto et al., 2004). Isso sugere que os corpúsculos lipídicos apresentam composição protéica diferentes, podendo variar de acordo com o estado de ativação da célula, assim como o tipo celular.

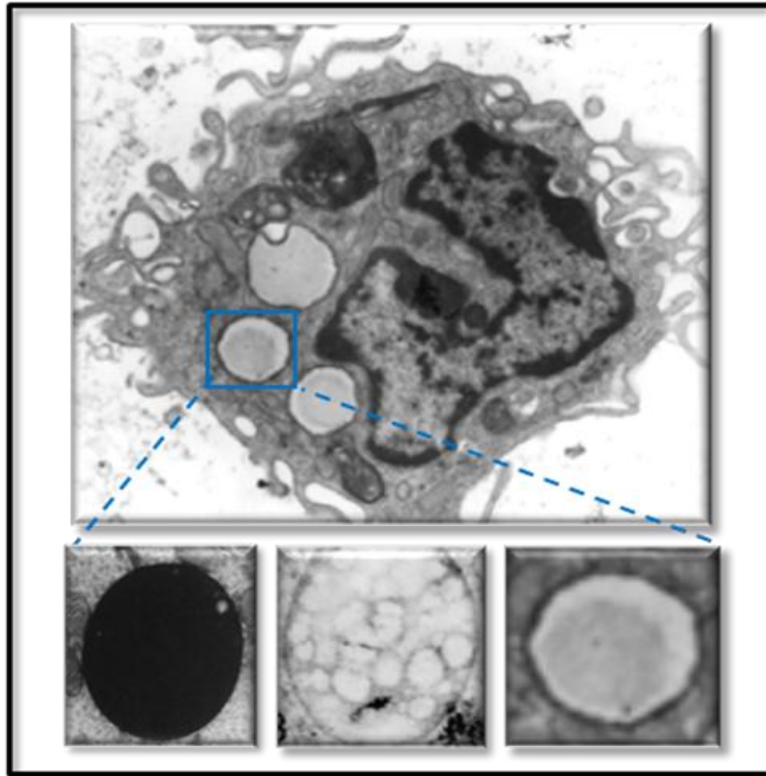
Algumas enzimas também tem sido descritas localizadas nos corpúsculos lipídicos. A compartimentalização de PLA₂ citosólica nos corpúsculos lipídicos assim como MAPK, ERK1/2 e p38 (Yu et al., 1998; Yu et al., 2000), quinases responsáveis pela ativação do PLA₂ citosólica, corroboram com dados que mostram a localização do ácido araquidônico (AA) hidrolisado nessas organelas (Dvorak et al., 1983). Proteínas envolvidas com a sinalização intracelular como a PKC e PI3K também foram encontradas nos corpúsculos lipídicos de leucócitos, contudo é necessário mais estudos sobre o seu papel nessas organelas (Chen et al., 2002; Yu et al., 2000).

Além da síntese de AA livre a partir da fosfatidilcolina dos corpúsculos lipídicos (yu 1998), Weller e col demonstraram que o AA exógeno pode ser incorporado pelos corpúsculos lipídicos de eosinófilos (Weller and Dvorak, 1985).

Muitos estudos têm descrito a co-localização de enzimas responsáveis pela síntese de eicosanóides a partir do AA dos corpúsculos lipídicos, como a 5-lipoxigenase (5-LO), leucotrieno sintase (LTC₄) e ciclooxygenase (Bozza et al., 1998; Bozza et al., 1997; Dvorak and Monahan-Early, 1992; Dvorak et al., 1992; Dvorak et al., 1993; Pacheco et al., 2002). Essas evidências indicam que os corpúsculos lipídicos possuem os componentes necessários para que o AA esterificado em fosfolipídios e lipídios

neutros possam ser metabolizados em eicosanóides. Fenômeno que pode ser observado em diversos processos inflamatórios e/ou infecciosos nessas organelas.

Também tem sido observada a presença de quimiocinas como RANTES, que normalmente é secretada por células T, IL-16 (Bandeira-Melo et al., 2002; Lim et al., 1996) fatores de crescimento (Dvorak et al., 2001) e citocinas como o TNF encontradas em corpúsculos lipídicos de leucócitos ativados (Pacheco et al., 2002). Ainda não se sabe se essas citocinas são liberadas dos corpúsculos lipídicos devido a ausência de uma membrana típica, necessária para a exocitose via “snares” ou pela fusão dessas organelas com a membrana plasmática. Se hipotetiza que elas possam estar funcionando como mediadores intracrininos. Dessa maneira, mais estudos se tornam necessários a fim de esclarecer o papel das citocinas encontradas nos corpúsculos lipídicos.



Esquema 4. Imagem ultra-estrutural dos corpúsculos lipídicos. As diferenças de elétron densidade sugerem diferentes composições lipídicas dos corpúsculos lipídicos. Característica relacionada com a dose, tempo, estímulo, assim como do tipo celular analisado. Figura de D'Avila et. al., 2006.

1.2.2) Biogênese dos Corpúsculos lipídicos

Alguns modelos têm sido propostos para explicar a biogênese dos corpúsculos lipídicos como os modelos de “brotamento”, “porta ovos” e “enovelamento” (Esquema 5).

O modelo mais aceito é o do “brotamento”. Essa hipótese associa a presença de enzimas responsáveis pelo metabolismo lipídico acumuladas no retículo endoplasmático (RE) com o acúmulo de lipídios neutros entre as duas folhas da membrana do RE. Após alcançarem determinado volume, os corpúsculos brotam em direção ao citosol carregando uma hemi-membrana proveniente da face citosólica da membrana do RE (Brown, 2001; Martin and Parton, 2006; Murphy, 2001; Robenek et al., 2004).

Contudo, Robenek e col, utilizando a técnica de citoquímica em criofratura, (“Freeze-fracture cytochemistry”) observaram a deposição da ADRP contornando uma pequena área da membrana externa do RE. E, de acordo com as suas observações ele propôs o modelo do “porta ovos” sugerindo que o corpúsculo se originaria ao lado e não dentro do RE. A membrana do RE com a ADRP formaria um cálice onde lipídios sintetizados no RE seriam transferidos para os corpúsculos lipídicos (“ovos”) em formação (Robenek et al., 2006).

O modelo mais recente proposto é o modelo de “enovelamento” que associa a presença da monocamada de fosfolipídios advindos do RE, com a incorporação de domínios membranosos do RE contendo lipídios neutros e proteínas. Essa teoria é baseada na visualização da 5-LO por microscopia eletrônica através de imunomarcção com partículas de ouro, onde essa enzima estava distribuída no interior dos corpúsculos lipídicos, e foi observada uma estrutura interna no formato de colméia (Bozza et al., 1997). Wan e col observaram, além da presença dessas membranas internas, ribossomos na periferia e no interior dos corpúsculos lipídicos (Wan et al., 2007).

A limitação das técnicas disponíveis hoje impossibilita maiores avanços em relação a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Contudo, torna-se cada vez mais evidente que o RE possui importante papel na formação dessas organelas, não só pela

proximidade entre eles, como pelo compartilhamento de enzimas caracteristicamente encontradas nos RE, como a acil-CoA: colesterol aciltransferase (ACAT) e a acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT2) (Chang et al., 2001; Kuerschner et al., 2008; Smith et al., 2000).

Uma outra estratégia utilizada a fim de elucidar a formação do corpúsculos lipídicos tem sido investigar os mecanismos envolvidos na ativação e sinalização intracelular além das diferentes vias moleculares que possam desencadear a sua formação. Weller e col, observaram que ácido oléico e AA (ácidos graxos insaturados), mas não os saturados como o ácido palmítico, foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em neutrófilos em um mecanismo dependente da ativação de PKC (Weller et al., 1989; Weller et al., 1991b). Ainda, foi demonstrado que o ácido graxo análogo da AA, o ácido araquidônico trimetil cetona mesmo sendo um inibidor da PLA citosólica, foi capaz de induzir formação dos corpúsculos (Bozza and Weller, 2001).

O fator de ativação plaquetária (PAF), assim como agonistas de PAF, são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em um mecanismo dependente da ativação de uma proteína G acoplada ao receptor que subsequente mente leva a ativação da enzima 5-LO gerando o ácido 5-(S)-hidroxieicosatetraenoico (5-HETE) induzindo a ativação do receptor acoplado a proteína G e a ativação da PKC (Bozza et al., 1996a). Os autores mostraram também que outros agonistas da proteína G acoplada ao receptor como IL-8, C5a e LTB₄ não foram capazes de induzir a formação dos corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 1996a). Além disso, quando usado o análogo de PAF, o liso-PAF, não há a formação de corpúsculos lipídicos, pois apesar deles terem a mesma estrutura lipídica, ele não se liga ao receptor, sendo dessa forma um evento mediado por receptor (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997; de Assis et al., 2003; Prescott et al., 2000).

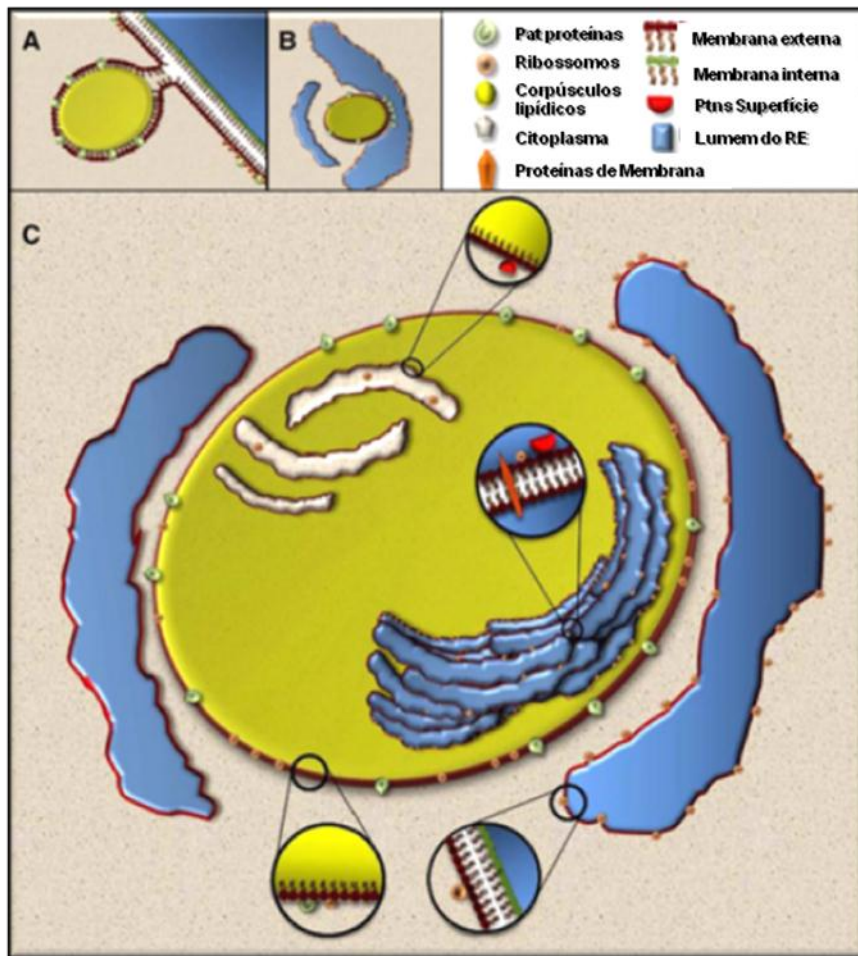
A formação de corpúsculos lipídicos também pode ser evidenciada em leucócitos após a estimulação com lipoproteína de baixa densidade oxidada (oxLDL), mas não quando utilizada a LDL nativa (de Assis et al., 2003). Heery e col demonstraram que a oxLDL possui fragmentos fosfolípidios capazes de ativar o receptor do PAF (Heery et al., 1995). Nosso grupo tem documentado que estes constituintes, quando injetados na pleura de camundongos, induzem uma rápida migração de neutrófilos, monócitos e

eosinófilos para a cavidade, assim como a formação de corpúsculos lipídicos (Silva et al., 2002), sendo esse mecanismo bloqueado quando utilizados antagonistas para o receptor de PAF ou PAF acetilhidrolase (de Assis et al., 2003). Além disso, oxLDL, agonistas de PAF ou o fator de crescimento de colônias para granulócitos (G-CSF), quando combinados com BRL 49653 ou rosiglitazona (ambos ligantes específicos de PPAR) são capazes de potencializar a formação de corpúsculos lipídicos, sugerindo que receptores nucleares como o PPAR, que são ativados por lipídios, estão envolvidos durante na indução dessas organelas (de Assis et al., 2003; Inazawa et al., 2003). Corroborando com esses resultados, estudos têm demonstrado um papel para o PPAR modulando a transcrição do gene da ADRP em diferentes tipos celulares, incluído macrófagos (Targett-Adams et al., 2005; Wei et al., 2005).

Algumas citocinas e quimiocinas também tem sido descritas envolvidas na formação de corpúsculos lipídicos em uma sinalização dependente de receptor. Bandeira-Melo e col demonstraram que RANTES, eotaxina-2 e eotaxina-3 iniciaram a sinalização intracelular induzindo a formação de corpúsculos lipídicos via o receptor CCR3 em eosinófilos (Bandeira-Melo et al., 2001a; Bandeira-Melo et al., 2001b) . Em modelos de inflamação alérgica, anticorpos neutralizantes para eotaxina, RANTES, ou eotaxina e o receptor para RANTES, CCR3, além de um inibidor específico para PGD₂, foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos (Mesquita-Santos et al., 2006; Vieira-de-Abreu et al., 2005). De maneira diferente da sinalização por PAF, eotaxina e RANTES induziram a formação de corpúsculos lipídicos dependente da ativação de quinases PI3K, p38 e ERK1/2 (Bandeira-Melo et al., 2001a). Alguns estudos também demonstraram o aumento no número de corpúsculos lipídicos induzidos por IL-5 sozinha assim como combinado com GM-CSF mesmo na ausência de lipídios exógenos (Bartemes et al., 1999; Bozza et al., 1998). A proteína MCP-1 também está envolvida na biogênese dos corpúsculos lipídicos. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que corpúsculos lipídicos são induzidos por MCP-1 em um mecanismo dependente do receptor CCR2 ativando uma resposta via MAPK e PI3K quinases (Pacheco et al., 2007). O mesmo estudo ainda demonstrou que o MCP-1 induz a formação de corpúsculos lipídicos dependente de microtúbulos e da compartimentalização de ADRP nessas organelas.

A adipocitocina leptina, conhecida como um hormônio/citocina derivada de adipócitos também foi descrita modulando a formação de corpúsculos lipídicos. Maya-Monteiro e col demonstraram a formação de corpúsculos lipídicos induzida por leptina em experimentos *in vivo* e *in vitro* em um mecanismo dependente da ativação da via do “alvo da rapamicina em mamíferos” (mTOR) (Maya-Monteiro et al., 2008). Esses corpúsculos lipídicos ainda foram sítios de localização da 5-LO e estavam relacionados com o aumento da síntese de LTB₄.

Dessa forma, alguns estudos começaram a ser desenvolvidos a fim a investigar maneiras de se modular a formação dessas organelas. Bozza e col observaram que a aspirina e outros anti-inflamatórios não esteroidais foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por AA e ácido oléico (Bozza et al., 2002; Bozza et al., 1996b). De maneira semelhante, o salicilato de sódio e o C75 (inibidor da ácido graxo sintase), que não são inibidores da enzima ciclooxigenase (COX) também foram capazes de impedir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 2002; Bozza et al., 1996b; D'Avila et al., 2008b). Além disso, quando foram analisadas as isoformas de COX durante a formação de corpúsculos lipídicos, os animais deficientes para COX-1 e COX-2 apresentaram o mesmo perfil de indução dos animais selvagens demonstrando que a formação destas estruturas é independente da ativação tanto da COX-1, quanto da COX-2 (Bozza et al., 2002; Bozza et al., 1996b).



Esquema 5. Modelos hipotéticos para a formação dos corpúsculos lipídicos. (A) Modelo do “brotamento”; (B) Modelo do “porta ovos”; (C) Modelo do “enovelamento”. Esquema adaptado de (Bozza et al., 2009a).

1.2.3) Envolvimento dos corpúsculos lipídicos na regulação do metabolismo lipídico em resposta às infecções

Vários estudos têm mostrado a participação dos receptores de membranas celulares envolvidos no reconhecimento de patógenos que desencadeiam a biogênese dos corpúsculos lipídicos.

Tem sido documentado um grande aumento no número de corpúsculos lipídicos em leucócitos sanguíneos de pacientes sépticos, quando comparados com leucócitos sanguíneos de doadores sadios (Pacheco et al., 2002). A formação de corpúsculos lipídicos por LPS de bactérias gram-negativas pode ser evidenciada por um aumento dependente da dose e do tempo (Pacheco et al., 2002). Além disso, foi demonstrado ocorrer em um mecanismo dependente de TLR4, pois quando foram utilizados animais com mutação para o TLR4 (C57Bl/10 ScCr) e animais com a sinalização por TLR4 inativa (C3H/HeJ) estimulados por LPS *in vivo* e *in vitro*, estes animais apresentaram uma significativa inibição na formação de corpúsculos lipídicos (D'Avila et al., 2006; Pacheco et al., 2002). Tem sido descrito que para induzir uma eficiente ativação, o LPS necessita que o TLR4 se heterodimerize com o receptor (MD2), formando um complexo de sinalização (Scott and Billiar, 2008). Strapagiel e col, demonstraram que o complexo TLR4/MD2 pode interagir com o CD14 e o dímero CD11b/Cd18 em cooperação com CD14 e CD11b/CD18 (Scott and Billiar, 2008; Strapagiel et al., 2008). De acordo, Pacheco e col investigaram o papel dessas proteínas acessórias e observou que quando foram utilizados anticorpos neutralizantes para CD14, ou CD11b/CD18, houve uma inibição na formação de corpúsculos lipídicos induzidos por LPS (Pacheco et al., 2002)

De maneira semelhante, a *Chlamydia pneumonia* foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente do receptor TLR2, mas não do TLR4 em presença de LDL (Cao et al., 2007). Outros estudos têm documentado o papel do TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos induzido pelo patógeno intracelular *Trypanosoma cruzi* (D'Avila H submetido). Além de evidências do envolvimento do TLR2 na modulação da formação dos corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂ e PGD₂ induzidos por lipídios de *Schistosoma mansoni* (Magalhaes et al., 2010).

O aumento no número de corpúsculos lipídicos durante infecções bacterianas tem sido relacionado com o aumento da síntese de eicosanóides, e com a localização de enzimas formadoras de eicosanóides (D'Avila et al., 2008a; Leite et al., 2005; Pacheco et al., 2002; Pacheco et al., 2007). Em modelos experimentais de sepse, assim como em pacientes, as enzimas 5-LO e COX-2 foram co-localizadas com os corpúsculos lipídicos e relacionados com o aumento de PGE₂ e LTB₄ pois o seu aumento ocorreu em paralelo ao aumento dos corpúsculos lipídicos. Pacheco e col demonstraram a co-localização do LTB₄ sintetizado nos corpúsculos lipídicos induzidos por LPS em macrófagos e neutrófilos em um mecanismo dependente de MCP-1 e da dinâmica dos microtubulos (Pacheco et al., 2007). Durante a infecção por *T.gondii* foi observado um aumento da expressão da 5-LO e da produção de um potente mediador lipídico anti-inflamatório, a lipoxina (Aliberti and Bafica, 2005). De maneira semelhante, Melo e col 2003 tem documentado um aumento da síntese de PGE₂ acompanhado pelo aumento no número de corpúsculos lipídicos em ratos infectados com *T.cruzi* (Melo et al., 2003). A PGE₂ tem sido descrita envolvida na desativação de células do sistema imune e favorecendo persistência e replicação de patógenos. Durante a infecção experimental por *Leishmania amazonensis*, foi observado que a PGE₂ aumenta a sua replicação e quando a COX-2 é inibida, há uma diminuição da viabilidade do parasita (Pinheiro et al., 2009).

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

Investigando a infecção por *T.cruzi*, Melo e col, observaram por microscopia eletrônica a interação entre os fagossomos e os corpúsculos lipídicos. Além disso, foi demonstrado a presença dessas organelas dentro dos fagossomas de macrófagos infectados por *T.cruzi* (Melo et al., 2003). De maneira semelhante, durante a infecção por *Chlamydia trachomatis*, foi observado por microscopia de confocal, além do aumento na formação de corpúsculos, que fagossomos infectados estão próximos dessas organelas (Kumar et al., 2006). Essa proximidade entre os corpúsculos e o fagossomas pode estar relacionada à necessidade de nutrientes pelos patógenos, favorecendo a sua replicação e sobrevivência. Além disso, quando a formação dos

corpúsculos lipídicos é inibida com triacsin C (inibidor da acil coA sintetase de cadeia longa) há uma diminuição da sobrevivência e da replicação da *Chlamydia trachomatis* (Kumar et al., 2006). Alguns patógenos como o *Toxoplasma gondii* dependem do tráfego de colesterol para o vacúolo parasitóforo para a sua sobrevivência. Tem sido descrito que esse patógeno é capaz de captar e metabolizar lipídios (Charron and Sibley, 2002), uma vez que já foi descrita a presença de enzimas responsáveis pela síntese de ésteres de colesterol no *T.gondii* (Nishikawa et al., 2005). Além disso, corpúsculos lipídicos também foram encontrados dentro do vacúolo parasitóforo (Nishikawa et al., 2005). Dessa forma, os patógenos podem estar sendo beneficiados pela proximidade dos corpúsculos lipídicos, que podem estar atuando como fonte de nutrientes. De maneira interessante, Plotkowski e col observaram a mobilização do AA dos corpúsculos lipídicos em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo a participação dos corpúsculos lipídicos na amplificação da resposta inflamatória (Plotkowski et al., 2008).

Infecções virais também têm sido relacionadas com a indução dos corpúsculos lipídicos e como importantes locais para o ciclo de vida do vírus. Miyanari e col demonstraram que a proteína do capsídeo do vírus da hepatite C foi encontrada associada aos corpúsculos lipídicos sugerindo o papel dessas organelas na produção de novas partículas virais (Miyanari et al., 2007). De maneira semelhante, células infectadas pelo vírus da dengue apresentam acúmulo da proteína do capsídeo madura na superfície dos corpúsculos lipídicos, além de ter sido observado um aumento no número dessas organelas durante a infecção (Samsa et al., 2009).

Independente do agente infeccioso, muitas evidências indicam que a formação dos corpúsculos lipídicos durante processos infecciosos é um fenômeno bem regulado que pode ter implicação na patogenia e um importante papel na modulação da resposta imune.

1.2.4) Papel dos corpúsculos lipídicos na infecção por *M. bovis*, BCG, *M.tuberculosis* e *M. leprae*

A diferenciação de macrófagos em macrófagos espumosos é um evento que tem sido amplamente descrito durante condições clínicas e experimentais na tuberculose. (Cardona and Ausina, 2000b; Ridley and Ridley, 1987). Apesar de ainda não estar claro os mecanismos pelos quais as micobactérias induzem a formação desses corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção, acredita-se que o patógeno possua um importante papel nesse processo.

A participação de receptores de membrana envolvidos no reconhecimento de micobactérias tem sido descritos modulando a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Os receptores mais amplamente estudados nesse fenômeno são os receptores TLRs (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2008a; D'Avila et al., 2006; Mattos et al., 2010a; Mattos et al., 2010b). Nosso grupo tem documentado que a indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção experimental por *M. leprae* e *M. bovis*, BCG ocorre em um mecanismo dependente do receptor TLR2 (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006; Mattos et al., 2010a). O componente da parede micobacteriana e ligante de TLR2, o LAM também é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos estimulados *in vitro* (D'Avila et al., 2006). Contudo, quando foram utilizados animais deficientes para o receptor TLR4, não houve diferença na formação de corpúsculos lipídicos, assim como não foram observadas diferenças na migração e ativação de leucócitos quando comparados com os animais selvagens durante a infecção por BCG *in vivo* (D'Avila et al., 2007; D'Avila et al., 2006; Fremont et al., 2003).

De maneira interessante, a formação de corpúsculos lipídicos ocorre por um mecanismo independente de TLR2 nas células de Schwann infectadas por *M. leprae*, apesar dessas células serem capazes de expressar o receptor (Mattos et al., 2010b; Oliveira et al., 2003). D'Avila e col observaram durante infecção por BCG *in vivo*, que apesar dos eosinófilos não possuírem TLR2 (Rothenberg and Hogan, 2006), a formação de corpúsculos lipídicos nessas células foi inibida em animais deficientes para esse receptor (D'Avila et al., 2007). Nesse mesmo estudo foi observado que a

síntese de eotaxina e IL-5 foram inibidas em animais deficientes de TLR2 durante a infecção por BCG. Além de ter demonstrado que a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos durante a infecção por BCG possui um mecanismo dependente da eotaxina e do receptor CCR3 (D'Avila et al., 2007). Dessa forma, tem sido demonstrado que a indução dos corpúsculos lipídicos não depende somente da direta interação entre o patógeno e a célula do hospedeiro, mas também há mecanismos de amplificação desse fenômeno como componentes bacterianos, bem como quimiocinas e citocinas geradas pelo hospedeiro (D'Avila et al., 2007).

Fatores de regulação transcricionais especializados na expressão de diversos genes, como o receptor nuclear PPAR γ têm sido descrito envolvido na biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacteriana. Almeida e col observaram um aumento da expressão de PPAR γ em monócitos humanos estimulados com BCG. No mesmo estudo, os autores observaram que o aumento na expressão de PPAR γ estava acompanhado do aumento no número de corpúsculos lipídicos e da síntese de PGE em macrófagos estimulados por BCG (Almeida et al., 2009). O papel do PPAR γ na biogênese dos corpúsculos lipídicos ainda foi confirmada pelo uso do antagonista do seu receptor, o GW9662, que foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, assim como a síntese de PGE₂ sem afetar a síntese de TNF, IL-6, IL-12 e MIP-1. Corroborando com dados anteriores do nosso grupo, animais deficientes para TLR2 não foram capazes de expressar PPAR γ , assim como não houve indução de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂, quando comparados com os animais selvagens (Almeida et al., 2009).

Diversos efeitos imunossupressores têm sido descritos para a PGE₂ em altas concentrações, como a inibição de citocinas do perfil Th1, assim como de TNF- α e óxido nítrico, que são essenciais para o combate à micobactéria (Betz and Fox, 1991; Renz et al., 1988). Rangel moreno e col observaram ainda que a supressão da produção de PGE₂ em animais infectados por *M. tuberculosis* levou a uma significativa diminuição do crescimento do bacilo na fase avançada da doença (Rangel Moreno et al., 2002). Como descrito anteriormente, os corpúsculos lipídicos são locais de compartimentalização de AA assim como locais para o metabolismo do ácido araquidônico (Bozza and Bandeira-Melo, 2005). Enzimas formadoras de eicosanóides, como a COX-2 foram observadas co-localizando com corpúsculos lipídicos de

leucócitos em 24h de infecção por BCG (D'Avila et al., 2006). Utilizando a técnica de detecção de eicosanóides no seu sítio de síntese (Eicosacell), foi confirmada a síntese de PGE₂ em corpúsculos lipídicos de macrófagos durante a infecção por BCG (D'Avila et al., 2006). Os autores ainda observaram uma inibição na formação dos corpúsculos lipídicos quando utilizados antiinflamatórios não esteroidais como a aspirina e o NS-398 acompanhada de uma diminuição de PGE₂, IL-10 e um aumento de TNF- α . De maneira interessante, Almeida e col observaram uma diminuição da viabilidade bacteriana quando utilizado o antagonista para PPAR- γ , o GW9662. Esse fenômeno pode ser relacionado com a inibição da formação de corpúsculos por esse antagonista durante a infecção por BCG (Almeida et al., 2009). Dessa forma, o aumento da capacidade dos macrófagos em produzir PGE₂ derivada dos corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacteriana pode ser relacionada com a inibição de uma resposta Th1, podendo assim estar modulando negativamente a ativação do macrófago, favorecendo a sobrevivência e replicação do patógeno no interior do fagócito.

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

Diante dessas evidências e do importante papel dos corpúsculos lipídicos na infecção micobacteriana já descritas (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2008a; Mattos et al., 2010a), esse trabalho visa estudar os mecanismos moleculares envolvidos na infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG e a biogênese dos corpúsculos lipídicos possibilitando entender melhor o mecanismo de sobrevivência desse patógeno dentro

do fagossoma e a sua relação com os corpúsculos lipídicos para um futuro desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.



2) *Objetivos*

2.1) Objetivo geral

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

2.2) Objetivos específicos

- Analisar o papel da fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos na formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG *in vivo*.

- Analisar o papel do receptor CD36 e do co-receptor de TLR2, CD14, na biogênese dos corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacteriana.

- Investigar o envolvimento de diferentes componentes da parede celular micobacteriana na biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos.

- Analisar a interação dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas durante a infecção por BCG.

- Verificar o papel dos corpúsculos lipídicos em modular o recrutamento de proteínas envolvidas com o tráfego de membranas como as proteínas da família Rab assim como o seu estado de ativação em macrófagos infectados.

3) Metodologia

3.1) Animais

Foram utilizados camundongos adultos de ambos os sexos, susceptíveis à infecção por BCG, com peso entre 20 a 25g, da linhagem C57Bl/6 fornecida pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz e mantidos em gaiolas plásticas com livre acesso à água e ração, em uma sala com temperatura de 22 a 24°C, com ciclos de 12 h luz/escuro nos infectórios do Pavilhão Osório de Almeida e Pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP), Fiocruz-RJ. Os camundongos geneticamente deficientes dos receptores CD36 e CD14 foram gentilmente doados pelo Dr. Bernard Ryffel e utilizados sob seus cuidados no Laboratoire d'Immunologie et Embryologie Moléculaires, Institut de Transgénese, CNRS, Orleans, França. Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações da Comissão de Ética em experimentação animal da Fiocruz sob o Protocolo # L0002/08

3.2) *Mycobacterium bovis*, BCG

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

3.3) Pleurisia induzida por BCG

Os camundongos normais ou deficientes foram inoculados através de injeção intratorácica (i. t.) de 0,1 ml da suspensão contendo 5×10^6 bacilos/cavidade de *Mycobacterium bovis*, BCG (marcados com o kit BacLight - Molecular Probes, ou não marcados). Nos animais controles foram administrados 0,1 ml de PBS tween 0,05%

estéril i.t.. Um grupo de animais foi pré-tratado i.t com 20 µg/cavidade de zVAD (OMe)-FMK (obtidos do Calbiochem-Novabiochem, La Jolla, Ca), um inibidor de pan-caspase, 5 minutos antes da injeção de BCG. Após 24 ou 48 h de infecção, os animais infectados e os controles foram sacrificados em câmara de gás carbônico. A cavidade torácica foi aberta e lavada com 1 ml de solução de PBS (pH 7,4) para obtenção da suspensão celular. As células foram quantificadas e, alíquotas contendo 1×10^5 células dos grupos controles e infectados, foram citocentrifugadas a 450 rpm por 5min para a confecção de citoesfregaços. As lâminas contendo os citoesfregaços foram fixadas em formalina 3.7% para posterior coloração com tetróxido de ósmio e quantificação de corpúsculos lipídicos. Também foi utilizada a sonda fluorescente Nile red (9-diethylamino-5H-benzo (alpha) phenoxazine-5-one, Sigma) para a marcação de corpúsculos lipídicos. Ou os citoesfregaços foram diretamente submetidos à coloração para a diferenciação celular.

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

Os camundongos foram sacrificados em câmara de gás carbônico e tiveram o fêmur de ambas as pernas removidas. No fluxo laminar, a cabeça do fêmur foi removida e lavada com 1ml de PBS estéril com auxílio de uma seringa de 1ml. A suspensão de células foi quantificada e foram plaqueadas 6×10^6 células/placa de petri no volume de 8ml do meio DMEM completo (DMEM + L-glutamina 10mmol/L, penicilina 100u/ml, Streptomicina 100u/ml, Hepes 25 mmol/L) + 20% de soro de cavalo + 30% do sobrenadante da cultura de L929. Após 7 dias, o meio das células foi trocado. E no 10º dia as células foram quantificadas, ressuspendidas no meio DMEM completo e cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro redondas no fundo de cada poço. Em cada poço foram adicionados 500 µl da suspensão celular ajustada para 1×10^6 células/ml. Após o período de 2 h, as células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com PBS estéril. Os macrófagos foram deixados na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ *overnight*. As células foram lavadas uma vez com PBS e o meio DMEM completo foi reconstituído. Posteriormente, os macrófagos foram estimulados com BCG MOI (1:1) ou com partículas de látex revestidas com dimicolato de tralose, (TDM) ou monomicolato de trealose (TMM) de *M.bovis*, BCG (10:1) por 24 h

a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse tempo, as células foram fixadas com formalina 3,7% para posterior coloração com tetróxido de ósmio para quantificação dos corpúsculos lipídicos ou marcação fluorescente com 1-acil-2-(7-octil BODIPY®-1-pentanoil)-sn-glicerol (BODIPY 493/503). Os sobrenadantes das culturas foram armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas e mediadores lipídicos.

3.5) Indução de Neutrófilo apoptótico

Neutrófilos murinos foram obtidos da medula óssea. As medulas do fêmur de camundongos foram lavadas com 3 ml de HBSS sem Cálcio e Magnésio (HBSS(-/-)). As células foram lavadas e ressuspendidas em 5 ml de de HBSS(-/-). Os neutrófilos foram purificados por gradiente de Percoll com densidade de 40 e 72% e centrifugadas por 1h a 3500 rpm. As células foram lavadas (2x) com HBSS(-/-). Para a indução de apoptose os neutrófilos foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI 1640 (Hyclone) sem soro fetal bovino (SFB) e irradiadas com UV a 254nm por 10 min. Em seguida, as células foram incubadas em RPMI contendo 10% SFB a 37°C, 5% CO₂ por 4 h como descrito por Fadok e col. (Fadok et al., 1998). O índice de apoptose foi confirmado por coloração com Anexina-V (> 90% marcado) (kit de detecção para apoptose R&D Systems, Minneapolis, MN). Os neutrófilos viáveis foram congelados a -20°C e descongelados em banho à 37°C (3x) para a obtenção de células necróticas (Griffith et al., 1996)

3.6) Quantificação da Apoptose

Células da cavidade pleural de animais infectados e controles foram centrifugadas 1500 rpm por 10min. Os neutrófilos foram purificados com o gradiente de Percoll como descrito anteriormente. A apoptose dos neutrófilos foi detectada *in situ* usando o kit TACS Anexina-V FITC (proteína de 35-36 kDa, dependente de cálcio, que funciona como uma ligante de fosfolipídio de alta afinidade por fosfatidilserina) de acordo com instruções do fabricante (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN) . No mínimo 100 células por grupo foram analisadas por microscopia de fluorescência. As células foram consideradas apoptóticas quando apresentavam marcação positiva para Anexina-V

FITC (verde/ canal FL-1) e negativas para iodeto de propídio (vermelha/ canal FL-2). Para a quantificação de células apoptóticas infectadas foi utilizado o citômetro de fluxo Calibur (BD Biosciences, San Jose, Ca), e os neutrófilos foram analisados de acordo com o tamanho e granulosidade.

3.7) Estimulação *in vitro* de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram retirados por meio de lavagem da cavidade com 5 ml de PBS estéril. As células foram quantificadas e cultivadas (1×10^6 células/ poço) em meio RPMI-1640 contendo 2% SFB e 2% de penicilina e estreptomicina 100u/ml aderidas em lamínulas de vidro redondas no fundo de cada poço em placas de 24 poços. Após o período de 2 h as células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com PBS estéril. Os macrófagos foram deixados na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ overnight em meio RPMI-1640. As células foram lavadas um vez com PBS e o meio RPMI-1640 foi reconstituído. Os macrófagos foram infectados por BCG (MOI, 1:1), partículas de látex (5:1) revestidas com lipídios micobacterianos e, *M. smegmatis*, lipoarabinomanana (LAM), Fosfatidil mioinositol manosídeo (PIM) de *M. tuberculosis*. Após 2 h, os bacilos e as partículas de látex não internalizadas foram removidos por duas lavagens com PBS estéril e o mesmo volume de meio foi reconstituído e permaneceu por 1, 2 ou 24 h na estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Nos experimentos com células apoptóticas os macrófagos foram infectados por BCG (MOI, 5:1) e/ou tratados com neutrófilos apoptóticos, vivos ou necróticos (3:1). A viabilidade foi quantificada com azul de tripan ao final de cada experimento e foi observado sempre maior que 90%.

3.8) Análises por fluorescência

3.8.1) Imunolocalização de Rab5, Rab7 e RILP em macrófagos pleurais

Citoesfregaços (1×10^5 célula/lâmina) provenientes da pleurisia induzida por BCG foram fixados em formalina 3% por 10min, posteriormente as células foram lavadas com PBS e permeabilizadas com triton 0,2% em PBS por 20 minutos. Após a

permeabilização as células foram incubadas com solução de bloqueio, (soro de burro (Jackson Laboratories) 1% em PBS) por 1h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS, Rab5 e Rab7 (1:100) (IgG policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology), Rilp (1:1000) (IgG policlonal de coelho, Santa Cruz Biotechnology), ADRP (1:500) (anticorpo policlonal de porco da índia anti- ADRP murina, Fitzgerald) por 1h, após essa incubação as células foram lavadas 3x com PBS por 10min. Em seguida as células foram incubadas com os anticorpos secundários: anticorpo de cabra anti-coelho conjugado com Alexa- 546 (Molecular Probes) ou anticorpo de burro anti-coelho conjugado com Cy2 (Jackson Laboratories) diluídos em PBS 1:1000 e anticorpo de burro anti-porco da índia conjugado com Cy3, Jackson Laboratories (1:4000) incubados por 1h. Também foi utilizado a sonda fluorescente 1-acil-2-(7-octil BODIPY®-1-pentanoil)-sn-glicerol (BODIPY 493/503) na diluição de uso 1:250, por 5 min para a marcação dos corpúsculos lipídicos. Após essas incubações as células foram lavadas 3x com PBS por 10min e montadas para observação com o meio de montagem vectashield (Vector, Califórnia, EUA).

A especificidade das marcações foi feita usando isotipos controles de IgG de coelho (Jackson Laboratories) no lugar dos anticorpos primários.

As lamínas foram analisadas ao microscópio de fluorescência OLYMPUS (IX81) equipado com câmera digital e processados pelo programa "ImagePro", ou analisadas por microscopia confocal no programa CLSM (LSM510-META, Zeiss).

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

Partículas de látex fluorescentes (Fluoresbrite® PolyFluor® 570 microspheres, Polysciences, Inc) de 1 µm de diâmetro foram centrifugadas a 10.400 rpm por 10 min e lavadas em tampão carbonato 0,05 M duas vezes. Na suspensão contendo as partículas de látex foram adicionados 50 µg de PIM ou LAM. Posteriormente, esses eppendorfs foram sonicados por 5 min e incubados em banho por 1 h a 37°C. Após, as partículas de látex foram lavadas duas vezes com o tampão carbonato e incubadas com 0,5ml de BSA 5% em PBS por 2 h no banho a 37°C. Após esse tempo, as

partículas de látex foram ressuspensas na solução de BSA 0,5% em PBS e estocadas a 4°C.

As partículas de látex foram adicionadas na cultura de macrófagos peritoneais e incubadas por 2 h (concentração de 5:1). Posteriormente as células foram lavadas duas vezes vigorosamente para a retirada das partículas não internalizadas. O meio RPMI-1640 foi reconstituído e as células mantidas em cultura pelos tempos de 1 e 2 h. Durante a última hora de incubação, o meio foi retirado e colocado a sonda fluorescente P96 (ácido 1- pirinododecanóico–Invitrogen) (2 µM) diluído em PBS para a marcação dos corpúsculos lipídicos. A seguir, as células foram lavadas 3x com PBS, fixadas em formalina 3,7% por 10 min e montadas com o meio vectashield (Vector).

3.9) Marcação de bactérias vivas e mortas

Para a marcação fluorescente das bactérias, foi utilizado o kit BacLight (Molecular Probes), onde 3 µl de cada componente (A e B) foram adicionados em 1ml da solução de BCG (25x10⁶ UFC) e incubados por 15 min à temperatura ambiente. As bactérias viáveis e mortas coram-se com o componente A (verde), mas somente as bactérias mortas coram-se também com o componente B (vermelho) como descrito por (Almeida et al., 2009). Para quantificação por citometria, as bactérias viáveis foram marcadas em vermelho (FL-2) com (4 µM) de PKH26 (Redfluorescent cell Linker kit, Sigma), incubados por 2 minutos à temperatura ambiente. Para parar a reação foi adicionado o mesmo volume da reação de SFB inativado e incubado por 1 minuto.

3.10) Contagem de Corpúsculos Lipídicos

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

polymount (polivinil álcool – vinil acetato, Vector). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz, com objetiva de 100x. Os corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foram contados e os resultados foram expressos como média \pm EPM.

3.11) Contagem de Leucócitos totais

Alíquotas das suspensões de leucócitos provenientes da cavidade torácica, peritoneal ou da medula foram diluídas na proporção de 1:40 ou 1:20 em solução de Turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise de hemácias e coloração dos leucócitos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer ou Malassez em microscópio óptico de luz e expressa em milhões de células/ml.

3.12) Contagem Diferencial de leucócitos

A análise diferencial de leucócitos foi feita em citoesfregaços corados pelo método May-Grünwald-Giemsa ou Diff-Quik (Medion Diagnostics, Duedingen, SZ). Foram contadas 100 células consecutivas em microscópio de luz, com objetiva de 100x, para o estabelecimento das porcentagens de cada tipo celular. Os resultados foram expressos em média \pm EPM

3.13) Microscopia eletrônica

As células obtidas do lavado torácico do grupo infectado (1 mg/cav de BCG durante 24h) e do grupo controle foram fixadas em solução de Karnovsky modificada, constituída de paraformaldeído e glutaraldeído a 1% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,3, overnight, a 4° C, conforme (Melo, 1999). Em seguida, as células foram lavadas (três vezes) no mesmo tampão, a 4° C, por cerca de 30 minutos cada. Posteriormente, a suspensão celular foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos para obtenção de *pellets*. Estes foram incluídos em ágar a 2%, conforme padronização para suspensões celulares (Melo et al., 2005). Os pellets de ágar foram imersos em solução de sacarose a 30% em PBS, *overnight*, a 4°C, incluídos em *OCT compound* (Miles, Elkhart, IN), e

estocados a -180°C em nitrogênio líquido para posterior uso. A imunomarcção foi realizada antes do processamento de inclusão para microscopia eletrônica convencional (*pre-embedding*), pois otimiza a preservação de antígenos e é mais sensível para detectar pequenas moléculas do que a marcação após a inclusão (*post-embedding*). A imunomarcção foi realizada com partículas diminutas de ouro (*Immunonanogold*) conjugadas com a fração Fc do anticorpo primário em criosecções de $10\ \mu\text{m}$ montadas em lâminas de vidro (Superfrost/Plus, Fisher Scientific). Todas as etapas foram realizadas a temperatura ambiente, como descrito por (Melo et al., 2005). As lâminas contendo as células foram inicialmente incubadas em PBS (5 minutos) seguida por incubação com PBS e glicina e, posteriormente, com solução tampão PBS-BSA (1% de BSA em PBS) contendo 0,1% de gelatina por 20 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas em solução tampão PBS-BSA contendo 10% de soro normal de cabra (solução de bloqueio) e anticorpo primário para Rab7 (IgG policlonal de coelho anti-Rab7 murina, $10\ \mu\text{g/ml}$) ou anticorpo primário para ADRP (IgG policlonal de cobaia anti-ADRP, $2\ \mu\text{g/ml}$) por 1h. Como isotipo controle foi utilizado soro normal de coelho (1:1000). Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas (30 min) com solução de bloqueio e incubadas com anticorpo secundário anticorpo de cabra anti-camundongo ou de burro anti-cobaia, ambos conjugados com partícula ouro de 1.4 nm de diâmetro (Nanogold, Nanoprobes, Stony Brook, NY, EU) diluído 1:100 em PBS-BSA, por 1h. Em seguida as células foram lavadas com PBS-BSA. As células foram pós fixadas com 1% de glutaraldeído (10 min) e incubadas por 10 min com solução para nucleação das partículas de ouro (silver enhancement) (Nanoprobes). Posteriormente, as células foram imersas em solução de 5% de tiosulfato de sódio (5 min), pós-fixadas com 1% de tetróxido de ósmio (10 min), contrastadas com 2% acetado de uranila (5 min). O material foi desidratado em etanol e acetona e, em seguida, processado rotineiramente para inclusão em resina Epon (Eponate 12 Resin; Ted Pella, CA, EU). Posteriormente, foram obtidos os cortes ultrafinos, que foram analisados em microscópio eletrônico de transmissão (Philips 300 a 60 kV).

3.14) Aquisição das imagens

As imagens foram obtidas usando o microscópio de transmissão Olympus BX-FLA equipado com uma objetiva Plan Apo 100x 1,4 Ph3 (Olympus Optical CO, Japan) e uma câmera digital CoolSNAP-Pro CF em conjunto com o software Image-Pro Plus versão 4.5.1.3 (MediaCybernetics, San Diego, CA). As imagens foram editadas usando o software Adobe Photoshop 5.5 (Adobe Systems, San Jose, CA) Adobe Illustrator 10.0.

3.15) Análise Estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm EPM e analisado Segundo ANOVA Newman-Keuls, com significância de $p < 0.05$.

4) Resultados

4.1) *Indução de corpúsculos lipídicos na infecção por BCG in vivo*

O aumento do número de corpúsculos lipídicos em leucócitos é um fenômeno altamente regulado. Com o passar dos anos, essas organelas têm sido implicadas em condições infecciosas e inflamatórias, como em casos de sepse bacteriana (Leite et al., 2005; Pacheco et al., 2002); doença respiratória aguda (Salluh et al., 2007; Triggiani et al., 1995), e infecções micobacterianas (Almeida et al., 2009; Cardona et al., 2000; D'Avila et al., 2007; D'Avila et al., 2008a; Mattos et al., 2010a; Ridley and Ridley, 1987; Russell et al., 2009).

Com o objetivo de observar a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG em relação ao tempo de estímulo, camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t com (5×10^6 bacilos/cavidade) nos tempos de 1, 6, 24, 48 h e 15 dias. Foi observado um aumento no número dessas organelas de maneira crescente com pico de 24h, acompanhado do começo da diminuição no número dessas organelas nos tempos subseqüentes. Contudo, a formação de corpúsculos lipídicos por BCG ainda foi capaz de persistir por até 15 dias na infecção *in vivo* de maneira significativa quando comparadas com o grupo controle (Figura1).

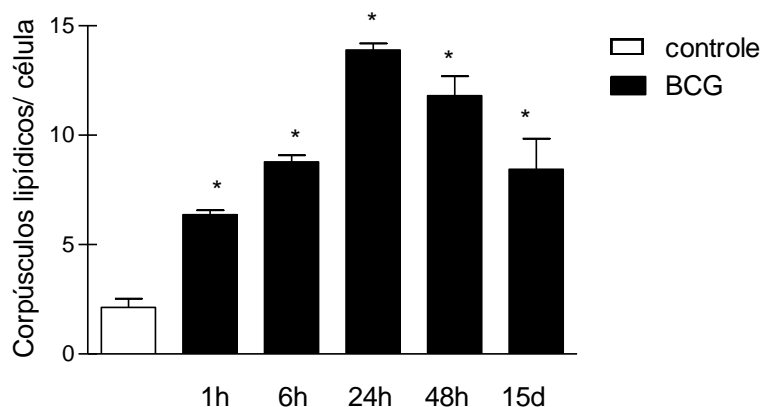


Figura 1. Cinética da formação de corpúsculos lipídicos *in vivo* na infecção experimental por BCG Cinética da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos pelurais nos tempos de 1, 6, 24, 48 h e 15 dias após a infecção. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com BCG (5×10^6 bacilo/cavidade). No grupo controle foi administrado o mesmo volume do veículo i.t.. A quantificação dos corpúsculos lipídicos foi feita após a coloração com tetróxido de ósmio. Cada barra representa média \pm EPM de pelo menos 8 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.2) *A infecção experimental por BCG induz a migração de neutrófilos para a cavidade pleural*

A infecção experimental da tuberculose é caracterizada por uma migração inicial de neutrófilos seguida de monócitos, linfócitos e eosinófilos (Aleman et al., 2005; Appelberg, 2007; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Penido et al., 2003; Werneck-Barroso et al., 2000). Nesse experimento observamos um pico de migração de neutrófilos no infiltrado inflamatório após 6h de infecção (Figura 2). No entanto, ainda é observada a permanência de uma importante quantidade de neutrófilos em 24h de infecção, seguida de uma progressiva diminuição nos tempos subsequentes (48h e 15 dias).

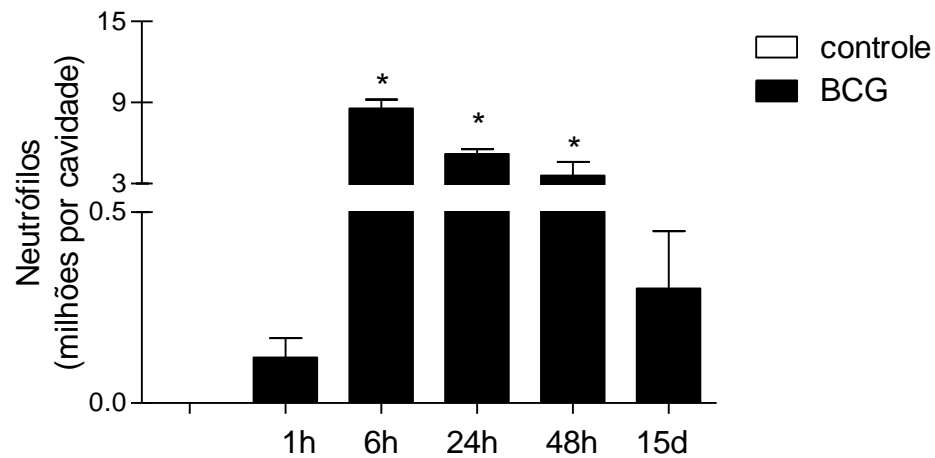


Figura 2. Cinética da migração de neutrófilos *in vivo* na infecção experimental por BCG Cinética da migração de neutrófilos para a cavidade pleural em 1, 6, 24, 48 h e 15 dias após a infecção. Camundongos C57Bl/6 foram infectados i.t. com BCG (5×10^6 bacilos/cavidade). A quantificação dos neutrófilos em citoesfregaços foi feita após coloração de May-Grünwald-Giemsa. Cada barra representa média \pm EPM de pelo menos 8 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.3) Infecção por BCG induz apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório

Os neutrófilos são células de vida curta e que normalmente entram em apoptose no sítio inflamatório. A fim de avaliar o envolvimento do BCG na apoptose de neutrófilos durante a infecção, utilizamos a marcação com Anexina-V – FITC caracterizada por se ligar à fosfatidilserina expressa nas superfícies das células apoptóticas. Observamos que em 24h, o BCG induziu a apoptose de um importante número de leucócitos do lavado pleural (29,74%) e desses, grande parte é constituído pelos neutrófilos (Figura 3A).

A fim de investigar a relação entre os neutrófilos infectados por BCG e a taxa de apoptose, foi utilizado o BCG marcado com PKH. Após 24h de infecção, 37% dos neutrófilos do lavado pleural apresentavam-se apoptóticos, observado pela marcação positiva para Anexina-V. Dos neutrófilos apoptóticos, 92% também possuíam o BCG marcado com PKH. Em contraste, menos de 45% dos neutrófilos viáveis apresentavam-se infectados. Demonstrando que a infecção por BCG é capaz de induzir a apoptose de neutrófilos, uma vez que os neutrófilos infectados encontram-se em grande parte apoptóticos (Figura 3B).

Pela microscopia óptica já é possível observar algumas características morfológicas típicas da apoptose como a condensação nuclear, diminuição no volume do citoplasma e presença de vacúolos (Figura 3C). Podemos observar também o início no *clearance* celular, neutrófilos apoptóticos fagocitados pelos macrófagos (Figura 3D).

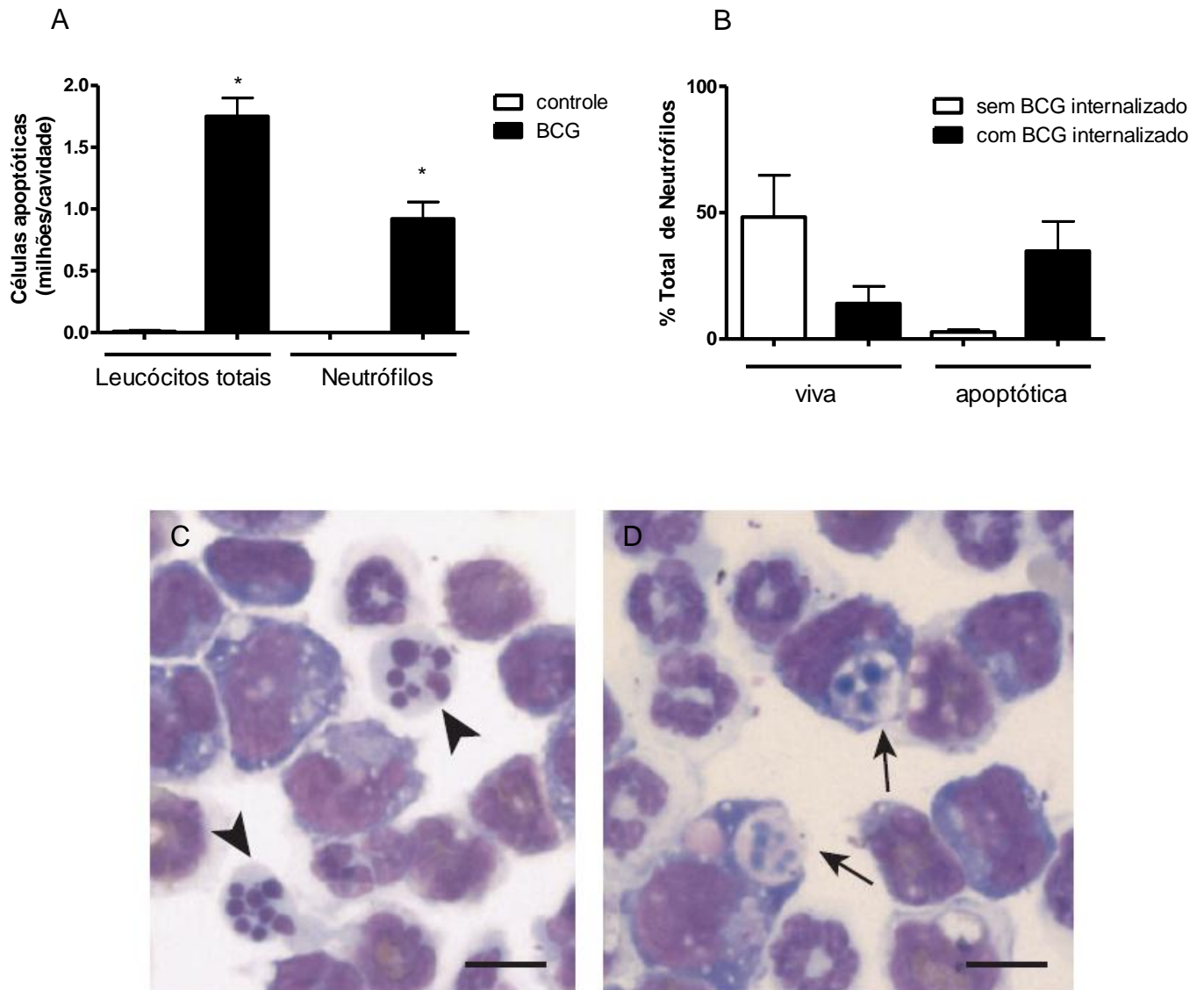


Figura 3. Infecção por BCG induz apoptose em células do lavado pleural. (A) Número de leucócitos apoptóticos totais e de neutrófilos apoptóticos por cavidade pleural do controle e de animais infectados por 24 h com BCG (5×10^6 / cavidade). (B) Porcentagem de neutrófilos apoptóticos e vivos, com e sem BCG internalizado após na 24 h de infecção *in vivo*. A análise das células apoptóticas, assim como a avaliação da presença de BCG no interior das células foi feito por citometria de fluxo e foram utilizados Annexina-V FITC e PKH26 para marcar as células apoptóticas e o BCG endocitados, respectivamente. (C e D) Imagens de microscopia de luz de células coradas com May-Grünwald-Giemsa mostrando neutrófilos apoptóticos (C, cabeça de seta) e macrófagos contendo neutrófilos apoptóticos internalizados (D, seta) de animais infectados 24 h. Cada barra representa média \pm EPM de pelo menos 5 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e infectado ($p < 0,05$) estão indicados por *.

4.4) *A fagocitose de neutrófilos apoptóticos induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos in vitro*

A fim de observar o papel dos neutrófilos apoptóticos na formação dos corpúsculos lipídicos, macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 foram cultivados na presença de neutrófilos viáveis, necróticos ou apoptóticos. Após 24 h, foi observado um aumento no número de corpúsculos lipídicos, tanto nos grupos com neutrófilos apoptóticos, quanto nos grupos infectados com BCG. Na presença de neutrófilos apoptóticos, a infecção com BCG induziu um aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos quando comparado aos estímulos com neutrófilo apoptótico ou BCG separadamente (Figura 4). Além disso, não foram observadas diferenças nos grupos com neutrófilos vivos, necróticos ou no grupo controle. Assim, nós observamos que a fagocitose dos neutrófilos apoptóticos possui um importante papel amplificando os efeitos da infecção por BCG na formação de corpúsculos lipídicos (média \pm EPM; de $5,9 \pm 1,2$ corpúsculos lipídicos/cél no grupo BCG para $10,16 \pm 1,67$ no grupo BCG com neutrófilos apoptóticos) (Figura 4).

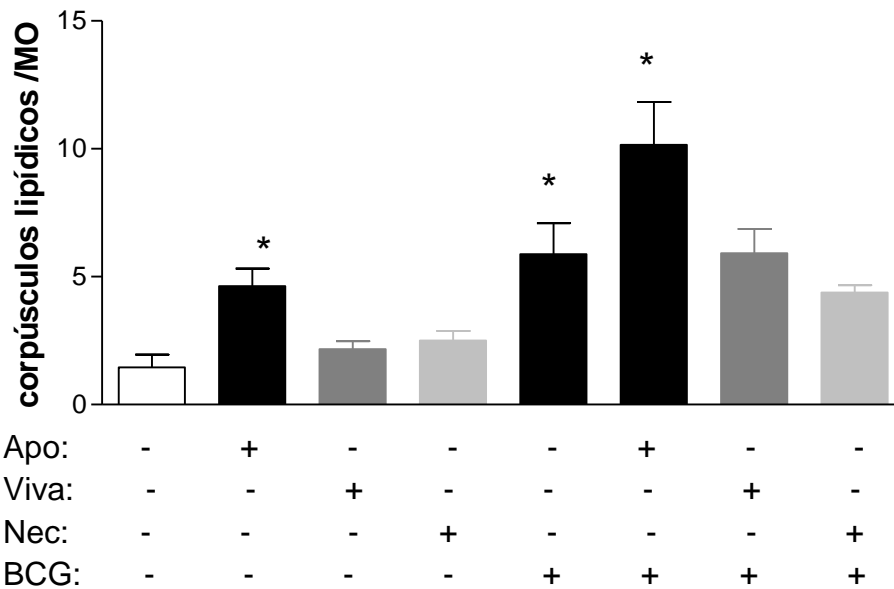


Figura 4. O papel do neutrófilo apoptótico na formação de corpúsculos lipídicos
 Macrófagos peritoneais (1×10^6) foram infectados *in vitro* por BCG (MOI, 5:1) por 2 h . O BCG não fagocitado foi removido através de 2 lavagens com PBS em seguida os macrófagos foram estimulados por células apoptóticas, necróticas ou vivas por 24h a 37°C. Os corpúsculos lipídicos foram quantificados após a coloração por ósmio. Cada barra representa média \pm EPM de 3 grupos independentes com 3 a 5 animais cada. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.5) A inibição da apoptose de neutrófilos reduz parcialmente a formação de corpúsculos lipídicos na infecção por BCG *in vivo*

Para confirmar o envolvimento de células apoptóticas modulando a infecção por BCG, camundongos foram pré-tratados i.t. com um inibidor de pan caspase (o peptídeo zVAD-fmk) 5 min antes da infecção por BCG. O pré-tratamento com zVAD não foi capaz de alterar a migração dos neutrófilos para a cavidade pleural durante a infecção, mas impediu que eles entrassem em apoptose durante a infecção por BCG (Figura 5 e 7). A inibição da apoptose dos neutrófilos reduziu parcialmente, a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção de BCG *in vivo* (Figura 6). Esse dado confirma o envolvimento da fagocitose dos neutrófilos apoptóticos na formação de corpúsculos lipídicos *in vivo*.

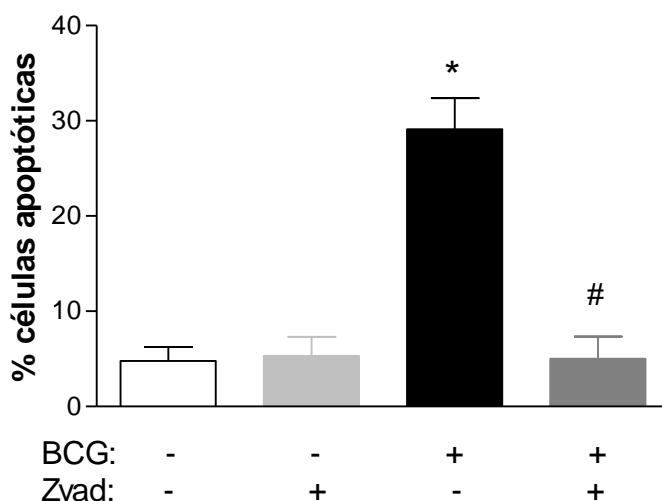


Figura 5. Inibição da apoptose de neutrófilos pelo pré-tratamento com zVAD. Número de neutrófilos apoptóticos nos grupos controle e infectado após o pré-tratamento (5 min) com 20 µg/cavidade de zVAD (inibidor de caspase) em 24h de infecção. Cada barra representa média ± EPM de pelo menos 8 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado (p < 0.05) estão indicados por * . Diferenças entre infectado e tratado representados por #.

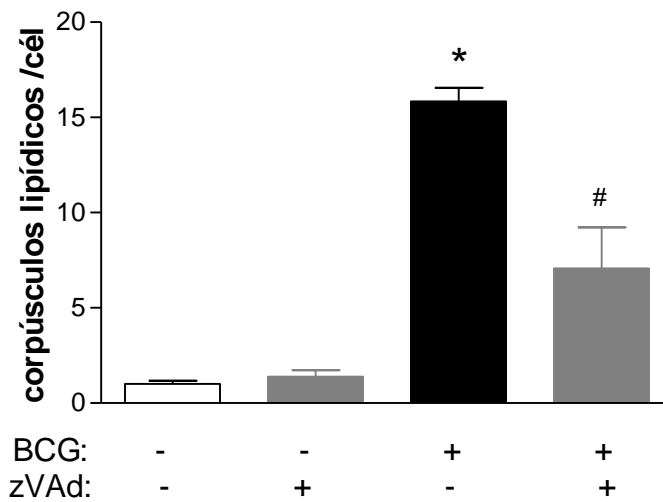


Figura 6. Efeito da inibição da apoptose na formação de corpúsculos lipídicos nos animais infectados. Quantificação da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos nos grupos controle e infectado após o pré-tratamento (5 min) com 20 µg/cavidade de zVAD (inibidor de caspase) em 24 h de infecção. Cada barra representa média ± EPM de pelo menos 8 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado ($p < 0.05$) estão indicados por *. Diferenças entre infectado e tratado são representadas por #.

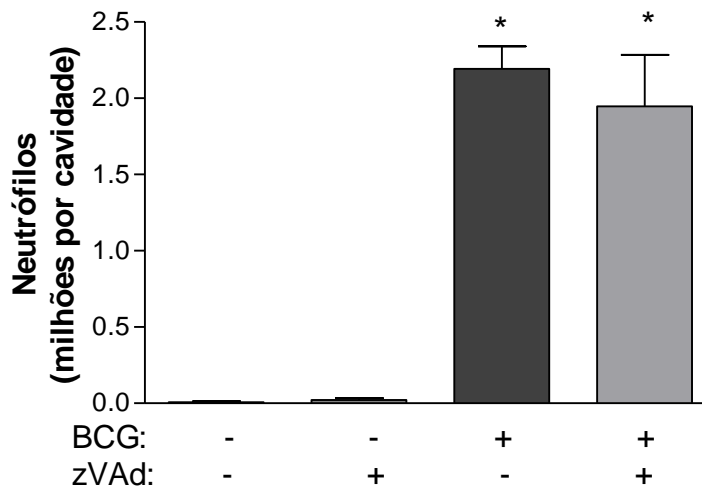


Figura 7. Efeito da inibição da apoptose na migração de neutrófilos para a cavidade torácica. Migração de neutrófilos nos grupos controle e infectado após o pré-tratamento (5 min) com 20 µg/cavidade de ZVAD (inibidor de caspase) em 24 h de infecção. Cada barra representa média ± EPM de pelo menos 8 animais. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo infectado ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.6) **A formação de corpúsculos lipídicos não é um fenômeno dependente da fagocitose**

Com o objetivo de observar a especificidade da formação dos corpúsculos lipídicos, estimulamos os macrófagos peritoneais com *M. smegmatis*, uma micobacteria não patogênica, partículas de látex (partícula inerte) e com o BCG. Nesse experimento observamos que o BCG foi capaz de induzir um aumento no número de corpúsculos lipídicos em 24 h de estímulo *in vitro*. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado quando utilizado *M. smegmatis* e partículas de látex (Figura 8).

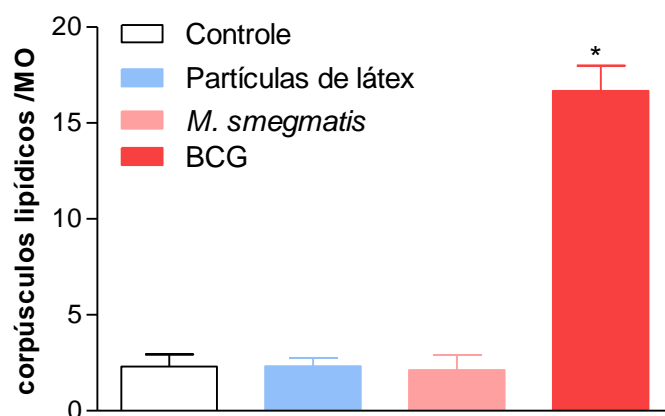


Figura 8. Indução da formação de Corpúsculos Lipídicos por BCG *in vitro*. Macrófagos peritoneais foram estimulados por 24 h com partículas de látex (1:1), *M. smegmatis*, (MOI, 5:1) e BCG (MOI, 1:1). O número de corpúsculos lipídicos por célula foi analisado após a coloração por tetróxido de ósmio e quantificação por microscopia de luz. Diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo BCG ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.7) Componentes da parede micobacteriana foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos

A fim de analisar o papel de outros componentes da parede micobacteriana na formação de corpúsculos lipídicos, macrófagos diferenciados de medula ou macrófagos peritoneais foram estimulados com partículas de látex revestidas com TDM ou com TMM de *M. bovis* BCG ou com o componente da parede de *M. tuberculosis* LAM por 24 h. Nós quantificamos os corpúsculos lipídicos formados após a marcação dessas organelas com a sonda fluorescente Bodipy® ou pela coloração com tetróxido de ósmio. Foi observado um aumento no número de corpúsculos lipídicos, tanto no grupo estimulado com partículas de látex revestidas com TMM, quanto com TDM, assim como o LAM, quando comparados com o grupo controle (Figura 9 A e B).

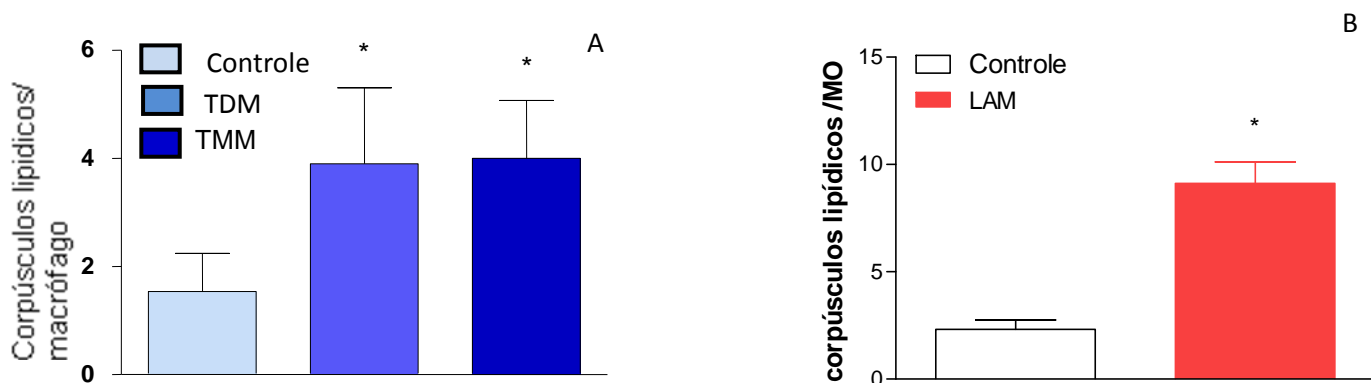


Figura 9. Envolvimento dos lipídios TDM e TMM da parede de *M. bovis* e LAM da parede de *M. tuberculosis* na formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*. Macrófagos diferenciados de medula óssea foram estimulados por 24 h com partículas de látex revestidas (10:1) com TMM e TDM. A quantificação do número de corpúsculos lipídicos foi feita após coloração com Bodipy® e a contagem do número de corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas capturadas em microscopia de fluorescência (A). Macrófagos peritoneais foram estimulados por 24 h com LAM (500 ng/ml). O número de corpúsculos lipídicos por célula foi analisado após a coloração por tetróxido de ósmio e quantificação por microscopia de luz (B). Diferenças significativas entre o grupo controle e os grupos estimulados ($p < 0.05$) estão indicados por *.

4.8) A biogênese dos corpúsculos lipídicos é parcialmente dependente do receptor CD36

O receptor CD36 é um receptor scavenger classe B presente em alguns tipos celulares como plaquetas, células dendríticas e macrófagos. Tem sido descrito o envolvimento desse receptor tanto em situações normais, quanto patológicas como na internalização de lipoproteínas modificadas (Endemann et al., 1993), formação de macrófagos espumosos durante a aterosclerose (Febbraio et al., 2001), na fagocitose de células apoptóticas (Savill et al., 1991), bem como envolvido na fagocitose de micobactérias (Philips et al., 2005).

Nossos resultados demonstraram um significativo aumento no número de corpúsculos lipídicos nas células da cavidade torácica de camundongos C57Bl/6 selvagens (CD36^{+/+}) infectados com *M. bovis* BCG. Em animais geneticamente deficientes para CD36 (CD36^{-/-}) foi observada uma parcial inibição da formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG, sugerindo um mecanismo dependente do receptor CD36 (Figura 10).

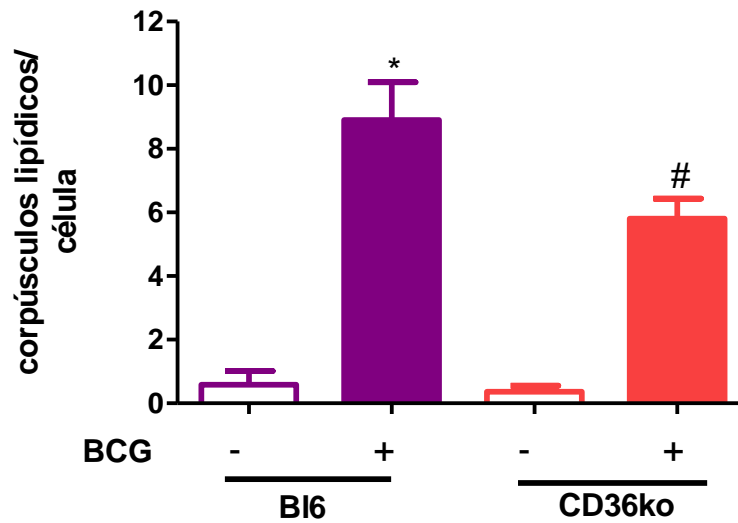


Figura 10. Formação de corpúsculos lipídicos em células do lavado peritoneal é dependente de CD36 na infecção por BCG *in vivo*. Camundongos C57Bl/6 selvagens (CD36^{+/+}) e deficientes de CD36 (CD36^{-/-}) foram infectados i.t. de BCG ($5,0 \times 10^6$ bacilos /animal). Animais injetados com salina foram usados como controle. Após 24h, o número dos corpúsculos lipídicos foi analisado após a coloração com tetróxido de ósmio. Cada barra representa média \pm EPM ($n \geq 5$) animais. Diferenças significativas foram indicadas por * ($p < 0,05$). Diferenças entre grupo selvagem e deficiente para CD36 (#). Representativo de 2 experimentos independentes.

4.9) O co-receptor para TLR, CD14, está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos

Tem sido bem descrito na literatura o papel de receptores TLR no reconhecimento de micobactérias assim como de componentes de sua parede (Lien et al., 1999; Means et al., 1999). Além disso, Heldwein e colaboradores demonstraram o papel do TLR2 na indução de uma resposta inflamatória e na síntese de citocinas em resposta ao BCG (Heldwein et al., 2003). Nessa linha, o nosso laboratório tem demonstrado um importante papel do receptor TLR 2 na formação de corpúsculos lipídicos na infecção *in vitro* e *in vivo* por BCG (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006). Alguns trabalhos tem indicado o papel de co-receptores de TLR, como por exemplo o CD14, participando da adesão, fagocitose, ativação celular e secreção de citocinas em resposta a micobactérias ou a produtos micobacterianos (Compton et al., 2003; Hoheisel et al., 1995; Kaisho and Akira, 2000; Pauligk et al., 2004; Peterson et al., 1995; Schluger and Rom, 1998).

Com o objetivo de avaliar o papel do receptor CD14 na formação de corpúsculos lipídicos, macrófagos diferenciados de medula de camundongos C57Bl/6 selvagens (CD14^{+/+}) e geneticamente deficientes para CD14 (CD14^{-/-}) foram infectados por BCG. Nossos resultados demonstraram um significativo aumento no número dessas organelas nos animais selvagens quando infectados por BCG. Nos animais CD14^{-/-} foi observada uma redução parcial da formação de corpúsculos lipídicos após estímulo de 24h com BCG (Figura 11).

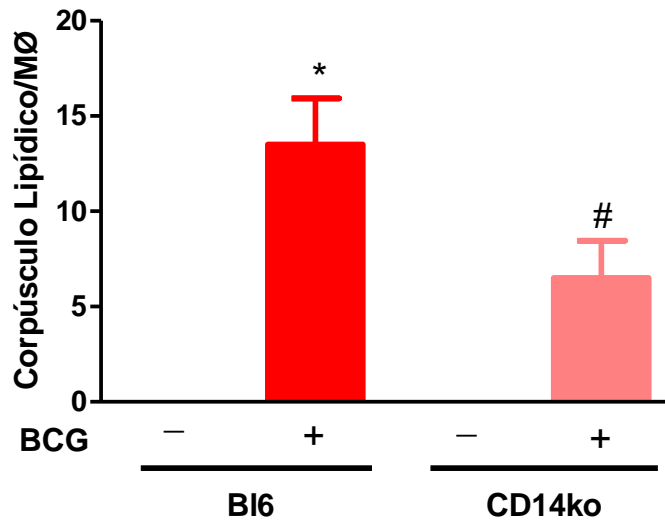


Figura 11. Formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos diferenciados de medula óssea induzida por BCG *in vitro* é dependente de CD14. Macrófagos diferenciados de medula óssea de animais C57Bl/6 selvagens (CD14^{+/+}) e deficientes de CD14 (CD14^{-/-}) foram estimulados com MOI 1:1 por 24 h. A quantificação do número de corpúsculos lipídicos foi feita após a coloração com tetróxido de ósmio. Diferenças significativas foram indicadas por * ($p < 0,05$). Diferenças entre grupo selvagem e deficiente para CD14 (#). Representativo de 2 experimentos independentes.

4.10) *A infecção pleural por BCG apresenta uma aproximação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos em 24 h.*

Alguns estudos têm descrito uma íntima relação entre fagossomas contendo micobactérias e os corpúsculos lipídicos (D'Avila et al., 2006; Peyron et al., 2008; Tanigawa et al., 2008). Nesse experimento, células da cavidade pleural dos animais infectados e não infectados (24 h) foram recolhidos e imediatamente fixadas em solução de Karnovsky, incluídas em ágar, imunomarcadas com partículas de ouro e preparadas para a visualização no microscópio de transmissão eletrônica (TEM). Nossas análises ultraestruturais mostraram que os corpúsculos lipídicos induzidos por BCG apresentavam ADRP em sua periferia através de imunomarcagem com ouro. Além disso, esses corpúsculos lipídicos apresentaram-se próximos de um fagossoma contendo material amorfo 24 h após infecção (Figura 12). Foi observada a internalização do corpúsculo lipídico pelo fagossoma infectado, apresentando a bactéria imersa no seu conteúdo lipídico (Figura 13).

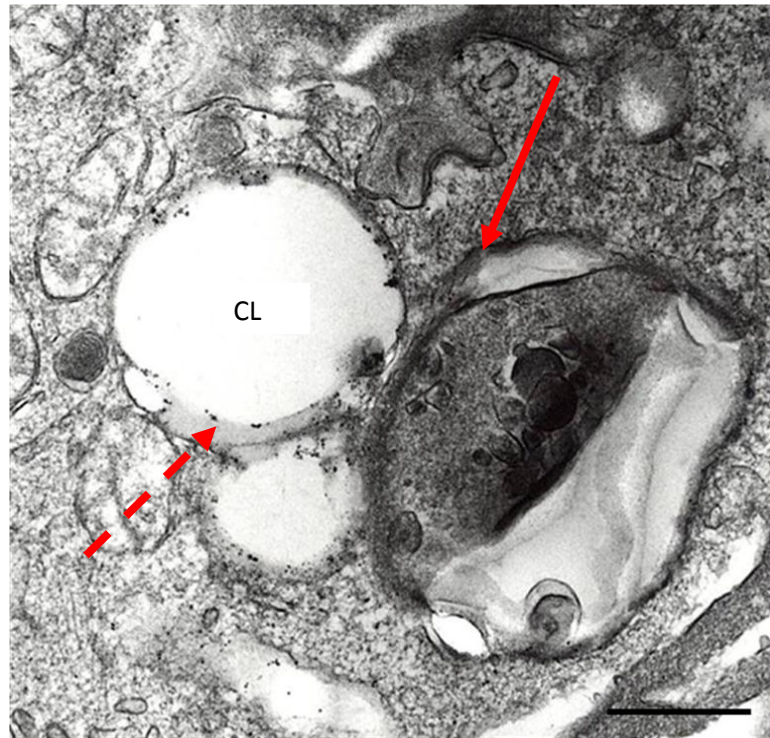


Figura 12. Interação dos corpúsculos lipídicos com o fagossoma. Corpúsculos Lipídicos (CL) marcados através da imunomarcacção com ouro para ADRP (seta tracejada) mostrados por microscopia eletrônica como organelas elétron lúcidas sem membrana envoltória e com a sua periferia elétron densa. Um fagossoma contendo material amorfo pode ser observado em proximidade (seta) do CL no citoplasma do macrófago. Análises por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos pleurais infectados por BCG durante a infecção experimental por 24 h *in vivo*. Barra: 1 μ m

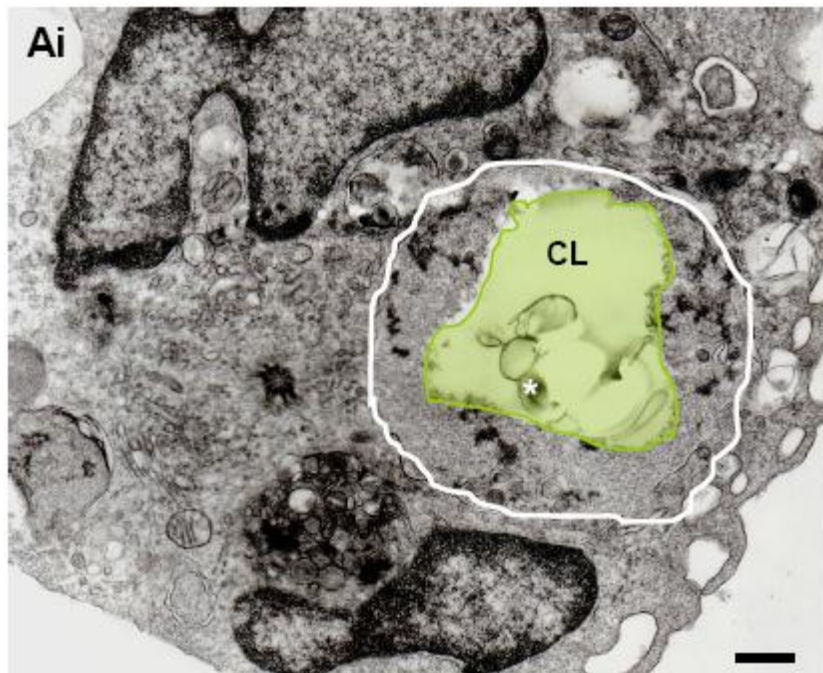
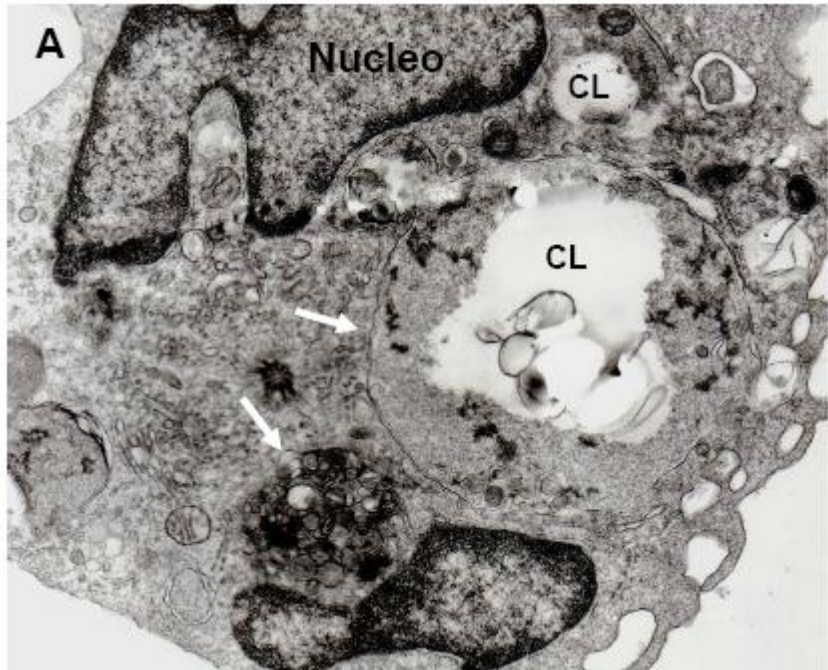


Figura 13 Visualização de corpúsculos lipídicos no interior do fagossoma infectado por BCG. Macrófago peritoneal com morfologia de célula ativada, exibindo fagossomos (setas) e corpúsculos lipídicos elétron-lucidos (CL) (A). Em destaque, grande fagossomo que se fundiu com um corpúsculo lipídico (CL) (Ai). Material de origem lipídica em verde. Bactéria fagocitada é observada dentro do fagossoma (*). Análises por microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos pleurais infectados por BCG durante a infecção experimental por 24h *in vivo*. Barra= 1 μ m

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

Para avaliar a importância da viabilidade bacteriana nos mecanismos de recrutamento dos corpúsculos lipídicos, fizemos uma injeção intratorácica com 5×10^6 bacilos/cavidade com a bactéria marcada, viva (verde) e morta (vermelha). Nossas análises por microscopia de fluorescência demonstraram que a proximidade dos corpúsculos lipídicos com o fagossoma ocorre tanto com bactéria viva, quanto morta, sugerindo que esta interação independe da viabilidade da bactéria em 24h da infecção experimental por BCG (Figura 14).

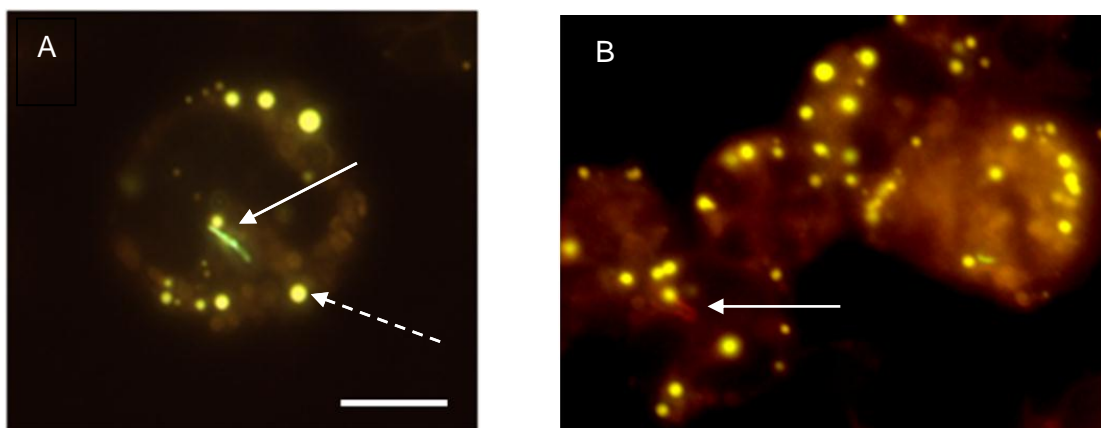


Figura 14. Interação de fagossoma contendo bactéria viva ou morta com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção *in vivo*. Macrófagos em 24 h de infecção por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade) exibindo interação da (A) bactéria viva (seta) e (B) morta (seta), com os corpúsculos lipídicos em amarelo (A e B). Bactérias foram coradas com o kit Baclight e os corpúsculos lipídios marcados com Nile red (seta tracejada). Barra: 10 µm

4.12) *Partículas de látex revestidas com LAM e PIM foram observadas próximas aos corpúsculos lipídicos*

Nossos dados anteriores demonstraram o papel de lipídios micobacterianos na formação dos corpúsculos lipídicos. Além disso, alguns componentes da parede micobacteriana como o TDM (Spargo et al., 1991) e o LAM (Vergne et al., 2003) tem sido apresentados como possíveis responsáveis pela inibição da maturação do fagossoma. Para avaliar o envolvimento de componentes da parede micobacteriana na interação com os corpúsculos lipídicos, nós revestimos partículas de látex com LAM e PIM, e estimulamos macrófagos peritoneais por 1 e 2 h respectivamente. Por microscopia de fluorescência, pode ser observada a interação de fagossomos contendo partículas de látex revestidas com os componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos marcados com sondas fluorescentes. Contudo, essa interação não foi observada quando utilizadas partículas de látex não revestidas (Figura 15).

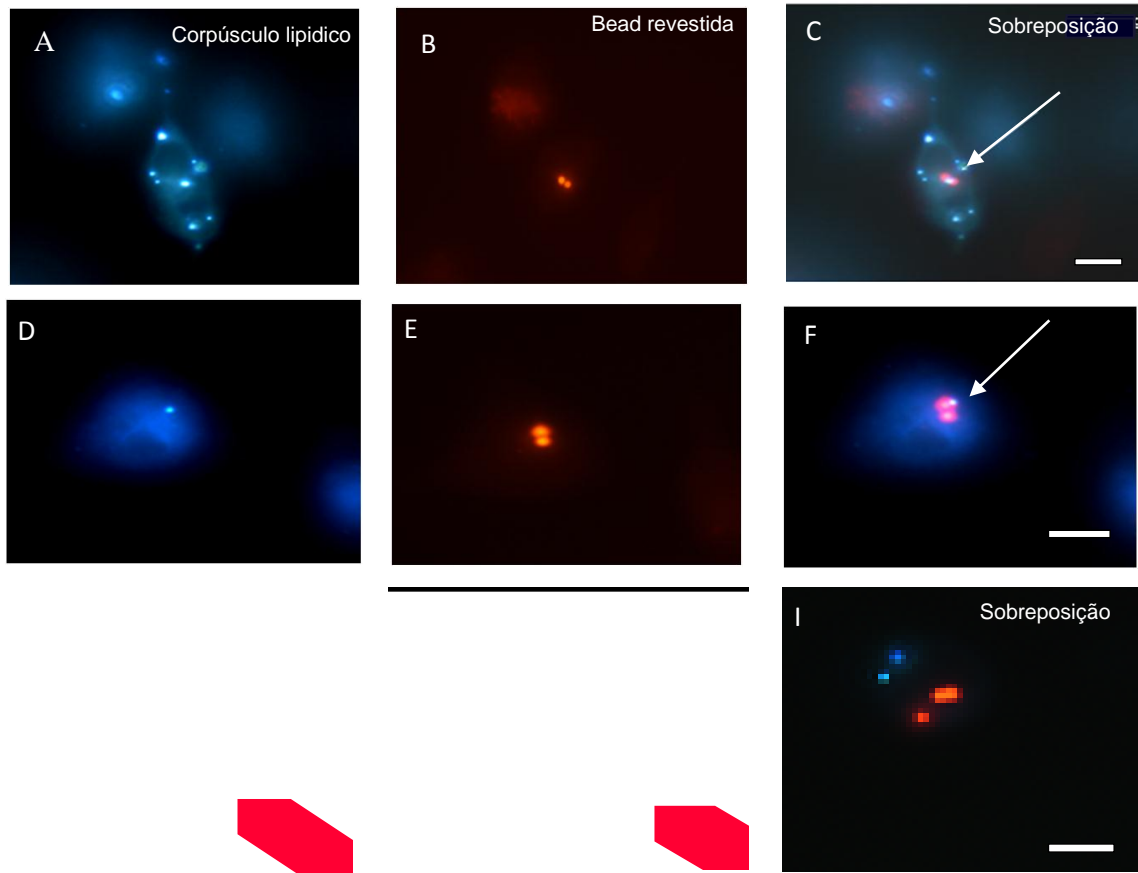


Figura 15. Interação de fagossomos contendo partículas de látex fluorescentes revestidas com componentes da parede micobacteriana com os corpúsculos lipídicos. Macrófagos peritoneais estimulados por 1 h (A-C) e 2 h (D-E) com partículas de látex fluorescentes (5:1) revestidas com (B) LAM e (E) PIM. (A e D) Os corpúsculos lipídicos foram marcados com a sonda fluorescente P96. (C e F) Sobreposição das imagens mostrando a proximidade dos corpúsculos lipídicos com as partículas de látex revestidas. (G - I) Controle, partículas de látex não revestidas. Barra: 10 μ m.

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

Algumas funções têm sido atribuídas aos corpúsculos lipídicos, devido a presença de diversas proteínas nestas estruturas, como enzimas necessárias para a síntese de eicosanóides (D'Avila et al., 2006), proteínas envolvidas com a sinalização celular (Yu et al., 1998; Yu et al., 2000) e proteínas envolvidas com tráfego de membranas (Bartz et al., 2007; Wan et al., 2007). A fim de investigar o papel de corpúsculos lipídicos na via endocítica durante a infecção experimental por BCG, fizemos uma imunofluorescência para as proteínas Rab5 (marcador de endossoma primário) e Rab7 (marcador de endossoma secundário) nos macrófagos obtidos de animais infectados. Observamos que apesar da Rab5 estar localizada próxima dos corpúsculos lipídicos, elas não se encontram co-localizadas dentro destas estruturas (Figura 16). No entanto, quando avaliamos a localização da Rab7 na célula, de maneira interessante, foi observada a presença da proteína co-localizada com os corpúsculos lipídicos (Figura 17).

Confirmando estes dados, nossas análises ultraestruturais mostraram que os corpúsculos lipídicos induzidos por BCG apresentavam Rab7 em sua periferia através de imunomarcção com ouro 24 h após infecção (Figura 18 A e B). Foi observado ainda a interação dos corpúsculos lipídicos com o fagossoma infectado através dos locais de maior acúmulo de Rab7 das duas organelas (Figura 18 B).

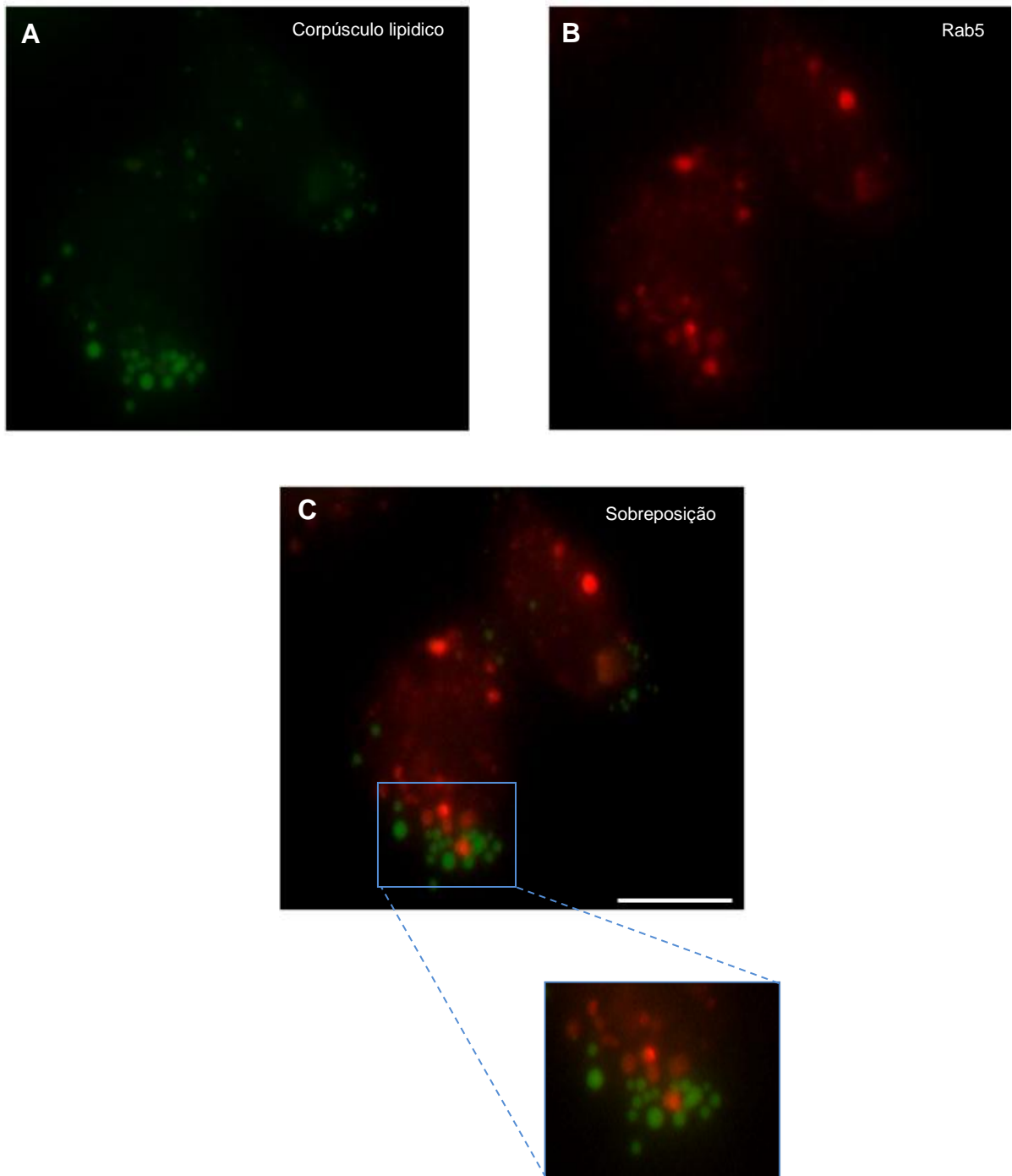


Figura 16. A proteína Rab5 parece não co-localizar com corpúsculos lipídicos induzidos por BCG. (A) Marcação para corpúsculo lipídico com Bodipy® e (B) Imunolocalização para Rab5 em macrófagos pleurais após 24 h de infecção por BCG *in vivo*. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que a Rab5 não se localiza nos corpúsculos lipídicos na infecção por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade). Barra: 10 μm

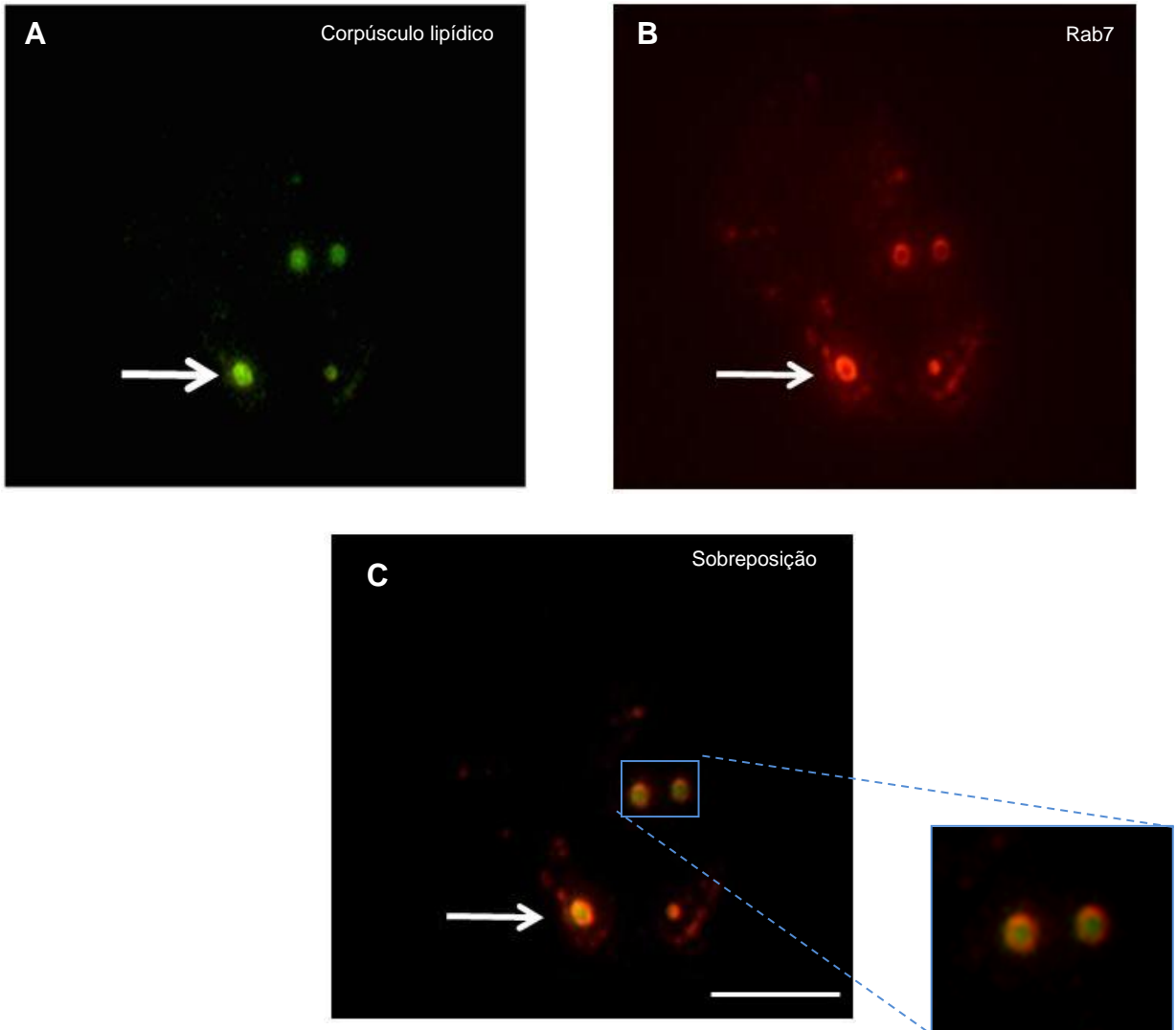


Figura 17 Co-localização da proteína Rab7 em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG (A) Marcação para corpúsculos lipídicos com Bodipy® e (B) Imunolocalização para Rab7 em macrófagos pleurais após 24 h de infecção por BCG. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que a Rab7 está co-localizada com os corpúsculos lipídicos (quadro) na infecção *in vivo* por BCG (5×10^6 bacilos/cavidade). Barra: 10 μ m.

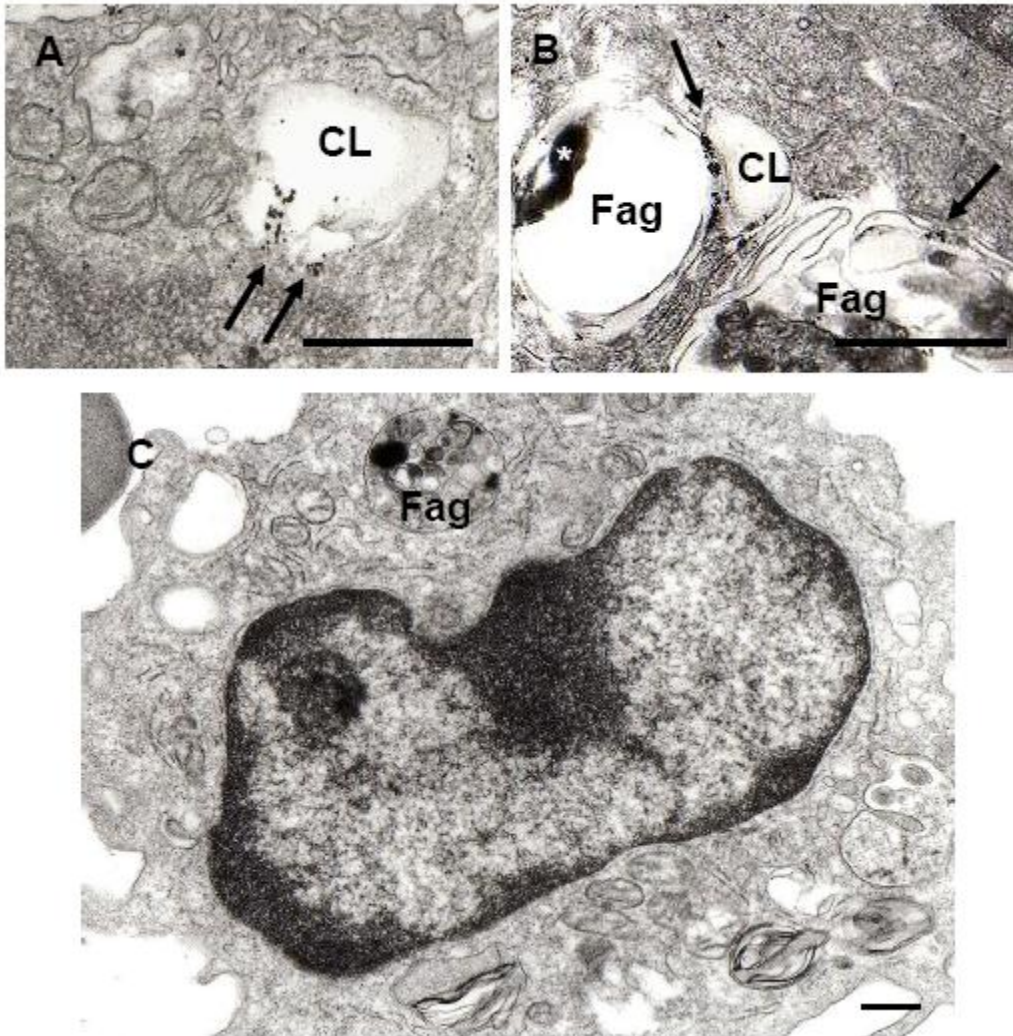


Figura 18. Imunomarcção com ouro da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG 24 h *in vivo*. Corpúsculo lipídico (CL) apresenta através da imunomarcção com ouro para Rab7 (seta) a presença dessas proteínas na sua periferia (A). Corpúsculo lipídico em associação com fagossomos contendo bactérias (*), ambos apresentam marcação para Rab7 (setas) (B). IgG controle foi utilizada como controle do anticorpo primário (C). Análises realizadas por microscopia eletrônica na infecção por BCG 24 h *in vivo*. Fag = fagossomo; Barras = 1 μ m.

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

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

Após a confirmação da presença da proteína Rab7 nos corpúsculos lipídicos, investigamos o seu estado de ativação, observando por imunofluorescência a presença da proteína RILP. Análises por microscopia de confocal demonstraram a co-localização da RILP nos corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy (Figura 20) e marcados com ADRP (Figura 19) em 24 e 48 h respectivamente de infecção *in vivo* por BCG em camundongos C57Bl/6.

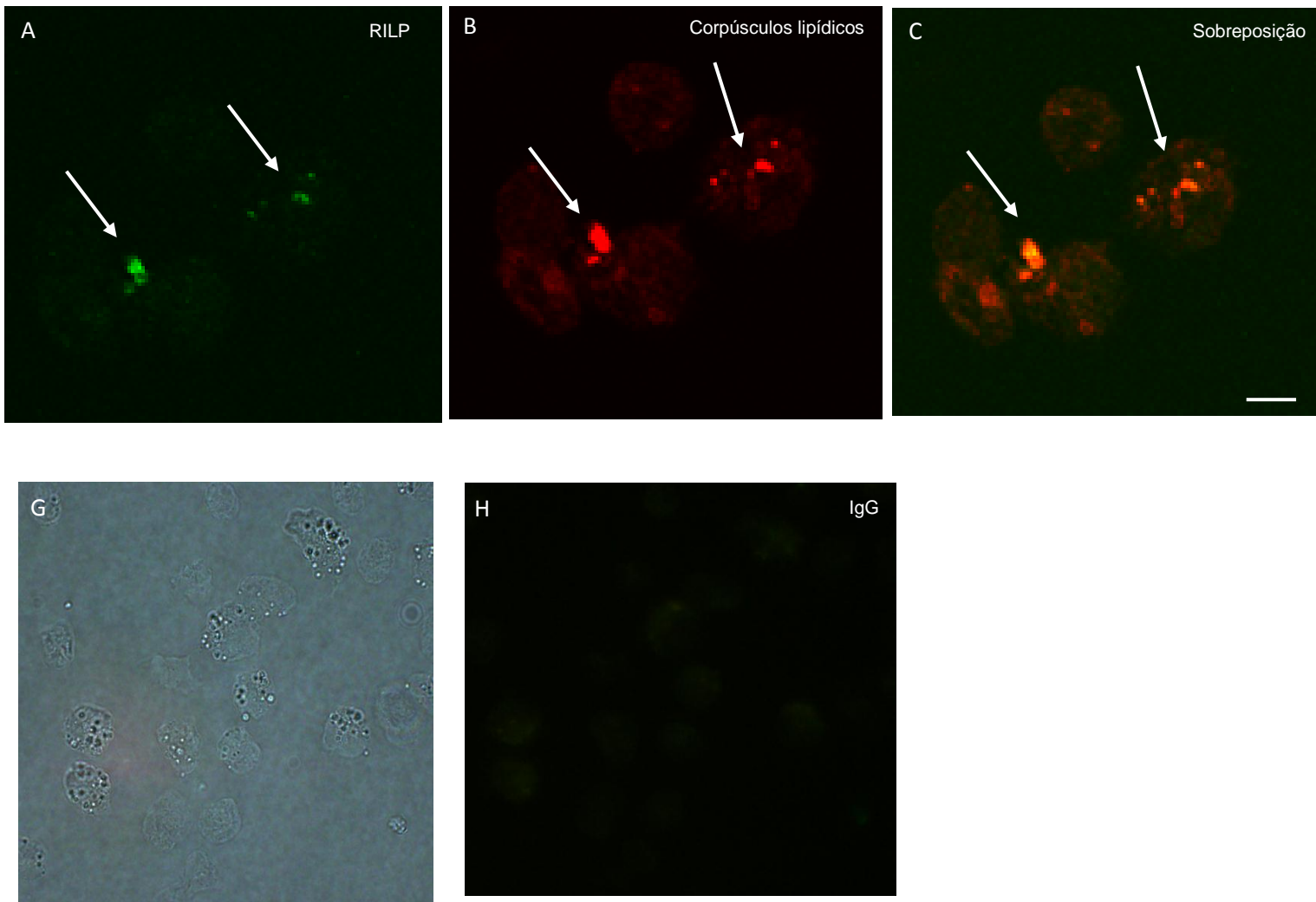


Figura 19. Co-localização da proteína Rilp em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG. (A) Imunolocalização para Rilp em macrófagos (B) Marcação para corpúsculo lipídico com ADRP. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que a Rilp está co-localizada com os corpúsculos lipídicos em 24 h de infecção por BCG *in vivo* (5×10^6 bacilos/cavidade). IgG controle foi utilizada como controle do anticorpo primário (G e H). Análise por microscopia de confocal. Barras = 5 μ m

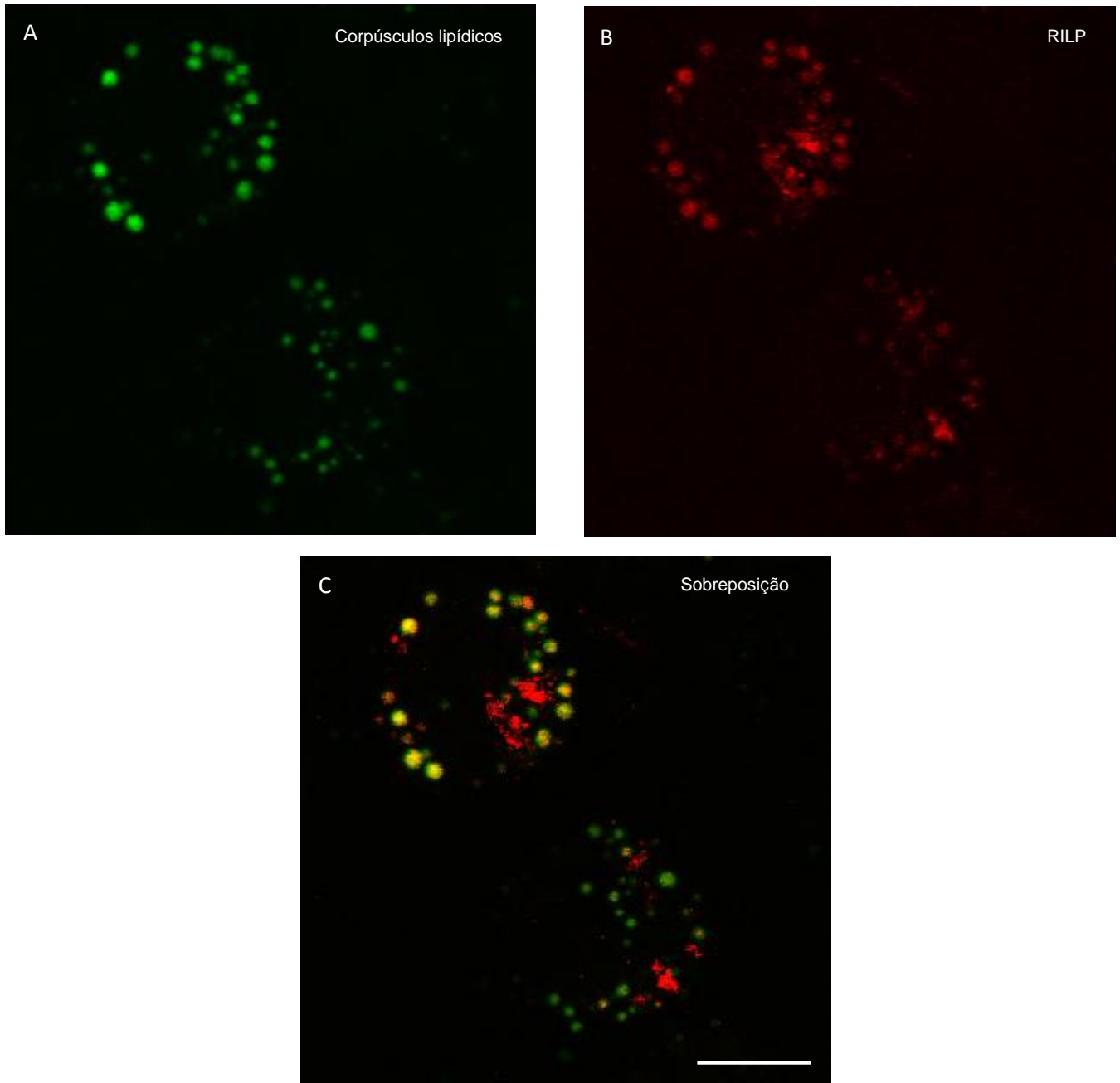


Figura 20. Co-localização da proteína RILP em corpúsculos lipídicos induzidos por BCG. (A) Marcação para corpúsculo lipídico com Bodipy® e (B) Imunolocalização para RILP em macrófagos. (C) Na imagem de sobreposição podemos observar que a RILP está co-localizada com os corpúsculos lipídicos em 48 h de infecção por BCG *in vivo* (5×10^6 bacilos/cavidade). Análise por microscopia de confocal. Barras = 10 μ m

5) *Discussão*

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

Neste trabalho investigamos a resposta do hospedeiro durante a infecção aguda por *M. bovis* BCG, o papel das organelas citoplasmáticas denominadas corpúsculos lipídicos na infecção, bem como os receptores envolvidos na sua biogênese e o seu papel na modulação da via endocítica. A nossa hipótese central é que a formação dos corpúsculos lipídicos podem estar favorecendo a infecção micobacteriana, seja como fonte de nutrientes para a bactéria ou modulando diretamente a resposta do hospedeiro.

Nesse estudo nós demonstramos que a formação dos corpúsculos lipídicos é um mecanismo altamente específico dependente de receptor e envolvido na interação com os fagossomas na infecção micobacteriana. Nesse trabalho foi utilizada a pleurisia induzida por *M. bovis* BCG como modelo de infecção experimental. Este modelo já se encontra bem estabelecido no laboratório e consiste na injeção intratorácica de *M. bovis* BCG em camundongos C57Bl/6, que são susceptíveis a infecção. Baseado neste modelo, tem sido descrito uma importante resposta inflamatória inicial caracterizada pela migração de leucócitos para a cavidade torácica (D'Avila et al., 2006). Durante a infecção por BCG *in vivo* foi observado um aumento expressivo da formação de corpúsculos lipídicos em células da cavidade torácica, com pico em 24 h de infecção podendo persistir por até 15 dias em menor número, porém significativamente maior que o controle. De maneira semelhante, a infecção de macrófagos *in vitro* por BCG também obteve um pico de formação em 24 h (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006). Contudo, no modelo de infecção por *M. leprae* foi observado um tempo de 48 h para a indução máxima dessas organelas (Mattos et al., 2010a). De maneira interessante, nós observamos que o aumento no número de corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção micobacteriana permanece elevado por um tempo maior do que

na indução por LPS *in vivo*, onde os números dessas organelas diminuem após 24 h, se tornando iguais aos do controle no tempo de 48 h (Pacheco et al., 2002).

Durante o processo infeccioso, os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no sítio inflamatório iniciando a resposta imune inata mediada pela fagocitose do bacilo, liberando potentes citocinas pró-inflamatórias e recrutando leucócitos para o local de infecção. Apesar dos neutrófilos serem capazes de fagocitar rapidamente (30 min) as micobactérias tanto em modelos *in vivo* quanto *in vitro* (Martin and Chaudhuri, 1952; May and Spagnuolo, 1987), elas não são eficazes no controle da infecção por *M. tuberculosis* em animais susceptíveis (Eruslanov et al., 2005). De fato, nossos resultados apresentaram o pico de migração de neutrófilos em 6 h de infecção experimental por BCG, mas após este tempo o número de neutrófilos diminuiu consideravelmente e aos 15 dias de infecção encontra-se igual ao controle. E em 24 h de infecção, 37% dos neutrófilos do lavado pleural apresentavam-se apoptóticos. De maneira interessante, 92% destes estavam infectados por BCG sugerindo a indução da apoptose pela bactéria. Além disso, foi observado por microscopia de luz após coloração por May-Grunwald-Giemsa a presença de neutrófilos apoptóticos no interior de macrófagos. Esses dados sugerem então, que essas células morreriam por apoptose e seriam fagocitados por macrófagos como um mecanismo para impedir a inflamação e danos nos tecidos por seu conteúdo citotóxico. Dados do nosso grupo apresentaram ainda por microscopia eletrônica, neutrófilos infectados por BCG no interior de macrófagos da cavidade pleural em 24 h de infecção (D'Avila et al., 2008b). Corroborando também com dados de Antony e col, que observaram a presença de neutrófilos infectados com BCG no interior de macrófagos de coelhos (Antony et al., 1985). Nossos dados sugerem a indução da apoptose em neutrófilos infectados pelo BCG como um mecanismo de escape, podendo funcionar como “Cavalos de tróia” uma vez que quando fagocitados pelos macrófagos, os neutrófilos podem estar levando consigo as bacilos ainda vivos.

A fagocitose de células apoptóticas é um processo fisiológico que leva a indução de mediadores anti-inflamatórios como a PGE₂ e TGF-β, a fim de conter a inflamação atuando como desativadores de macrófagos. Dessa forma, o aumento no número de células apoptóticas na infecção micobacteriana, assim como a aceleração desse fenômeno pode estar contribuindo sob um outro aspecto para a perpetuação da

doença. Dessa maneira semelhante, Freire-de-lima e col observaram um aumento da apoptose celular durante a infecção por *T. cruzi*, que foi correlacionado com o aumento da síntese de PGE₂ e TGF-β (Freire-de-Lima et al., 2000). No mesmo estudo os autores observaram que a interação das células apoptóticas, mas não necróticas durante a infecção por *T. cruzi* favoreceram a replicação do parasita em um mecanismo dependente desses mediadores. Além disso, quando a PGE₂ foi inibida através do tratamento com inibidores de COX como a aspirina e celecoxib, o aumento da replicação do parasita observada pela co-cultura de células apoptóticas foi revertida.

Já tendo sido descrito o papel dos corpúsculos lipídicos como sítios de localização de COX-2, funcionando como plataformas de sinalização intracelular para a produção de PGE₂ durante a infecção micobacteriana (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2006), investigamos então o papel das células apoptóticas na formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG. Nossos estudos *in vitro* mostram que a célula apoptótica foi capaz de aumentar o número dos corpúsculos lipídicos além disso, a presença das células apoptóticas durante a infecção por BCG foi capaz de amplificar a formação dessas organelas. Contudo, quando utilizadas células necróticas ou viáveis, esse efeito não foi observado. Confirmamos ainda o papel das células apoptóticas na infecção por BCG *in vivo*. Quando foi utilizado o inibidor de pan-caspase zVAD, ele foi capaz de inibir a apoptose celular sem inibir a migração de neutrófilos. Confirmando os nossos dados *in vitro*, a inibição da apoptose pelo zVAD teve um efeito drástico na inibição da formação de corpúsculos lipídicos após 24 h de infecção por *in vivo*. Além disso, o aumento dos corpúsculos lipídicos induzidos por células apoptóticas e a sua amplificação na presença do BCG ocorreu em paralelo a síntese de PGE₂. De acordo, esse aumento na síntese de PGE₂ não foi observado quando foram utilizadas células necróticas e células viáveis (D'Avila et al., 2008b). Ainda, a utilização de inibidores de COX, como a aspirina e NS-398 além do inibidor do ácido graxo sintase, o C75, foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzidos pelas células apoptóticas e pelo BCG, concomitante com a diminuição da síntese de PGE₂ (D'Avila et al., 2008b). D'Avila e col demonstraram que a aspirina e o NS-398 são capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos além de induzir a síntese de TNF-α e diminuir a produção de IL-10 durante a infecção por BCG (D'Avila et al., 2006). Em conjunto, esses resultados sugerem que a fagocitose das células apoptóticas na presença na

infecção potencializa a formação de corpúsculos lipídicos, a síntese de PGE₂ e pode estar agindo na desativação de macrófagos e dessa forma favorecendo o patógeno.

O reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) por leucócitos é um evento crucial para desencadear a fagocitose do patógeno assim como extremamente importante na indução de uma sinalização intracelular e desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa. Tem sido descrito que a parede celular micobacteriana possui uma grande variedade de PAMPs, como lipoproteínas e lipoglicanos que são reconhecidos por receptores de reconhecimento padrões presentes na membrana dos leucócitos. Nossos resultados mostraram que tanto o BCG viável quanto o morto foram fagocitados por macrófagos pleurais durante a infecção *in vivo*. Realmente, tem sido sugerido um papel para o ManLam micobacteriano na fagocitose mediada pelo receptor de manose (Schlesinger et al., 1994). Sugerindo o reconhecimento de componentes micobacterianos nessa resposta. Além disso, vários trabalhos têm apontado a participação do TLR2 no reconhecimento de lipoglicanas como o LAM e o PIM desencadeando uma sinalização intracelular envolvida na resposta micobacteriana (Gilleron et al., 2003; Means et al., 1999).

De fato, tem sido bem descrito pelo nosso laboratório o reconhecimento do *M. bovis* BCG via TLR2 bem como o seu envolvimento na indução dos corpúsculos lipídicos. Investigamos então a capacidade de alguns componentes da parede micobacteriana em induzir a formação dos corpúsculos lipídicos. De maneira semelhante ao ocorrido durante a infecção *in vivo* por BCG, experimentos *in vitro* com o LAM, o TDM e o TMM demonstraram a capacidade desses componentes da parede celular micobacteriana em aumentar o número de corpúsculos lipídicos após 24 h de estímulo em macrófagos. Com 24 h de estímulo foi observado ainda que a formação de corpúsculos lipídicos é um mecanismo regulado, sendo dependente da natureza do estímulo, uma vez que a micobactéria não patogênica *M. smegmatis* e partículas de látex não revestidas foram fagocitadas pelos macrófagos, contudo não foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, ao contrário do BCG, onde houve um aumento no número dessas organelas. Sugerindo que a biogênese dos corpúsculos lipídicos é um fenômeno que não depende da fagocitose.

Nós procuramos então investigar se haveriam outros receptores envolvidos na biogênese dos corpúsculos lipídicos. Alguns receptores tem sido descritos no

reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas como os receptores CD36 e CD14 (Devitt et al., 1998; Savill et al., 1991). Estudos prévios ainda apontam para o papel desses receptores no reconhecimento e fagocitose de micobactérias (Febbraio et al., 2001; Peterson et al., 1995). Contudo, o papel desses receptores durante as infecções micobacterianas ainda não se encontra totalmente esclarecido.

Investigando o papel desses receptores na infecção experimental por BCG *in vivo* e *in vitro*, observamos que os animais deficientes para ambos os receptores tiveram uma menor indução na formação dos corpúsculos lipídicos, quando comparados com os animais selvagens. Esses dados corroboram com dados do nosso laboratório, onde foi observado que a utilização de anticorpos neutralizantes para os receptores CD36 e CD14 foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, a síntese de PGE₂, porém sem alterar os níveis de TNF- α durante a infecção por BCG (Almeida em preparação).

Como descrito anteriormente, os corpúsculos lipídicos são estruturas dinâmicas, altamente reguladas que aumentam em número e tamanho durante a infecção por BCG em leucócitos por um mecanismo dependente do reconhecimento por receptores (Almeida et al., 2009; D'Avila et al., 2007; D'Avila et al., 2006). Dessa forma, concluímos até o momento um papel para os componentes da parede micobacteriana na formação dos corpúsculos lipídicos e o envolvimento dos receptores CD36 e CD14 nesse fenômeno. Contudo, estudos adicionais ainda são necessários para esclarecer o papel desses receptores na formação de corpúsculos lipídicos tanto pelo reconhecimento de componentes da parede micobacteriana quanto pelo reconhecimento de células apoptóticas.

Diversos estudos tem descrito uma íntima relação entre os corpúsculos lipídicos e fagossomas contendo micobactérias. Análises utilizando microscopia eletrônica de transmissão foram realizadas com a finalidade de melhor observar a interação entre estas duas organelas. Nossos resultados mostraram pela imunomarcagem com ouro para ADRP que os corpúsculos lipídicos estão em associação com os fagossomas em 24 h de infecção por BCG *in vivo*. Dados semelhantes foram observados por Melo e col onde foi observada a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos durante a infecção por outro patógeno intracelular, o *T. cruzi* (Melo et al., 2003). Esses dados sugerem que os corpúsculos lipídicos podem estar atuando como fonte de carbono para o patógeno, uma vez que o fagossoma é um ambiente hostil e de privação de

nutrientes, favorecendo assim a sua sobrevivência. Durante 24 h de infecção por BCG *in vivo* observamos ainda estruturas sugestivas de corpúsculos lipídicos no interior dos fagossomas infectados. Sugerindo a fusão entre as duas organelas com a perda de continuidade da membrana dos corpúsculos lipídicos. Resultados semelhantes foram demonstrados por Russell e col onde também foi observado, não só a interação entre essas organelas, mas a presença de um fagossoma contendo o *M. tuberculosis* no interior de um corpúsculo lipídico, em estágios já avançados da infecção (Russell et al., 2009). Além disso, nossos resultados mostram ainda a bactéria embebida no conteúdo lipídico presente no fagossoma. Corroborando com nossos dados, imagens de microscopia confocal mostraram os fagossomas contendo *M. leprae* envolvido pelos corpúsculos lipídicos nas células de Schwann (Mattos et al., 2010b).

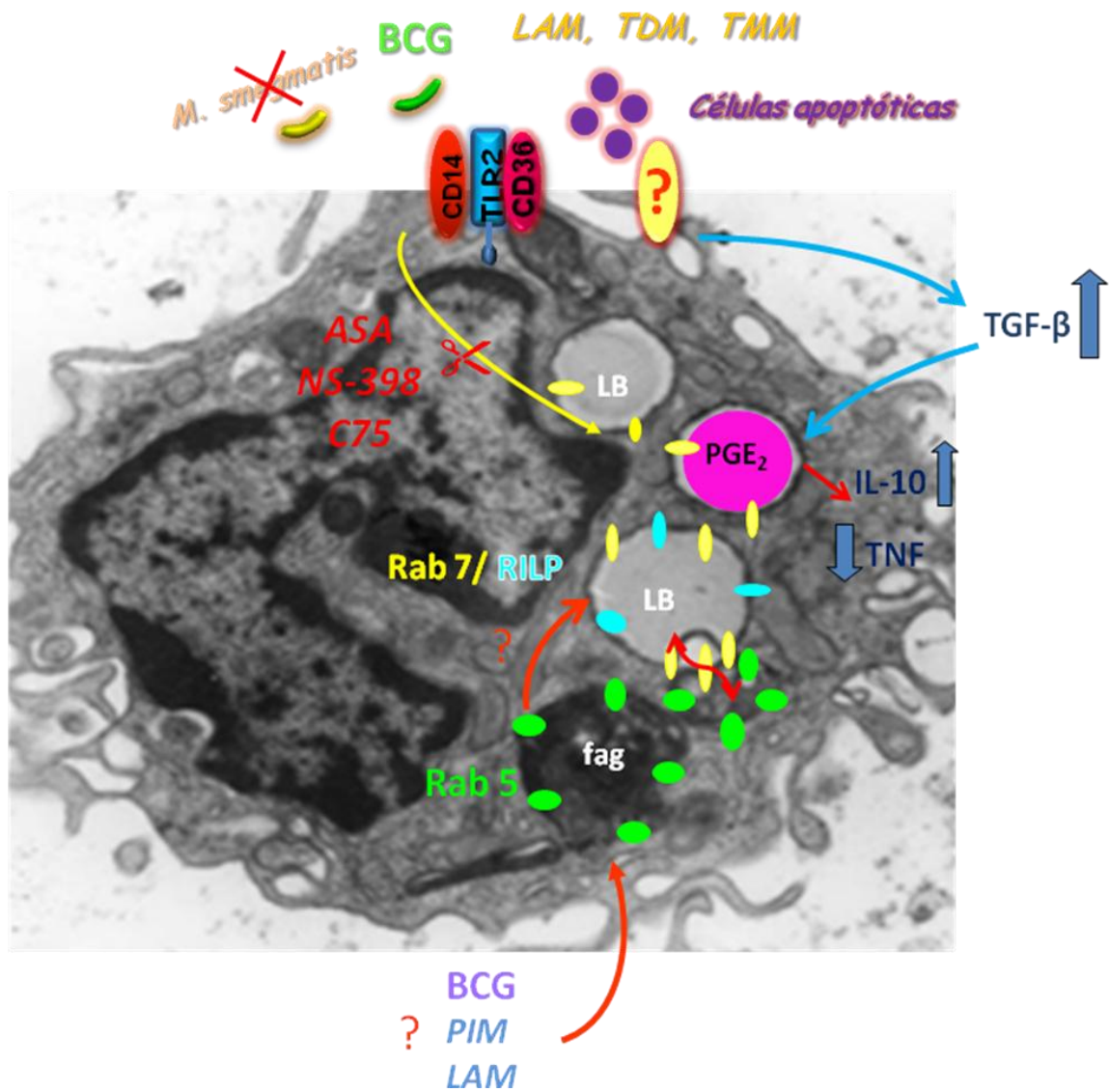
Durante nossas análises por microscopia de fluorescência observamos que existe uma proximidade dos corpúsculos lipídicos com os fagossomas quando utilizamos tanto a bactéria viva quanto a morta, em 24 h da infecção experimental por BCG, sugerindo um papel para os componentes da parede micobacteriana na modulação dessa interação. Investigamos o papel de componentes da parede micobacteriana nesse evento. Nossos resultados mostraram a interação de partículas de látex revestidas com LAM e PIM com os corpúsculos lipídicos, além de também ter sido observado o mesmo fenômeno com TDM e TMM (dados não mostrados), sugerindo que esses lipídios micobacterianos podem estar modulando a interação entre os fagossomas e os corpúsculos lipídicos. Contudo, esse fenômeno não foi observado quando utilizado as partículas de látex não revestidas. Beatty e col demonstraram o tráfego de lipídios da parede celular micobacteriana para a membrana dos fagossomos ou para outras organelas (Beatty et al., 2000; Beatty et al., 2001). Nossos dados até aqui sugerem um papel para os corpúsculos lipídicos como fonte de nutrientes para a manutenção da sobrevivência da micobactéria, bem como escape do sistema imune, uma vez que o bacilo estará revestido com componentes do próprio hospedeiro ou de uma maneira mais ampla podendo estar modulando a síntese de mediadores anti-inflamatórios, regulando negativamente a resposta do hospedeiro.

Propomos ainda, uma nova hipótese envolvendo os corpúsculos lipídicos no mecanismo de inibição da maturação fagossomal por *M. tuberculosis* vivo observada por Armstrong e Hart em 1971, contudo ainda sem explicação.

Uma importante característica do *M. tuberculosis* e do BCG é possuírem a capacidade de reter a proteína Rab5 no fagossoma, impedindo a troca pela Rab7 e, conseqüentemente, a maturação fagossomal (Fratti et al., 2001; Via et al., 1997). Trabalhos anteriores utilizando células U937, A431 e HuH7 (Fujimoto et al., 2004; Umlauf et al., 2004; Wan et al., 2007) demonstraram a presença de proteínas da família Rab em corpúsculos lipídicos de células não estimuladas. Em nosso trabalho, investigamos a presença dessas proteínas nos corpúsculos lipídicos, durante infecção experimental por BCG. Observamos por imunofluorescência que apesar da proteína Rab5 se apresentar próxima dos corpúsculos lipídicos, ela não foi observada co-localizada nestas organelas. Por outro lado, quando investigamos a proteína Rab7, observamos que a mesma encontrava-se co-localizada com os corpúsculos lipídicos, sugerindo que estas estruturas possam estar atuando de maneira importante na modulação da infecção, agindo como seqüestradores da Rab7 necessária para a maturação fagossomal. Além disso, nossas análises por microscopia eletrônica de transmissão não só confirmaram a presença da Rab7 nessas organelas como observaram a interação entre os fagossomos e os corpúsculos lipídicos exatamente na área de maior acúmulo de Rab7. Sugerindo que a Rab7 pode estar sendo seqüestrada para os corpúsculos lipídicos, como um mecanismo para impedir a maturação fagossomal. Para que a Rab7 presente nos fagossomas complete as etapas subseqüentes da via endocítica culminando com a maturação fagossomal, é necessária a sua ligação com a sua proteína efetora, a RILP (Harrison et al., 2003; Jordens et al., 2001). A RILP além de ser responsável por recrutar o complexo motor dineína-dinactina resultando na fusão dos fagossomos com os lisossomos, tem sido descrita como um marcador de ativação da proteína Rab7 pela sua capacidade de se ligar a ela somente quando está na sua forma ativa (GTP) (Cantalupo et al., 2001). Nossos resultados de imunofluorescência revelaram que a Rab7 presente nos corpúsculos lipídicos se encontram na sua forma ativa pela presença da proteína RILP encontrada nessas organelas em 24 e 48 h após a infecção experimental por BCG *in vivo*. Estudos futuros serão necessários para avaliar se o corpúsculo lipídico está de fato envolvido na maturação fagossomal através da modulação da sua formação e a avaliação do perfil de acidificação fagossomal apresentado.

Em conclusão, nossos resultados indicam que na infecção por BCG é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos pela indução de neutrófilos apoptóticos; por componentes da parede micobacteriana ou somente pela presença do bacilo. Demonstramos ainda que esse é um mecanismo altamente regulado e parcialmente dependente do reconhecimento celular através dos receptores CD14 e CD36. Além disso, nós sugerimos o possível papel dessas organelas como fontes de nutrientes para a bactéria e o seu envolvimento nos mecanismos de escape micobacteriano pela modulação da via endocítica em macrófagos.

Propomos no esquema abaixo, um modelo onde os nossos dados em conjunto com dados prévios do laboratório indicam um importante papel do BCG e de componentes da sua parede na formação dos corpúsculos e síntese de PGE₂ em um mecanismo dependente de receptor. Ainda, a inibição dos corpúsculos lipídicos, com conseqüente inibição de PGE₂ por aspirina, NS-398 e C75, mostraram-se capazes de modular a produção de citocinas como o TNF e IL-10, sugerindo um papel do anti-inflamatório para os corpúsculos lipídicos podendo dessa forma estar favorecendo a sobrevivência micobacteriana. Os mecanismos envolvidos na formação dos corpúsculos lipídicos através do reconhecimento e/ou fagocitose de células apoptóticas ainda é desconhecido. Contudo, dados prévios do nosso laboratório sugerem que o aumento da síntese do TGF- β pelo reconhecimento das células apoptóticas possa estar induzindo a formação dessas organelas, com o conseqüente aumento de PGE₂. Um outro mecanismo proposto aqui é a interação dos fagossomas com os corpúsculos lipídicos de uma maneira dependente de componentes da parede micobacteriana. Os componentes da parede podem estar modulando essa aproximação entre os corpúsculos e os fagossomas em benefício próprio. Onde o corpúsculo lipídico parece estar seqüestrando a Rab7 ativa dos fagossomas impedindo a maturação fagossomal. Além disso, a Rab7 pode estar intermediando o ponto de contato entre as duas organelas e possibilitando que haja a troca de conteúdo lipídico entre os corpúsculos lipídicos e os fagossomas.



Esquema 6 – Modelo proposto para a bigênese dos corpúsculos lipídicos e o seu papel na infecção experimental por *Mycobacterium bovis*, BCG.

6) *Conclusões*

- O *Mycobacterium bovis*, BCG foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, migração de neutrófilos para a cavidade torácica e apoptose dessas células.

- Os resultados demonstraram que os neutrófilos apoptóticos são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*, sendo amplificada a sua formação quando em presença da infecção.

- Foi observado o envolvimento dos receptores CD36 e CD14 na indução dos corpúsculos lipídicos na infecção experimental por BCG.

- Diferentes componentes da parede micobacteriana, foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos e foram observados em interação com essas organelas.

- A interação dos fagossomas e corpúsculos lipídicos via Rab7 e a presença dessas organelas no interior de fagossomas infectados.

- Esse trabalho demonstrou a presença da Rab7, mas não da Rab5, na superfície dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG.

- Foi observado a co-localização da proteína Rlp com os corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG sugerindo que a Rab7 observada nessas organelas está na sua forma ativa.

✓ Os resultados mostraram diferentes mecanismos envolvidos na biogênese dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG sugerindo que a modulação dessas organelas pelo patógeno podem representar um importante mecanismo de escape da resposta imune do hospedeiro.

7) Referências Bibliográficas

- Aderem, A. and D.M. Underhill. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol.* 17: 593-623.
- Akira, S. 2006. TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol.* 311: 1-16.
- Akira, S. and K. Hoshino. 2003. Myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent pathways in toll-like receptor signaling. *J Infect Dis.* 187 Suppl 2: S356-363.
- Aleman, M., S.S. de la Barrera, P.L. Schierloh, L. Alves, N. Yokobori, M. Baldini, E. Abbate, and M.C. Sasiain. 2005. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis.* 192: 399-409.
- Aleman, M., A. Garcia, M.A. Saab, S.S. De La Barrera, M. Finiasz, E. Abbate, and M.C. Sasiain. 2002. Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27: 583-592.
- Algood, H.M., J. Chan, and J.L. Flynn. 2003. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14: 467-477.
- Aliberti, J. and A. Bafica. 2005. Anti-inflammatory pathways as a host evasion mechanism for pathogens. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.*
- Almeida, P.E., A.R. Silva, C.M. Maya-Monteiro, D. Torocsik, H. D'Avila, B. Dezso, K.G. Magalhaes, H.C. Castro-Faria-Neto, L. Nagy, and P.T. Bozza. 2009. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. *J Immunol.* 183: 1337-1345.
- Anes, E., M.P. Kuhnel, E. Bos, J. Moniz-Pereira, A. Habermann, and G. Griffiths. 2003. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol.* 5: 793-802.
- Antony, V.B., S.A. Sahn, A.C. Antony, and J.E. Repine. 1985. Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest.* 76: 1514-1521.
- Appelberg, R. 2007. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol.* 15: 87-92.
- Appelberg, R., A.G. Castro, S. Gomes, J. Pedrosa, and M.T. Silva. 1995. Susceptibility of beige mice to Mycobacterium avium: role of neutrophils. *Infect Immun.* 63: 3381-3387.
- Atshaves, B.P., S.M. Storey, A.L. McIntosh, A.D. Petrescu, O.I. Lyuksyutova, A.S. Greenberg, and F. Schroeder. 2001. Sterol carrier protein-2 expression modulates protein and lipid composition of lipid droplets. *J Biol Chem.* 276: 25324-25335.
- Bandeira-Melo, C., M. Phoofolo, and P.F. Weller. 2001a. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 276: 22779-22787.
- Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L.J. Woods, M. Phoofolo, D.M. Center, W.W. Cruikshank, and P.F. Weller. 2002. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol.* 168: 4756-4763.

- Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L.J. Woods, and P.F. Weller. 2001b. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *J Immunol.* 166: 4813-4817.
- Bartemes, K.R., S. McKinney, G.J. Gleich, and H. Kita. 1999. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol.* 162: 2982-2989.
- Bartz, R., J.K. Zehmer, M. Zhu, Y. Chen, G. Serrero, Y. Zhao, and P. Liu. 2007. Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J Proteome Res.* 6: 3256-3265.
- Bean, A.G., D.R. Roach, H. Briscoe, M.P. France, H. Korner, J.D. Sedgwick, and W.J. Britton. 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol.* 162: 3504-3511.
- Beatty, W.L., E.R. Rhoades, H.J. Ullrich, D. Chatterjee, J.E. Heuser, and D.G. Russell. 2000. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic.* 1: 235-247.
- Beatty, W.L., H.J. Ullrich, and D.G. Russell. 2001. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol.* 80: 31-40.
- Berrington, W.R. and T.R. Hawn. 2007. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev.* 219: 167-186.
- Betz, M. and B.S. Fox. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 146: 108-113.
- Blaas, S.H., R. Mutterlein, J. Weig, A. Neher, B. Salzberger, N. Lehn, and L. Naumann. 2008. Extensively drug resistant tuberculosis in a high income country: a report of four unrelated cases. *BMC Infect Dis.* 8: 60.
- Bombardier, C.H. and A.W. Heinemann. 2000. The construct validity of the readiness to change questionnaire for persons with TBI. *J Head Trauma Rehabil.* 15: 696-709.
- Bozza, P.T. and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 113-120.
- Bozza, P.T., K.G. Magalhaes, and P.F. Weller. 2009a. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* doi:10.1016/j.bbaliip.2009.01.005.
- Bozza, P.T., K.G. Magalhaes, and P.F. Weller. 2009b. Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1791: 540-551.
- Bozza, P.T., R.C. Melo, and C. Bandeira-Melo. 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther.* 113: 30-49.
- Bozza, P.T., P. Pacheco, W. Yu, and P.F. Weller. 2002. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 67: 237-244.
- Bozza, P.T., J.L. Payne, J.L. Goulet, and P.F. Weller. 1996a. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183: 1515-1525.

- Bozza, P.T., J.L. Payne, S.G. Morham, R. Langenbach, O. Smithies, and P.F. Weller. 1996b. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 11091-11096.
- Bozza, P.T. and P.F. Weller. 2001. Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 64: 227-230.
- Bozza, P.T., W. Yu, J. Cassara, and P.F. Weller. 1998. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol.* 64: 563-569.
- Bozza, P.T., W. Yu, J.F. Penrose, E.S. Morgan, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 1997. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 186: 909-920.
- Brasaemle, D.L., T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res.* 38: 2249-2263.
- Brightbill, H.D., D.H. Libraty, S.R. Krutzik, R.B. Yang, J.T. Belisle, J.R. Bleharski, M. Maitland, M.V. Norgard, S.E. Plevy, S.T. Smale, P.J. Brennan, B.R. Bloom, P.J. Godowski, and R.L. Modlin. 1999. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science.* 285: 732-736.
- Brown, A.E., T.J. Holzer, and B.R. Andersen. 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 156: 985-989.
- Brown, D.A. 2001. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol.* 11: R446-449.
- Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils, and M. Ardit. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol.* 167: 987-994.
- Camirero, J.A. 2006. Treatment of multidrug-resistant tuberculosis: evidence and controversies. *Int J Tuberc Lung Dis.* 10: 829-837.
- Cantalupo, G., P. Alifano, V. Roberti, C.B. Bruni, and C. Bucci. 2001. Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes. *Embo J.* 20: 683-693.
- Cao, F., A. Castrillo, P. Tontonoz, F. Re, and G.I. Byrne. 2007. *Chlamydia pneumoniae*-induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun.* 75: 753-759.
- Cardona, P.J. and V. Ausina. 2000a. [Delayed-type hypersensitivity and caseous necrosis in tuberculous granuloma. New ideas for the design of a new vaccine against human tuberculosis]. *Med Clin (Barc).* 115: 503-509.
- Cardona, P.J. and V. Ausina. 2000b. [Histopathology of tuberculosis. Approximation to the clinical course of lung lesions in animal experimentation models induced with aerosols]. *Arch Bronconeumol.* 36: 645-650.
- Cardona, P.J., S. Gordillo, J. Diaz, G. Tapia, I. Amat, A. Pallares, C. Vilaplana, A. Ariza, and V. Ausina. 2003. Widespread bronchogenic dissemination makes DBA/2 mice more susceptible than C57BL/6 mice to experimental aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 71: 5845-5854.

- Cardona, P.J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguren, A. Ariza, and V. Ausina. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol.* 52: 156-163.
- Chan, E.D., V. Laurel, M.J. Strand, J.F. Chan, M.L. Huynh, M. Goble, and M.D. Iseman. 2004. Treatment and outcome analysis of 205 patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 169: 1103-1109.
- Chang, T.Y., C.C. Chang, X. Lu, and S. Lin. 2001. Catalysis of ACAT may be completed within the plane of the membrane: a working hypothesis. *J Lipid Res.* 42: 1933-1938.
- Charron, A.J. and L.D. Sibley. 2002. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci.* 115: 3049-3059.
- Chen, J.S., A.S. Greenberg, and S.M. Wang. 2002. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem.* 86: 784-791.
- Christiansen, K. and P.K. Jensen. 1972. Membrane-bound lipid particles from beef heart. Chemical composition and structure. *Biochim Biophys Acta.* 260: 449-459.
- Clausen, M.K., K. Christiansen, P.K. Jensen, and O. Behnke. 1974. Isolation of lipid particles from baker's yeast. *FEBS Lett.* 43: 176-179.
- Cole, S.T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C.E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M.A. Quail, M.A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J.E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B.G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393: 537-544.
- Compton, T., E.A. Kurt-Jones, K.W. Boehme, J. Belko, E. Latz, D.T. Golenbock, and R.W. Finberg. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol.* 77: 4588-4596.
- Cooper, A.M., A. Kipnis, J. Turner, J. Magram, J. Ferrante, and I.M. Orme. 2002. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol.* 168: 1322-1327.
- Cooper, A.M., J. Magram, J. Ferrante, and I.M. Orme. 1997. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med.* 186: 39-45.
- Corbett, E.L., B. Marston, G.J. Churchyard, and K.M. De Cock. 2006. Tuberculosis in sub-Saharan Africa: opportunities, challenges, and change in the era of antiretroviral treatment. *Lancet.* 367: 926-937.
- Corbett, E.L., C.J. Watt, N. Walker, D. Maher, B.G. Williams, M.C. Raviglione, and C. Dye. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Arch Intern Med.* 163: 1009-1021.
- Cosma, C.L., O. Humbert, and L. Ramakrishnan. 2004. Superinfecting mycobacteria home to established tuberculous granulomas. *Nat Immunol.* 5: 828-835.
- D'Avila, H., P.E. Almeida, N.R. Roque, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2007. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infect Immun.* 75: 1507-1511.

- D'Avila, H., C.M. Maya-Monteiro, and P.T. Bozza. 2008a. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*.
- D'Avila, H., R.C. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro Faria Neto, and P.T. Bozza. 2006. Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology*. 176: 3087-3097.
- D'Avila, H., N.R. Roque, R.M. Cardoso, H.C. Castro-Faria-Neto, R.C. Melo, and P.T. Bozza. 2008b. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol*. 10: 2589-2604.
- Daddi. 1896. Nouvelle méthode pour colorer la graisse dans les tissues. *Archives Italiennes de Biologie*. 26:142.
- Dahl, K.E., H. Shiratsuchi, B.D. Hamilton, J.J. Ellner, and Z. Toossi. 1996. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 64: 399-405.
- de Assis, E.F., A.R. Silva, L.F. Caiado, G.K. Marathe, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, P.T. Bozza, and H.C. de Castro-Faria-Neto. 2003. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 171: 2090-2098.
- de Hostos, E.L. 1999. The coronin family of actin-associated proteins. *Trends Cell Biol*. 9: 345-350.
- Desjardins, M. 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the 'kiss and run' hypothesis. *Trends Cell Biol*. 5: 183-186.
- Devitt, A., O.D. Moffatt, C. Raykundalia, J.D. Capra, D.L. Simmons, and C.D. Gregory. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 392: 505-509.
- Dheda, K., H. Booth, J.F. Huggett, M.A. Johnson, A. Zumla, and G.A. Rook. 2005. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis*. 192: 1201-1209.
- Ding, A.H., C.F. Nathan, and D.J. Stuehr. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 141: 2407-2412.
- Dvorak, A.M., H.F. Dvorak, S.P. Peters, E.S. Shulman, D.W. MacGlashan, Jr., K. Pyne, V.S. Harvey, S.J. Galli, and L.M. Lichtenstein. 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol*. 131: 2965-2976.
- Dvorak, A.M. and R. Monahan-Early. 1992. *Diagnostic Ultrastructural Pathology I*. CRC Press.
- Dvorak, A.M., E. Morgan, R.P. Schleimer, S.W. Ryeom, L.M. Lichtenstein, and P.F. Weller. 1992. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J Histochem Cytochem*. 40: 759-769.

- Dvorak, A.M., E.S. Morgan, and P.F. Weller. 2001. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochem J.* 33: 397-402.
- Dvorak, A.M., P.F. Weller, V.S. Harvey, E.S. Morgan, and H.F. Dvorak. 1993. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 101: 136-142.
- Eker, B., J. Ortmann, G.B. Migliori, G. Sotgiu, R. Muetterlein, R. Centis, H. Hoffmann, D. Kirsten, T. Schaberg, S. Ruesch-Gerdes, and C. Lange. 2008. Multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis, Germany. *Emerg Infect Dis.* 14: 1700-1706.
- Endemann, G., L.W. Stanton, K.S. Madden, C.M. Bryant, R.T. White, and A.A. Protter. 1993. CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 268: 11811-11816.
- Eruslanov, E.B., I.V. Lyadova, T.K. Kondratieva, K.B. Majorov, I.V. Scheglov, M.O. Orlova, and A.S. Apt. 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun.* 73: 1744-1753.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 101: 890-898.
- Fadok, V.A., J.S. Savill, C. Haslett, D.L. Bratton, D.E. Doherty, P.A. Campbell, and P.M. Henson. 1992. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* 149: 4029-4035.
- Febbraio, M., D.P. Hajjar, and R.L. Silverstein. 2001. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 108: 785-791.
- Feng, C.G., M. Kaviratne, A.G. Rothfuchs, A. Cheever, S. Hieny, H.A. Young, T.A. Wynn, and A. Sher. 2006. NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 177: 7086-7093.
- Fenton, M.J. and M.W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 64: 683-690.
- Ferrari, G., H. Langen, M. Naito, and J. Pieters. 1999. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell.* 97: 435-447.
- Flannagan, R.S., G. Cosio, and S. Grinstein. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 7: 355-366.
- Flesch, I. and S.H. Kaufmann. 1987. Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 138: 4408-4413.
- Flesch, I.E., J.H. Hess, I.P. Oswald, and S.H. Kaufmann. 1994. Growth inhibition of *Mycobacterium bovis* by IFN-gamma stimulated macrophages: regulation by endogenous tumor necrosis factor-alpha and by IL-10. *Int Immunol.* 6: 693-700.

- Flynn, J.L. and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19: 93-129.
- Flynn, J.L. and J. Chan. 2005. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol.* 13: 98-102.
- Flynn, J.L., M.M. Goldstein, J. Chan, K.J. Triebold, K. Pfeffer, C.J. Lowenstein, R. Schreiber, T.W. Mak, and B.R. Bloom. 1995. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity.* 2: 561-572.
- Fratti, R.A., J.M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 154: 631-644.
- Fratti, R.A., J. Chua, I. Vergne, and V. Deretic. 2003. Mycobacterium tuberculosis glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 5437-5442.
- Freire-de-Lima, C.G., D.O. Nascimento, M.B. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. de Mello, G.A. DosReis, and M.F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403: 199-203.
- Fremont, C.M., D.M. Nicolle, D.S. Torres, and V.F. Quesniaux. 2003. Control of *Mycobacterium bovis* BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. *Microbes Infect.* 5: 1070-1081.
- Frieden, T.R., T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. Watt, and C. Dye. 2003. Tuberculosis. *Lancet.* 362: 887-899.
- Fujimoto, Y., H. Itabe, J. Sakai, M. Makita, J. Noda, M. Mori, Y. Higashi, S. Kojima, and T. Takano. 2004. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta.* 1644: 47-59.
- Galli, C., A. Petroni, and A. Borghi. 1985. Modification of brain vascular eicosanoids after pharmacological treatment and ischemia in the rat: drugs and brain vascular eicosanoids. *Cephalalgia.* 5 Suppl 2: 79-81.
- Gandhi, N.R., A. Moll, A.W. Sturm, R. Pawinski, T. Govender, U. Lalloo, K. Zeller, J. Andrews, and G. Friedland. 2006. Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet.* 368: 1575-1580.
- Gao, J. and G. Serrero. 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem.* 274: 16825-16830.
- Gatfield, J. and J. Pieters. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science.* 288: 1647-1650.
- Gay, N.J. and F.J. Keith. 1991. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature.* 351: 355-356.
- Gilleron, M., V.F. Quesniaux, and G. Puzo. 2003. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem.* 278: 29880-29889.
- Glickman, M.S., J.S. Cox, and W.R. Jacobs, Jr. 2000. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Cell.* 5: 717-727.

- Gong, J.H., M. Zhang, R.L. Modlin, P.S. Linsley, D. Iyer, Y. Lin, and P.F. Barnes. 1996. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infect Immun.* 64: 913-918.
- Gonzalez-Juarrero, M., O.C. Turner, J. Turner, P. Marietta, J.V. Brooks, and I.M. Orme. 2001. Temporal and spatial arrangement of lymphocytes within lung granulomas induced by aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 69: 1722-1728.
- Gordon, A.H., P.D. Hart, and M.R. Young. 1980. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature.* 286: 79-80.
- Griffith, T.S., X. Yu, J.M. Herndon, D.R. Green, and T.A. Ferguson. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 5: 7-16.
- Harrison, R.E., C. Bucci, O.V. Vieira, T.A. Schroer, and S. Grinstein. 2003. Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol.* 23: 6494-6506.
- Hart, P.D., M.R. Young, M.M. Jordan, W.J. Perkins, and M.J. Geisow. 1983. Chemical inhibitors of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages also inhibit saltatory lysosomal movements. A combined microscopic and computer study. *J Exp Med.* 158: 477-492.
- Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell.* 52: 269-279.
- Heery, J.M., M. Kozak, D.M. Stafforini, D.A. Jones, G.A. Zimmerman, T.M. McIntyre, and S.M. Prescott. 1995. Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 96: 2322-2330.
- Heid, H.W., R. Moll, I. Schwetlick, H.R. Rackwitz, and T.W. Keenan. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294: 309-321.
- Heldwein, K.A., M.D. Liang, T.K. Andresen, K.E. Thomas, A.M. Marty, N. Cuesta, S.N. Vogel, and M.J. Fenton. 2003. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J Leukoc Biol.* 74: 277-286.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda, and S. Akira. 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol.* 3: 196-200.
- Hernandez-Pando, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina, and G. Rook. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun.* 65: 3317-3327.
- Hirsch, C.S., J.J. Ellner, R. Blinkhorn, and Z. Toossi. 1997. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 3926-3931.

- Hocking, W.G. and D.W. Golde. 1979a. The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *N Engl J Med.* 301: 580-587.
- Hocking, W.G. and D.W. Golde. 1979b. The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts). *N Engl J Med.* 301: 639-645.
- Hodges, B.D. and C.C. Wu. Proteomic insights into an expanded cellular role for cytoplasmic lipid droplets. *J Lipid Res.* 51: 262-273.
- Hoheisel, G., L. Zheng, H. Teschler, I. Striz, and U. Costabel. 1995. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest.* 108: 1614-1616.
- Honer zu Bentrup, K. and D.G. Russell. 2001. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol.* 9: 597-605.
- Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109: 41-50.
- Inazawa, Y., M. Nakatsu, E. Yasugi, K. Saeki, and A. Yuo. 2003. Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cell Struct Funct.* 28: 487-493.
- Jayachandran, R., V. Sundaramurthy, B. Combaluzier, P. Mueller, H. Korf, K. Huygen, T. Miyazaki, I. Albrecht, J. Massner, and J. Pieters. 2007. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell.* 130: 37-50.
- Jones, G.S., H.J. Amirault, and B.R. Andersen. 1990. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *J Infect Dis.* 162: 700-704.
- Jordens, I., M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts, and J. Neefjes. 2001. The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Curr Biol.* 11: 1680-1685.
- Kaisho, T. and S. Akira. 2000. Critical roles of Toll-like receptors in host defense. *Crit Rev Immunol.* 20: 393-405.
- Kawai, T. and S. Akira. 2005. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther.* 7: 12-19.
- Keane, J., M.K. Balcewicz-Sablinska, H.G. Remold, G.L. Chupp, B.B. Meek, M.J. Fenton, and H. Kornfeld. 1997. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 65: 298-304.
- Kobe, B. and J. Deisenhofer. 1995. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol.* 5: 409-416.
- Koch, R. 1890. Koch on Bacteriology. *Science.* 16: 169-170.
- Koul, A., T. Herget, B. Klebl, and A. Ullrich. 2004. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol.* 2: 189-202.
- Kuerschner, L., C. Moessinger, and C. Thiele. 2008. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic.* 9: 338-352.
- Kumar, Y., J. Cocchiario, and R.H. Valdivia. 2006. The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr Biol.* 16: 1646-1651.
- Kusminski, C.M., S. Shetty, L. Orci, R.H. Unger, and P.E. Scherer. 2009. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 14: 1484-1495.
- Lass, A., R. Zimmermann, G. Haemmerle, M. Riederer, G. Schoiswohl, M. Schweiger, P. Kienesberger, J.G. Strauss, G. Gorkiewicz, and R. Zechner. 2006. Adipose

- triglyceride lipase-mediated lipolysis of cellular fat stores is activated by CGI-58 and defective in Chanarin-Dorfman Syndrome. *Cell Metab.* 3: 309-319.
- Leite, M.S., P. Pacheco, R.N. Gomes, A.T. Guedes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, and V.L.G. Koatz. 2005. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock.* 23.
- Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J.M. Reichhart, and J.A. Hoffmann. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 86: 973-983.
- Lien, E., T.J. Sellati, A. Yoshimura, T.H. Flo, G. Rawadi, R.W. Finberg, J.D. Carroll, T. Espevik, R.R. Ingalls, J.D. Radolf, and D.T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem.* 274: 33419-33425.
- Lim, K.G., H.C. Wan, P.T. Bozza, M.B. Resnick, D.T. Wong, W.W. Cruikshank, H. Kornfeld, D.M. Center, and P.F. Weller. 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol.* 156: 2566-2570.
- Lin, Y., M. Zhang, F.M. Hofman, J. Gong, and P.F. Barnes. 1996. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun.* 64: 1351-1356.
- Londos, C., D.L. Brasaemle, J. Gruia-Gray, D.A. Servetnick, C.J. Schultz, D.M. Levin, and A.R. Kimmel. 1995. Perilipin: unique proteins associated with intracellular neutral lipid droplets in adipocytes and steroidogenic cells. *Biochem Soc Trans.* 23: 611-615.
- Londos, C., D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, J.P. Segrest, and A.R. Kimmel. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 10: 51-58.
- Londos, C., C. Sztalryd, J.T. Tansey, and A.R. Kimmel. 2005. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 87: 45-49.
- Magalhaes, K.G., P.E. Almeida, G.C. Atella, C.M. Maya-Monteiro, H.C. Castro-Faria-Neto, M. Pelajo-Machado, H.L. Lenzi, M.T. Bozza, and P.T. Bozza. 2010. Schistosomal-derived lysophosphatidylcholine are involved in eosinophil activation and recruitment through Toll-like receptor-2-dependent mechanisms. *J Infect Dis.* 202: 1369-1379.
- Makinoshima, H. and M.S. Glickman. 2005. Regulation of *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope composition and virulence by intramembrane proteolysis. *Nature.* 436: 406-409.
- Martin, S. and R.G. Parton. 2006. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7: 373-378.
- Martin, S.P. and S.N. Chaudhuri. 1952. Effect of bacteria and their products on migration of leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 81: 286-288.
- Mattos, K.A., H. D'Avila, L.S. Rodrigues, V.G. Oliveira, E.N. Sarno, G.C. Atella, G.M. Pereira, P.T. Bozza, and M.C. Pessolani. 2010a. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol.* 87: 371-384.
- Mattos, K.A., F.A. Lara, V.G. Oliveira, L.S. Rodrigues, H. D'Avila, R.C. Melo, P.P. Manso, E.N. Sarno, P.T. Bozza, and M.C. Pessolani. 2010b. Modulation of lipid

- droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol.* 13: 259-273.
- May, M.E. and P.J. Spagnuolo. 1987. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 55: 2304-2307.
- Maya-Monteiro, C.M., P.E. Almeida, H. D'Avila, A.S. Martins, A.P. Rezende, H. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2008. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 283: 2203-2210.
- Means, T.K., B.W. Jones, A.B. Schromm, B.A. Shurtleff, J.A. Smith, J. Keane, D.T. Golenbock, S.N. Vogel, and M.J. Fenton. 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol.* 166: 4074-4082.
- Means, T.K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 163: 6748-6755.
- Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr. 1997. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 9: 4-9.
- Melo, R.C. 1999. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell.* 31: 281-290.
- Melo, R.C., H. D'Avila, D.L. Fabrino, P.E. Almeida, and P.T. Bozza. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 35: 59-67.
- Melo, R.C., S.A. Perez, L.A. Spencer, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 2005. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic.* 6: 866-879.
- Menezes-de-Lima-Junior, O. and M.d.G. Henriques. 1997. Mechanisms of cell accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92 Suppl 2: 227-232.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R.S. Cordeiro, and M.G. Henriques. 1997. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 62: 778-785.
- Mesquita-Santos, F.P., A. Vieira-de-Abreu, A.S. Calheiros, I.H. Figueiredo, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, P.T. Bozza, B.L. Diaz, and C. Bandeira-Melo. 2006. Cutting Edge: Prostaglandin D2 Enhances Leukotriene C4 Synthesis by Eosinophils during Allergic Inflammation: Synergistic In Vivo Role of Endogenous Eotaxin. *J Immunol.* 176: 1326-1330.
- Michelsen, K.S., A. Aicher, M. Mohaupt, T. Hartung, S. Dimmeler, C.J. Kirschning, and R.R. Schumann. 2001. The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem.* 276: 25680-25686.
- Miyanari, Y., K. Atsuzawa, N. Usuda, K. Watashi, T. Hishiki, M. Zayas, R. Bartenschlager, T. Wakita, M. Hijikata, and K. Shimotohno. 2007. The lipid

- droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol.* 9: 1089-1097.
- Mohan, V.P., C.A. Scanga, K. Yu, H.M. Scott, K.E. Tanaka, E. Tsang, M.M. Tsai, J.L. Flynn, and J. Chan. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 69: 1847-1855.
- Morris, K.R., R.D. Lutz, H.S. Choi, T. Kamitani, K. Chmura, and E.D. Chan. 2003. Role of the NF-kappaB signaling pathway and kappaB cis-regulatory elements on the IRF-1 and iNOS promoter regions in mycobacterial lipoarabinomannan induction of nitric oxide. *Infect Immun.* 71: 1442-1452.
- Munoz-Elias, E.J. and J.D. McKinney. 2005. Mycobacterium tuberculosis isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for in vivo growth and virulence. *Nat Med.* 11: 638-644.
- Murphy, D.J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 40: 325-438.
- Nguyen, L. and J. Pieters. 2005. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Trends Cell Biol.* 15: 269-276.
- Nilsen, N.J., S. Deininger, U. Nonstad, F. Skjeldal, H. Husebye, D. Rodionov, S. von Aulock, T. Hartung, E. Lien, O. Bakke, and T. Espevik. 2008. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling; role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol.*
- Nishikawa, Y., F. Quittnat, T.T. Stedman, D.R. Voelker, J.Y. Choi, M. Zahn, M. Yang, M. Pypaert, K.A. Joiner, and I. Coppens. 2005. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular Toxoplasma. *Cell Microbiol.* 7: 849-867.
- Ohsaki, Y., J. Cheng, A. Fujita, T. Tokumoto, and T. Fujimoto. 2006. Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol Biol Cell.* 17: 2674-2683.
- Oliveira, R.B., M.T. Ochoa, P.A. Sieling, T.H. Rea, A. Rambukkana, E.N. Sarno, and R.L. Modlin. 2003. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun.* 71: 1427-1433.
- Olle-Goig, J.E. 2006. Editorial: the treatment of multi-drug resistant tuberculosis--a return to the pre-antibiotic era? *Trop Med Int Health.* 11: 1625-1628.
- Orme, I.M. and A.M. Cooper. 1999. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today.* 20: 307-312.
- Ozeki, S., J. Cheng, K. Tauchi-Sato, N. Hatano, H. Taniguchi, and T. Fujimoto. 2005. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci.* 118: 2601-2611.
- Pacheco, P., F.A. Bozza, R.N. Gomes, M. Bozza, P.F. Weller, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169: 6498-6506.
- Pacheco, P., A. Vieira-de-Abreu, R.N. Gomes, G. Barbosa-Lima, L.B. Wermelinger, C.M. Maya-Monteiro, A.R. Silva, M.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, C. Bandeira-Melo, and P.T. Bozza. 2007. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-

- synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol.* 179: 8500-8508.
- Pandey, A.K. and C.M. Sasseti. 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105: 4376-4380.
- Pauligk, C., M. Nain, N. Reiling, D. Gemsa, and A. Kaufmann. 2004. CD14 is required for influenza A virus-induced cytokine and chemokine production. *Immunobiology.* 209: 3-10.
- Penido, C., A. Vieira-de-Abreu, M.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2003. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol.* 171: 6788-6794.
- Peters, W., H.M. Scott, H.F. Chambers, J.L. Flynn, I.F. Charo, and J.D. Ernst. 2001. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 7958-7963.
- Peterson, P.K., G. Gekker, S. Hu, W.S. Sheng, W.R. Anderson, R.J. Ulevitch, P.S. Tobias, K.V. Gustafson, T.W. Molitor, and C.C. Chao. 1995. CD14 receptor-mediated uptake of nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by human microglia. *Infect Immun.* 63: 1598-1602.
- Peyron, P., J. Vaubourgeix, Y. Poquet, F. Levillain, C. Botanch, F. Bardou, M. Daffe, J.F. Emile, B. Marchou, P.J. Cardona, C. de Chastellier, and F. Altare. 2008. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog.* 4: e1000204.
- Philips, J.A., E.J. Rubin, and N. Perrimon. 2005. *Drosophila* RNAi screen reveals CD36 family member required for mycobacterial infection. *Science.* 309: 1251-1253.
- Pinheiro, R.O., M.P. Nunes, C.S. Pinheiro, H. D'Avila, P.T. Bozza, C.M. Takiya, S. Corte-Real, C.G. Freire-de-Lima, and G.A. DosReis. 2009. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* 11: 181-190.
- Plotkowski, M.C., B.A. Brandão, M.C. Assis, L.F.P. Feliciano, A.S. Saliba, B. Raymond, E.A. Marques, J.M. Zahm, L. Touqui, and P.T. Bozza. 2008. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microbial Pathogenesis.*
- Prescott, S.M., G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini, and T.M. McIntyre. 2000. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 69: 419-445.
- Pugin, J., I.D. Heumann, A. Tomasz, V.V. Kravchenko, Y. Akamatsu, M. Nishijima, M.P. Glauser, P.S. Tobias, and R.J. Ulevitch. 1994. CD14 is a pattern recognition receptor. *Immunity.* 1: 509-516.
- Raja, A. 2004. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res.* 120: 213-232.
- Randhawa, P.S. 1990. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. *Pathology.* 22: 153-155.
- Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. 2002. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 106: 257-266.
- Raviglione, M. 2006. XDR-TB: entering the post-antibiotic era? *Int J Tuberc Lung Dis.* 10: 1185-1187.

- Reiling, N., C. Holscher, A. Fehrenbach, S. Kroger, C.J. Kirschning, S. Goyert, and S. Ehlers. 2002. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 169: 3480-3484.
- Renz, H., J.H. Gong, A. Schmidt, M. Nain, and D. Gems. 1988. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol.* 141: 2388-2393.
- Rhoades, E.R., A.M. Cooper, and I.M. Orme. 1995. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 63: 3871-3877.
- Ridley, D.S. and M.J. Ridley. 1987. Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification. *Pathology.* 19: 186-192.
- Riedel, D.D. and S.H. Kaufmann. 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 65: 4620-4623.
- Riley, R.L., C.C. Mills, W. Nyka, N. Weinstock, P.B. Storey, L.U. Sultan, M.C. Riley, and W.F. Wells. 1995. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959. *Am J Epidemiol.* 142: 3-14.
- Robenek, H., O. Hofnagel, I. Buers, M.J. Robenek, D. Troyer, and N.J. Severs. 2006. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *J Cell Sci.* 119: 4215-4224.
- Robenek, H. and N.J. Severs. 2009. Lipid droplet growth by fusion: insights from freeze-fracture imaging. *J Cell Mol Med.* 13: 4657-4661.
- Robenek, M.J., N.J. Severs, K. Schlattmann, G. Plenz, K.P. Zimmer, D. Troyer, and H. Robenek. 2004. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J.* 18: 866-868.
- Rock, F.L., G. Hardiman, J.C. Timans, R.A. Kastelein, and J.F. Bazan. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 588-593.
- Roessler, P.G. 1988. Changes in the activities of various lipid and carbohydrate biosynthetic enzymes in the diatom *Cyclotella cryptica* in response to silicon deficiency. *Arch Biochem Biophys.* 267: 521-528.
- Rojas, M., L.F. Barrera, G. Puzo, and L.F. Garcia. 1997. Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. *J Immunol.* 159: 1352-1361.
- Rojas, M., M. Olivier, P. Gros, L.F. Barrera, and L.F. Garcia. 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol.* 162: 6122-6131.
- Rothenberg, M.E. and S.P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu Rev Immunol.* 24: 147-174.
- Rubin, H. and R.N. Trelease. 1976. Subcellular localization of glyoxylate cycle enzymes in *Ascaris suum* larvae. *J Cell Biol.* 70: 374-383.
- Russell, D.G. 2003. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat Cell Biol.* 5: 776-778.
- Russell, D.G. 2007. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol.* 5: 39-47.

- Russell, D.G., P.J. Cardona, M.J. Kim, S. Allain, and F. Altare. 2009. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol.* 10: 943-948.
- Russell, D.G., H.C. Mwandumba, and E.E. Rhoades. 2002. Mycobacterium and the coat of many lipids. *J Cell Biol.* 158: 421-426.
- Sadek, M.I., E. Sada, Z. Toossi, S.K. Schwander, and E.A. Rich. 1998. Chemokines induced by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 19: 513-521.
- Saiga, H., Y. Shimada, and K. Takeda. 2011. Innate immune effectors in mycobacterial infection. *Clin Dev Immunol.* 2011: 347594.
- Salluh, J.I., A.V. Pino, A.R. Silva, R.N. Gomes, H.S. Souza, J.R. e Silva, F.C. Jandre, A. Giannella-Neto, G.A. Zimmerman, D.M. Stafforini, S.M. Prescott, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, and F.A. Bozza. 2007. Lung production of platelet-activating factor acetylhydrolase in oleic acid-induced acute lung injury. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 77: 1-8.
- Samsa, M.M., J.A. Mondotte, N.G. Iglesias, I. Assuncao-Miranda, G. Barbosa-Lima, A.T. Da Poian, P.T. Bozza, and A.V. Gamarnik. 2009. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 5: e1000632.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343: 170-173.
- Savill, J., N. Hogg, and C. Haslett. 1991. Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest.* 99: 6S-7S.
- Schlesinger, L.S., S.R. Hull, and T.M. Kaufman. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol.* 152: 4070-4079.
- Schluger, N.W. and W.N. Rom. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 679-691.
- Schmitz, G. and E. Orso. 2002. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol.* 13: 513-521.
- Scott, M.J. and T.R. Billiar. 2008. Beta2-integrin-induced p38 MAPK activation is a key mediator in the CD14/TLR4/MD2-dependent uptake of lipopolysaccharide by hepatocytes. *J Biol Chem.* 283: 29433-29446.
- Serrero, G., ; Frolov, A.; Schroeder, F.; Tanaka, K.; Gelhaar, L. 2000. Adipose differentiation related protein: expression, purification of recombinant protein in *Escherichia coli* and characterization of its fatty acids binding properties. *Biochim. Biophys. Acta.* 1488: 245-254.
- Shah, N.S., A. Wright, G.H. Bai, L. Barrera, F. Boulahbal, N. Martin-Casabona, F. Drobniewski, C. Gilpin, M. Havelkova, R. Lepe, R. Lumb, B. Metchock, F. Portaels, M.F. Rodrigues, S. Rusch-Gerdes, A. Van Deun, V. Vincent, K. Laserson, C. Wells, and J.P. Cegielski. 2007. Worldwide emergence of extensively drug-resistant tuberculosis. *Emerg Infect Dis.* 13: 380-387.
- Silva, A.R., E.F. de Assis, L.F. Caiado, G.K. Marathe, M.T. Bozza, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, P.T. Bozza, and H.C. Castro-Faria-Neto. 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit

- leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol.* 168: 4112-4120.
- Small, P.M. and P.I. Fujiwara. 2001. Management of tuberculosis in the United States. *N Engl J Med.* 345: 189-200.
- Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69: 145-182.
- Spargo, B.J., L.M. Crowe, T. Itoneda, B.L. Beaman, and J.H. Crowe. 1991. Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 737-740.
- Stenmark, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 513-525.
- Strapagiel, D., K. Kasztalska, M. Druszczynska, M. Kowalewicz-Kulbat, A. Vrba, A. Matusiak, M. Chmiela, and W. Rudnicka. 2008. Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Folia Histochem Cytobiol.* 46: 353-359.
- Sturgill-Koszycki, S., P.H. Schlesinger, P. Chakraborty, P.L. Haddix, H.L. Collins, A.K. Fok, R.D. Allen, S.L. Gluck, J. Heuser, and D.G. Russell. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263: 678-681.
- Tailleux, L., O. Neyrolles, S. Honore-Bouakline, E. Perret, F. Sanchez, J.P. Abastado, P.H. Lagrange, J.C. Gluckman, M. Rosenzweig, and J.L. Herrmann. 2003. Constrained intracellular survival of Mycobacterium tuberculosis in human dendritic cells. *J Immunol.* 170: 1939-1948.
- Tanigawa, K., K. Suzuki, K. Nakamura, T. Akama, A. Kawashima, H. Wu, M. Hayashi, S. Takahashi, S. Ikuyama, T. Ito, and N. Ishii. 2008. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with Mycobacterium leprae. *FEMS Microbiol Lett.* 289: 72-79.
- Targett-Adams, P., M.J. McElwee, E. Ehrenborg, M.C. Gustafsson, C.N. Palmer, and J. McLauchlan. 2005. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta.* 1728: 95-104.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem.* 277: 44507-44512.
- Thoma-Uszynski, S., S.M. Kiertscher, M.T. Ochoa, D.A. Bouis, M.V. Norgard, K. Miyake, P.J. Godowski, M.D. Roth, and R.L. Modlin. 2000a. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol.* 165: 3804-3810.
- Thoma-Uszynski, S., S. Stenger, and R.L. Modlin. 2000b. CTL-mediated killing of intracellular Mycobacterium tuberculosis is independent of target cell nuclear apoptosis. *J Immunol.* 165: 5773-5779.
- Ting, L.M., A.C. Kim, A. Cattamanchi, and J.D. Ernst. 1999. Mycobacterium tuberculosis inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol.* 163: 3898-3906.
- Toossi, Z., P. Gogate, H. Shiratsuchi, T. Young, and J.J. Ellner. 1995. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active

- tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. *J Immunol.* 154: 465-473.
- Triggiani, M., A. Oriente, G. de Crescenzo, and G. Marone. 1995. Metabolism of lipid mediators in human basophils and mast cells. *Chem Immunol.* 61: 135-147.
- Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 3: 133-146.
- Tsuji, S., M. Matsumoto, O. Takeuchi, S. Akira, I. Azuma, A. Hayashi, K. Toyoshima, and T. Seya. 2000. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 68: 6883-6890.
- Ulrichs, T. and S.H. Kaufmann. 2006. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol.* 208: 261-269.
- Umlauf, E., E. Csaszar, M. Moertelmaier, G.J. Schuetz, R.G. Parton, and R. Prohaska. 2004. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem.* 279: 23699-23709.
- van Crevel, R., T.H. Ottenhoff, and J.W. van der Meer. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 15: 294-309.
- van Meer, G. 2001. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol.* 152: F29-34.
- Velasco-Velazquez, M.A., D. Barrera, A. Gonzalez-Arenas, C. Rosales, and J. Agramonte-Hevia. 2003. Macrophage--*Mycobacterium tuberculosis* interactions: role of complement receptor 3. *Microb Pathog.* 35: 125-131.
- Vergne, I., J. Chua, and V. Deretic. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic.* 4: 600-606.
- Vergne, I., J. Chua, H.H. Lee, M. Lucas, J. Belisle, and V. Deretic. 2005. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 4033-4038.
- Via, L.E., D. Deretic, R.J. Ulmer, N.S. Hibler, L.A. Huber, and V. Deretic. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 272: 13326-13331.
- Vieira-de-Abreu, A., E.F. Assis, G.S. Gomes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, C. Bandeira-Melo, and P.T. Bozza. 2005. Allergic Challenge-Elicited Lipid Bodies Compartmentalize In Vivo Leukotriene C4 Synthesis within Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33: 254-261.
- Voll, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, J.R. Kalden, and I. Girkontaite. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 390: 350-351.
- Wan, H.C., R.C. Melo, Z. Jin, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 2007. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *Faseb J.* 21: 167-178.
- Wei, P., S. Taniguchi, Y. Sakai, M. Imamura, T. Inoguchi, H. Nawata, S. Oda, Y. Nakabeppu, J. Nishimura, and S. Ikuyama. 2005. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) is conjointly regulated by PU.1 and AP-1 in macrophages. *J Biochem.* 138: 399-412.
- Weller, P.F., S.J. Ackerman, A. Nicholson-Weller, and A.M. Dvorak. 1989. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 135: 947-959.
- Weller, P.F. and A.M. Dvorak. 1985. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood.* 65: 1269-1274.

- Weller, P.F., R.A. Monahan-Earley, H.F. Dvorak, and A.M. Dvorak. 1991a. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol.* 138: 141-148.
- Weller, P.F., S.W. Ryeom, S.T. Picard, S.J. Ackerman, and A.M. Dvorak. 1991b. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 113: 137-146.
- Werneck-Barroso, E., A.C. Moura, M.M. Monteiro, O. Menezes de Lima Junior, M.N. de Meirelles, and M.G. Henriques. 2000. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res.* 49: 206-213.
- Wickremasinghe, M.I., L.H. Thomas, and J.S. Friedland. 1999. Pulmonary epithelial cells are a source of IL-8 in the response to *Mycobacterium tuberculosis*: essential role of IL-1 from infected monocytes in a NF-kappa B-dependent network. *J Immunol.* 163: 3936-3947.
- Yu, W., P.T. Bozza, D.M. Tzizik, J.P. Gray, J. Cassara, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 152: 759-769.
- Yu, W., J. Cassara, and P.F. Weller. 2000. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood.* 95: 1078-1085.
- Zhang, Y., M. Broser, H. Cohen, M. Bodkin, K. Law, J. Reibman, and W.N. Rom. 1995. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J Clin Invest.* 95: 586-592.
- Zimmerli, S., S. Edwards, and J.D. Ernst. 1996. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 15: 760-770.
- World Health Organization (2009/2010) Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing. Geneva, Switzerland: WHO. Disponivel no <http://www.who.int/gho/mdg/diseases/tuberculosis/en/index.html> e http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf. Acesso em 23/01/2011.

8) *Anexo*

