

MECANISMOS DE MODULAÇÃO DA MORTE CELULAR
PROGRAMADA E DA ATIVAÇÃO FUNCIONAL
DOS MACRÓFAGOS POR MICROBACTÉRIAS
VIRULENTAS E AVIRULENTAS

MARIANA NOVO NUNES CAMPOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JUNHO – 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MECANISMOS DE MODULAÇÃO DA MORTE CELULAR
PROGRAMADA E DA ATIVAÇÃO FUNCIONAL
DOS MACRÓFAGOS POR MICOBACTÉRIAS
VIRULENTAS E AVIRULENTAS

MARIANA NOVO NUNES CAMPOS

“Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção de título
de Doutora em Biologia Celular
(Imunologia e Microbiologia)”

Orientadora: Dr^a. Elena Lassounskaia

Campos dos Goytacazes – RJ
Junho - 2007

MECANISMOS DE MODULAÇÃO DA MORTE CELULAR
PROGRAMADA E DA ATIVAÇÃO FUNCIONAL
DOS MACRÓFAGOS POR MICOBACTÉRIAS
VIRULENTAS E AVIRULENTAS

MARIANA NOVO NUNES CAMPOS

“Tese apresentada ao Centro de
Biociências e Biotecnologia da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense, como parte das
exigências para obtenção de título
de Doutora em Biologia Celular
(Imunologia e Microbiologia)”

Aprovada em 29 de junho de 2007.

Comissão Examinadora:

Prof. Afranio Lineu Kritski – UFRJ

Doutor em Doenças Infecciosas e Parasitárias (UNIFESP)

Prof^a. Andrea Cristina Vetö Arnholdt – UENF

Doutora em Ciências Biológicas (UFRJ)

Prof^a. Valdirene Moreira Gomes – UENF

Doutora em Ciências Biológicas (UNIFESP)

Prof^a. Elena Lassounskaia – UENF

Doutora em Imunologia (IEM – Rússia)

ORIENTADORA

**Este trabalho foi desenvolvido
no Laboratório de Biologia do Reconhecer,
do Centro de Biociências e Biotecnologia,
da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro,
sob orientação da Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia.**

Apoio:

- Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

*À minha avó querida Amenaide,
quem muito amei,
e pra sempre amarei...*

Aos meus maravilhosos pais,
João Francisco e Márcia,
pelo amor incondicional,
pela dedicação, afeto...
e por acreditarem em anjos...

Ao meu esposo Thiago,
pessoa linda e essencial na minha vida,
pelo imenso amor e
pelo companheirismo nos momentos
mais difíceis da minha vida ...

Agradecimentos...

A DEUS, por ser fonte de luz, paz e conforto nos momentos de alegria e de tristeza... nas perdas e nas conquistas.... e pela minha vida.

A UENF, por me acolher por 12 anos... e me proporcionar uma diversidade de emoções, que me transformaram enormemente como pessoa, além dos meus títulos, dos muitos amigos, e do conhecimento infinito...

À Elena, pela orientação, experiência, muita paciência, enfim... em 11 anos, também muitas emoções estiveram presentes entre nós... não conseguiria encontrar palavras pra definir esta relação. Muito obrigada mesmo!!!

Ao grupo Elenetes: Verônica, Simone, Marcelle, Fabrício, Giliani, Eduardo, Tatiana, Thatiana, Tanara... porque somos um exemplo de união, companheirismo e amizade. Vocês são o MÁXIMO!!!!

Em especial, à Verônica, técnica da sala 207, pessoa imprescindível para o sucesso de qualquer experimento. Uma profissional exemplar, e uma amiga maravilhosa!! Amo você!!

E às minhas queridas Simone e Marcelle, que chegaram tão meninas... e já são quase doutoras!! Me orgulho muito de vocês, seja pelo lado profissional, seja pela grande amizade entre nós... Amo vocês também!!

Às minhas amigas de longa data Rita e Juliana, que além de dividir comigo as emoções da UENF, dividem as emoções do HGG... Valeu meninas... por tudo!!

Às minhas amigas Flávia e Geísa, por serem muito especiais em minha vida....

Aos membros da banca: Valdirene, Andrea e Afrânio, por aceitarem participar deste grande momento da minha vida!!

À Professora Thereza Kipnis, que mesmo doente, aceitou fazer a revisão da minha tese com muito carinho!! Muito obrigada por estes 11 anos de convivência, muitas vezes difícil entre nós... mas, que muito contribuíram para o meu crescimento!!

Aos meus amigos, todos, conquistados ao longo destes 12 anos de UENF... que foram fundamentais em períodos diferentes... todos estão guardados no meu coração.

Sumário

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Agente etiológico	3
1.1.1. Micobactérias	3
1.1.1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
1.1.1.2. <i>Mycobacterium bovis Calmette-Guérin</i>	6
1.1.1.3. <i>Mycobacterium avium</i> – micobactérias ambientais	8
1.1.1.3.1. Reservatórios ambientais	8
1.1.1.3.2. Vias de infecção	9
1.2. Distribuição, prevalência e mortalidade	10
1.2.1. A tuberculose no mundo	11
1.2.2. A tuberculose no Brasil	12
1.2.3. O controle da tuberculose na era do HIV	14
1.3. Suscetibilidade e imunidade	15
1.3.1. Macrófagos	16
1.3.1.1. Interação entre macrófagos e micobactérias	19
1.3.2. Receptores Toll-like	23
1.3.3. Cascatas MAPK de sinalização	26
1.3.4. Fosfoinositídeo 3 quinase (PI3K)	28
1.3.5. Fator nuclear κ -B	30
1.3.6. Resposta imune	32
1.4. Morte celular	35
1.4.1. Regulação da morte da célula hospedeira por patógenos intracelulares	39
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral	43
2.2. Objetivos Específicos	43

3. METODOLOGIA	44
3.1. Linhagens celulares	45
3.1.1. Cultura das células	45
3.2. Cepas de <i>Mycobacterium</i> sp utilizadas	46
3.3. Estoque e manutenção das culturas de <i>Mycobacterium</i> sp	47
3.3.1. Meios de cultura	47
3.3.2. Preparação do estoque	47
3.3.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	47
3.3.4. Obtenção de colônias isoladas	47
3.4. Avaliação da viabilidade das culturas de <i>Mycobacterium</i> sp	48
3.5. Preparação do lisado de <i>M. bovis</i> BCG	48
3.6. Infecção dos macrófagos	49
3.7. Avaliação da fagocitose das micobactérias pelos macrófagos	49
3.7.1. Método de Ziehl-Nielsen	49
3.8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e do tipo de morte nas culturas infectadas com <i>Mycobacterium</i> sp	50
3.8.1. Coloração dos macrófagos com laranja de acridina e brometo de etídio	50
3.9. Avaliação do crescimento micobacteriano nos macrófagos infectados	51
3.10. Análise da produção de TNF- α pelos macrófagos infectados	52
3.10.1. Bioensaio com células L929	52
3.10.1.1. Teste MTT	52
3.11. Avaliação da suscetibilidade dos macrófagos infectados à apoptose mediada por diferentes indutores	53
3.11.1. Análise da ativação da caspase 3	53
3.12. Investigação dos mecanismos de regulação da apoptose por <i>M. bovis</i> BCG	54
3.12.1. Inibição da ativação de NF- κ B	54
3.12.2. Inibição das cascatas de MAP quinases	54
3.12.3. Cinética da expressão de ERK, p38, JNK e Akt nos macrófagos infectados	55
3.13. Western blotting	55
3.13.1. Obtenção dos extratos celulares totais	55
3.13.2. Obtenção do extrato nuclear e citoplasmático das células	55
3.13.3. imunoprecipitação	56
3.13.4. SDS-PAGE	57
3.13.5. Immunoblotting	57

3.14. Análise dos filamentos de actina dos macrófagos através da marcação com Faloidina	58
3.15. Análise da morfologia dos macrófagos através de microscopia eletrônica de varredura	58
3.16. Análise estatística dos resultados	59
4. RESULTADOS	60
4.1. Avaliação da fagocitose das micobactérias pelos macrófagos	61
4.2. Avaliação da cinética de viabilidade e o tipo de morte celular dos macrófagos infectados com:	63
4.2.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	63
4.2.2. <i>Mycobacterium avium</i>	63
4.2.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	64
4.3. Avaliação da produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com:	70
4.3.1. <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	70
4.3.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	70
4.4. Papel do TNF- α na indução de morte nos macrófagos infectados	73
4.5. Análise da suscetibilidade aos indutores padrão de apoptose das células infectadas com micobactérias	75
4.6. Estudo dos mecanismos de proteção das células contra a apoptose	77
4.6.1. Análise da ativação do complexo NF- κ B nos macrófagos infectados por <i>M. bovis</i> BCG, lisado de <i>M. bovis</i> BCG e de <i>M. tuberculosis</i>	77
4.6.2. Análise do papel de NF- κ B na suscetibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG à indução de apoptose	77
4.6.3. Análise da ativação das cascatas de quinases PI3K e MAPK nos macrófagos infectados por <i>M. bovis</i> BCG	81
4.6.4. Análise do papel das quinases na suscetibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG à apoptose	81
4.7. Papel do TLR2 na modulação da morte dos macrófagos	86
4.7.1. Análise do papel do TLR2 na ativação de PI3K induzida pela <i>M.</i> <i>bovis</i> BCG	86
4.7.2. Infecção dos macrófagos derivados de camundongos <i>knockout</i> para TLR2	86
4.8. Avaliação da atividade funcional dos macrófagos após a infecção destes com micobactérias	90
5. DISCUSSÃO	96
6. CONCLUSÕES	107
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
8. ANEXOS	133

Resumo

A tuberculose é uma das doenças de maior destaque na patologia humana, provocando 3 milhões de mortes e cerca de 12 milhões de novos casos da doença ativa a cada ano. O papel da morte celular na infecção micobacteriana está sendo intensamente estudado, visto que da interação inicial patógeno-hospedeiro será montada a resposta imune, que definirá o curso da infecção. A modulação das vias de sinalização celular pelas micobactérias, com conseqüências potencialmente importantes para o curso da infecção, parece ser complexa e inclui tanto a indução da morte celular como os sinais de sobrevivência celular. Para estudar os mecanismos de modulação da morte celular programada e da atuação funcional dos macrófagos por micobactérias virulentas e avirulentas, utilizamos como modelo macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 e macrófagos M1 derivados de células de camundongos C57BL/6 *TLR*^{+/+} e *TLR*^{-/-}, infectados com as micobactérias *Mycobacterium bovis* BCG, cepas 27 opaca e translúcida e 104 opaca e translúcida de *M. avium*, e cepas H37Ra e H37Rv de *M. tuberculosis* e com lisado de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*. As micobactérias *M. bovis* BCG não alteraram a viabilidade dos macrófagos durante 72 horas de infecção *in vitro*, induzindo apoptose após esse período. A infecção com *M. bovis* BCG induziu a produção de TNF- α pelos macrófagos a partir de 3 horas após a infecção, atingindo o pico 24 horas mais tarde, e, ao mesmo tempo, um efeito protetor contra a ação citotóxica do TNF- α autócrino. As micobactérias também exerceram uma proteção contra a apoptose, induzida nos macrófagos por ATP e cisplatina, mas não contra a apoptose dependente de Fas. A infecção dos macrófagos com as cepas de *M. tuberculosis* virulenta H37Rv e avirulenta H37Ra induziu perda acentuada na viabilidade celular, a partir do 3º dia de infecção, mostrando tendência dose-dependente. O tipo de morte predominante induzido pelas micobactérias patogênicas foi a necrose. A *M. tuberculosis* induziu TNF- α de maneira dose-dependente, mas o nível de produção induzido pela cepa H37Ra foi 6 vezes menor e pela cepa H37Rv 15 vezes menor em comparação com o que foi induzido por BCG, o que dificilmente pode explicar a necrose observada. Para entender quais mecanismos podem contribuir para a prevenção da morte do macrófago infectado, estudamos as vias de sinalização acionadas nestas células pelas micobactérias. A via principal que leva os macrófagos a ativação pelas micobactérias é mediada pelos receptores Toll-like, principalmente TLR2 e TLR4. Nossos experimentos preliminares demonstram que as bactérias vivas e lisadas apresentam a capacidade semelhante de ligação com o TLR2 e ativação das vias dependentes deste receptor. A ativação de NF- κ B e das vias PI3K/Akt e p38MAPK pelas micobactérias é o fator que previne o desenvolvimento da apoptose e necrose nos macrófagos infectados com altas doses de infecção nas primeiras 48 horas após a infecção, favorecendo a replicação intracelular das bactérias.

Palavras-chave: micobactérias, morte celular, macrófagos, TNF- α , TLR2, PI3K/Akt, NF- κ B

Abstract

Tuberculosis is one of the most important human pathology, provoking 3 millions of deaths and approximately 12 millions new cases of active disease each year. Importance of cell death in mycobacterial infection is under intense investigation, since initial interaction between pathogen and host will define the course of infection. Modulation of cell signaling pathways by mycobacteria, with potentially important consequences for the course of infection, seems to be complex and includes induction cell death and survival signals of cells. To study mechanisms of modulation of programmed cell death and functional activity of macrophages by virulent and avirulent mycobacteria, we used Raw 264.7 murine macrophages and M1 macrophages from C57BL/6 *TLR*^{+/+} e *TLR*^{-/-} mice infected with *Mycobacterium bovis* BCG, *M. avium* strains 104 and 27 smooth and rough, *M. tuberculosis* strains H37Ra and H37Rv and *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* whole lysates. *M. bovis* BCG did not alter macrophage viability during 72 hours of *in vivo* infection, inducing apoptosis later on. *M. bovis* BCG infection induced TNF- α production 3 hours after infection, with point at 24 hours later and, at the same time, a protective effect against cytotoxic action of authocrine TNF- α . Mycobacteria either did exert protection against ATP and cisplatin-induced apoptosis, but not Fas-dependent apoptosis. Macrophage infection with virulent H37Rv and avirulent H37Ra *M. tuberculosis* induced accentuated loss of cellular viability, 3 days after infection, showing dose-dependent tendency. Necrosis was the predominant cell type induced by pathogenic mycobacteria. *M. tuberculosis* induced TNF- α in dose-dependent manner, but the level of production by strain H37Ra was smaller 6 times and 15 times by strain H37Rv compared with induced by BCG, what did not explain necrosis observed. To understand which mechanisms could contribute to prevent cell death of infected macrophage, we studied signaling pathways triggered in these cells by mycobacteria. The main pathway that mycobacteria activate the macrophages is mediated by Toll-like receptors, especially TL2 and TLR4. Our preliminary experiments demonstrate that alive and lysate bacteria show the same ability to activate TLR2 and pathways downstream. Mycobacteria activation of NF- κ B, PI3K/Akt and p38MAPK pathways is the factor that prevents infected macrophages apoptosis and necrosis development with high doses of infection at first 48 hours of infection, favoring intracellular replication of bacteria.

Key-words: mycobacteria, cell death, macrophage, TNF- α , TLR2, PI3K/Akt, NF- κ B

Lista de Abreviaturas

- AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida
- AP1 – proteína ativadora 1
- APAF-1 – *apoptosis protease activating factor 1*
- APCs – células apresentadoras de antígenos
- ATCC – *American Tissue Culture Collection*
- ATP – adenosina trifosfato
- Bad – promotor de morte associado a Bcl-xL/Bcl-2
- Bak – *Bcl-2 homologous antagonist/killer*
- Bax – protein x associada a Bcl-2
- BCG – Bacillus Calmette-Guérin
- Bcl-2 – linfoma de células B 2
- BK – Bacilo de Koch
- CHAPS – *3-[(cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propane-sulfonate*
- CO₂ – dióxido de carbono
- CR – receptor de complemento
- CTL – linfócito T citolítico
- DAB – diaminobenzidina
- DC – células dendríticas
- DFF45/ICAD – *inhibitor of caspase activated DNase* (DFF45 – humanos, ICAD – camundongos)
- DISC – *death-inducing signaling complex*
- DMEM-F12 – Dulbecco's Modified Medium F-12
- DNA – ácido desoxirribonucléico
- DO – densidade óptica
- DOTS – Estratégia do Tratamento de Curto Prazo Diretamente Observado
- DR – receptor de morte
- DTH – hipersensibilidade do tipo tardio
- DTT – dithiothreitol
- EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
- EGTA – ácido etilenoglicolbisaminotetracético

- FADD – domínio de morte associado a *Fas*
- FLICE – FADD *like* ICE
- FLIP – FLICE *inhibitory protein*
- GM-CSF – fator estimulante de colônia de macrófagos e granulócitos
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- HCl – ácido clorídrico
- HEPES – 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
- HIV – vírus da imunodeficiência adquirida
- HSP – proteína de choque térmico (*heat shock protein*)
- I-kB – inibidor -kB
- IAP – proteína inibidora de apoptose
- IC – complexos imunes
- IFN-γ - interferon γ
- IL – interleucina
- iNOS – óxido nítrico sintase indutível
- IRAK – *interleukin-1 receptor-associated kinase*
- IRF7 – *interferon regulatory factor 7*
- JNK – *Jun N-terminal kinase*
- KCl – cloreto de potássio
- LAM – lipoarabinomanana
- LPS – lipopolissacarídeo
- MAC – complexo *Mycobacterium avium*
- ManLAM – *mannose-capped* lipoarabinomanana
- MAPK – *mitogen activated protein kinase*
- MCP-1 – proteína quimiotática de monócitos - 1
- MgCl₂ – cloreto de magnésio
- MHC – complexo de histocompatibilidade principal
- MKK – *MAP kinase kinase*
- MOI – multiplicidade de infecção
- MR – receptor de manose
- MTB – *Mycobacterium tuberculosis*
- MTT – 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
- MyD88 – *Myeloid differentiation primary response protein*

- NaCl – cloreto de sódio
- NF-κB – fator nuclear -κB
- NK – células *natural killer*
- NO – óxido nítrico
- NOS – óxido nítrico sintase
- p53 – proteína 53
- PAMPs – padrões moleculares associados a patógenos
- PARP – poli - ADP-ribose polimerase
- PBS – salina fosfatada tamponada
- PCT – programa de controle da tuberculose
- PDTC – *pyrrolidine dithiocarbamate*
- PKA – proteína quinase A
- PKB/Akt – proteína quinase B
- PMA – acetato de forbol miristato
- PMN – células polimorfonucleares
- PMSF – fluoreto de fenilmetilsulfonil
- PNCT – programa nacional de controle da tuberculose
- PPD – teste cutâneo da tuberculina
- PRR – receptores de reconhecimento padrão
- RANTES – *regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*
- RIP – *receptor-interacting protein*
- RNA – ácido ribonucléico
- RNI – intermediários de nitrogênio reativos
- ROI – intermediários de oxigênio reativos
- SDS – dodecilsulfato de sódio
- SHP-1 - *Hematopoietic cell phosphatase*
- SLAM – *signaling lymphocytic activation molecules*
- SMF – sistema mononuclear fagocítico
- SRE – sistema retículo endotelial
- SRs – receptores *scavenger*
- STAT-1 – *signal transducers and activator of transcription protein*
- TB – tuberculose
- TCR – receptor de célula T

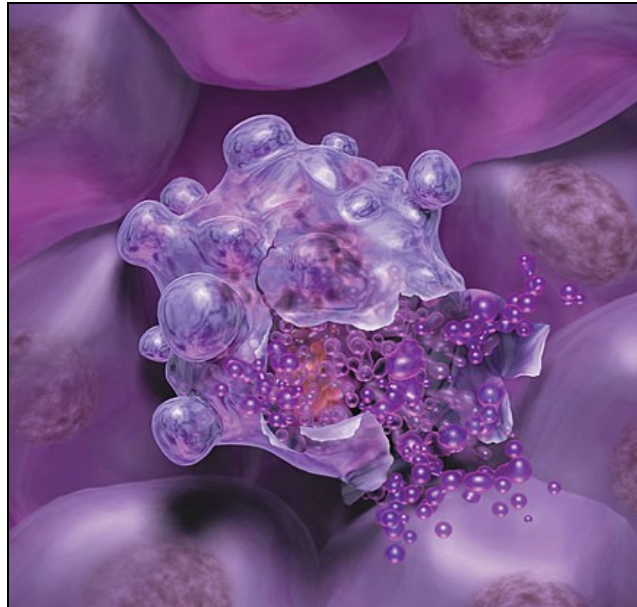
- TGF- β – fator de crescimento transformante- β
- TIR – receptor Toll/Interleucina-1
- TIRAP – *TIR domain-containing adaptor protein*
- TLR – receptor Toll-like
- TNF- α - fator de necrose tumoral- α
- TRAF6 – fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral
- TRAM – *TRIF-related adapter molecule*
- TRIF – *Toll/IL-1 receptor-domain containing adaptor protein inducing IFN- β*
- UFC – unidades formadoras de colônias
- UV – radiação ultravioleta
- WHO – Organização Mundial de Saúde

Índice de Figuras

Figura 1 – Heróis na pesquisa da tuberculose	2
Figura 2 – Esquema mostrando a relação entre as espécies do gênero <i>Mycobacterium</i>	3
Figura 3 – Bacilos do gênero <i>Mycobacterium</i>	4
Figura 4 – Eventos cronológicos após a inalação da <i>M. tuberculosis</i>	6
Figura 5 – Mapa mundial de casos notificados de TB a cada 100.000 habitantes em 2005	11
Figura 6 – Casos notificados de tuberculose no Brasil em 2001 obtidos pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação	12
Figura 7 – Divisão percentual de casos de tuberculose por região no Brasil em 200	13
Figura 8 – Mapa ilustrando as interações entre TB e do HIV	14
Figura 9 – Indutores e propriedades funcionais das diferentes populações polarizadas de macrófagos	18
Figura 10 – Reconhecimento imune e fagocitose de <i>M. tuberculosis</i>	19
Figura 11 – Via endosomal/lisosomal da fagocitose das micobactérias	20
Figura 12 – Representação esquemática do envelope celular da <i>M. tuberculosis</i>	22
Figura 13 – Esquema mostrando a variedade de produtos derivados de patógenos reconhecidos pelos receptores Toll-like	23
Figura 14 – Moléculas adaptadoras na sinalização de TLR	24
Figura 15 – Ponte entre as imunidades inata e adquirida	26
Figura 16 – Diagrama esquemático mostrando as três vias de sinalização das MAPK	27
Figura 17 – PI3Ks: ligando os receptores da superfície celular às suas muitas funções na célula	28
Figura 18 – Papel de PI3K na organização da actina e na migração celular	29
Figura 19 – Vias de ativação de NF-κB	31
Figura 20 – Resposta imune multidirecional pelas APCs em resposta à <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 21 – Diferenças básicas entre apoptose e necrose	36
Figura 22 – Esquema de ativação das caspases na apoptose	38

Figura 23 – Fotos ilustrativas das linhagens Raw 264.7 e THP-1	45
Figura 24 – Modelo esquemático indicando as diferenças entre os macrófagos diferenciados M1 e M2	46
Figura 25 – Esquema de semeadura de micobactérias para isolamento de colônias	48
Figura 26 – Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados com <i>Mycobacterium</i> BCG pelo método de Ziehl-Nielsen	62
Figura 27 – Análise do tipo de morte celular dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG	65
Figura 28 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com <i>M. avium</i>	66
Figura 29 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	67
Figura 30 – Análise do tipo de morte dos macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	68
Figura 31 – Produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG	71
Figura 32 – Produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	72
Figura 33 – Susceptibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG à ação citotóxica do TNF- α autócrino	74
Figura 34 – Susceptibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG aos indutores de apoptose	76
Figura 35 – Análise da ativação do complexo NF-kB pelas micobactérias, através do monitoramento da translocação da p65 ao núcleo	79
Figura 36 – Análise do papel da ativação de NF-kB na susceptibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG aos indutores de apoptose	80
Figura 37 – Ativação das vias MAPK e PI-3K nas células Raw 264.7 tratadas com <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. tuberculosis</i> lisadas	83
Figura 38 – Análise do papel da ativação das MAP quinases na susceptibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG à indução de apoptose por cisplatina	84
Figura 39 – Análise do papel da ativação das MAP quinases na susceptibilidade dos macrófagos infectados com <i>M. bovis</i> BCG à indução de apoptose por ATP	85
Figura 40 – Imunoprecipitação de TLR-2 e PI3K	87

Figura 41 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com <i>M. avium</i>	88
Figura 42 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	89
Figura 43 – Comparação das mudanças morfológicas induzidas pelas micobactérias <i>M. bovis</i> BCG e <i>M. tuberculosis</i>	93
Figura 44 – Mudanças morfológicas e reorganização de actina induzidas por <i>M. bovis</i> BCG nos macrófagos Raw264.7	94
Figura 45 – Efeitos de inibidores de kinases específicos nas mudanças morfológicas dos macrófagos Raw264.7 estimulados com <i>M. bovis</i> BCG	95



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A cada segundo de cada dia, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) infecta um ser humano em algum lugar do mundo e apesar da incidência global de cerca de 8 milhões de casos por ano de tuberculose (TB) ativa, apenas uma pequena fração das estimadas 2 bilhões de pessoas estão infectadas (WHO, 2007). Apenas 1 em cada 10 pessoas infectadas desenvolvem a doença ativa, o que levanta a questão: por que alguns indivíduos desenvolvem a doença e outros não?

A tuberculose, uma das doenças humanas mais antigas, ainda é uma das que mais matam entre as doenças infecciosas, apesar do amplo uso da vacina viva atenuada e de antibióticos mais eficazes (Manual Merck).

No passado, tornou-se um grande flagelo na Europa durante a Revolução Industrial, quando era comum a superpopulação e a aglomeração nas cidades e a doença era responsável por mais de 30% de todas as mortes. Com o surgimento dos antibióticos estreptomicina (década de 1940), isoniazida (década de 1950), etambutol (década de 1960), e rifampicina (década de 1970), a batalha contra a tuberculose parecia ter sido finalmente ganha. O advento da AIDS, combinada com a superpopulação e com as más condições de saneamento em muitas áreas urbanas, fez com que a tuberculose voltasse a ser um grave problema de saúde pública (Manual Merck).



Robert Koch



Albert Calmette



Camille Guérin

Figura 1 – Heróis na pesquisa da tuberculose. Robert Koch (1843–1910) descreveu a etiologia da tuberculose em 1882. Albert Calmette (1863–1933) e Camille Guérin (1872–1961) descobriram a primeira vacina atenuada contra tuberculose em 1921. (Kaufmann, 2006)

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

A tuberculose é uma doença infecciosa e contagiosa, causada principalmente por um microorganismo denominado *Mycobacterium tuberculosis*, também conhecido como bacilo de Koch (BK). O complexo *Mycobacterium tuberculosis* é constituído de várias espécies: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Outras espécies de micobactérias, principalmente *M. avium*, podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessárias para diagnóstico diferencial a cultura e a identificação das mesmas, pelos laboratórios de referência.

1.1.1. MICOBACTÉRIAS

As micobactérias compreendem muitas espécies e estão posicionadas taxonomicamente na Ordem *Actinomycetales*, Família *Mycobacteriaceae*, Gênero *Mycobacterium* (Brasil, 1994; Holt *et al.*, 1994; Murray *et al.*, 1999). Podem-se destacar algumas espécies mais importantes, devido ao seu impacto para a saúde pública: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae* e as micobactérias da vacina BCG.

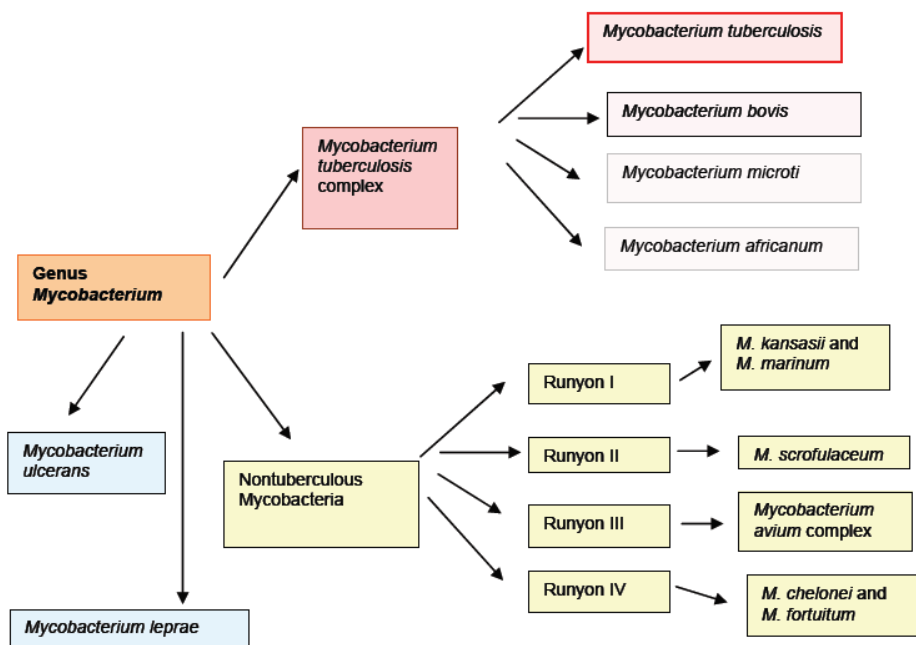


Figura 2 - Esquema mostrando a relação entre as espécies do gênero *Mycobacterium* (SOM 208 Microbiology Syllabus – The Mycobacteria)

O gênero *Mycobacterium* é constituído por bacilos imóveis, não esporulados, não encapsulados, medindo 1-10 micrômetros de comprimento e 0,2-0,6 micrômetros de largura, como mostra a Figura 3. Possuem alto conteúdo lipídico em sua parede celular, o que a torna hidrofóbica e resistente a muitos desinfetantes e corantes utilizados em laboratório, apresentando assim, propriedade morfotintorial álcool ácido resistente e coloração de Gram positiva.

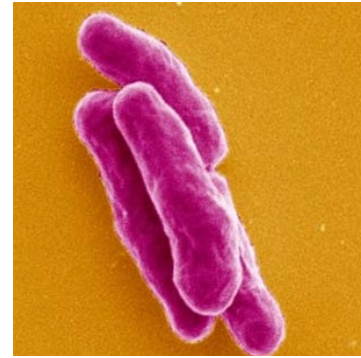


Figura 3 - Bacilos do gênero *Mycobacterium*

Em 1959, Runyon propôs uma divisão das micobactérias e classificou-as como: patogênicas para o homem, incluindo o complexo *M. tuberculosis* e o *M. leprae*, e as micobactérias não classificadas como bacilos da tuberculose humana ou bovina e que podem, eventualmente, causar doenças. Esses microrganismos apresentavam anteriormente a denominação de “atípicas”; posteriormente, foram denominadas micobactérias outras não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* ou micobactérias não tuberculosas (MNT) incluindo, principalmente, o complexo *M. avium* (MAC).

1.1.1.1. *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis é um dos patógenos de maior sucesso, pois é responsável pela infecção de cerca de um terço da população mundial, aproximadamente 2 bilhões de pessoas.

Os seres humanos são o único reservatório do *M. tuberculosis*. A infecção é transmitida de uma pessoa para outra através da inalação de pequenas gotículas, de secreção respiratória, eliminadas (tosse, espirro, fala) apenas pelo indivíduo com tuberculose pulmonar, ou laríngea (forma menos comum), em atividade (bacilífero). Somente os núcleos secos das gotículas (Núcleo de Wells), com diâmetro de até 5µm e com 1 a 2 bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos e aí iniciar a multiplicação. As gotículas médias são, na sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior e removidas dos brônquios através do mecanismo muco-ciliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Os bacilos que se depositam nas roupas, lençóis, copos e outros objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isso, não desempenham papel importante na transmissão da doença.

Por fonte de infecção entende-se qualquer indivíduo capaz de transmitir o bacilo da tuberculose. Em geral, a fonte de infecção é o indivíduo com a forma pulmonar da doença, eliminando bacilos para o exterior (bacilífero). Calcula-se que durante um ano, numa comunidade, uma fonte de infecção poderá infectar, em média, de 10 a 15 pessoas que com ela tenham tido contato. O risco de transmissão é maior durante contatos prolongados em ambientes fechados e com pouca ventilação. A transmissão é plena enquanto o doente estiver eliminando bacilos e não tiver iniciado o tratamento. Com o esquema terapêutico recomendado, a transmissão é reduzida, gradativamente, a níveis insignificantes ao fim de poucos dias ou semanas. As crianças com tuberculose pulmonar geralmente não são infectantes.

Após a inalação das gotículas infectantes com *M. tuberculosis*, vários cenários se seguem. As micobactérias podem ser destruídas pelos macrófagos alveolares, e nenhuma infecção real é formada. Alternativamente, as micobactérias podem não ser imediatamente mortas, e então, um complexo primário consistindo de um pequeno infiltrado e um linfonodo drenante será formado. Pequenas calcificações podem ser visualizadas em exame radiográfico e o teste de pele PPD, uma referência para a resposta de células T específicas para *M. tuberculosis*, torna-se positivo. Muito freqüentemente, a infecção é estabilizada neste ponto. Numa minoria dos casos, a doença ativa desenvolve-se (tuberculose primária), tanto nos pulmões como em qualquer lugar após a disseminação hematogênica da *M. tuberculosis*. Meses ou anos mais tarde, geralmente sob condições de imunodeficiência, a infecção latente pode ser reativada (tuberculose pós-primária) como mostra a Figura 4.

Após a infecção pelo *M. tuberculosis*, transcorrem, em média, 4 a 12 semanas para a detecção das lesões primárias. A maioria dos novos casos de doença pulmonar ocorre em torno de 12 meses após a infecção inicial. A probabilidade de o indivíduo vir a ser infectado e de que essa infecção evolua para a doença depende de múltiplas causas. As condições sócio-econômicas são essenciais para essa multicausalidade. A evolução depende também do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção) ou reinfestado (reinfecção exógena). A probabilidade de adoecer numa primo-infecção depende da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas do indivíduo infectado. Em novo contato, após uma infecção natural ou induzida pela BCG, a resistência dependerá da resposta imunológica.

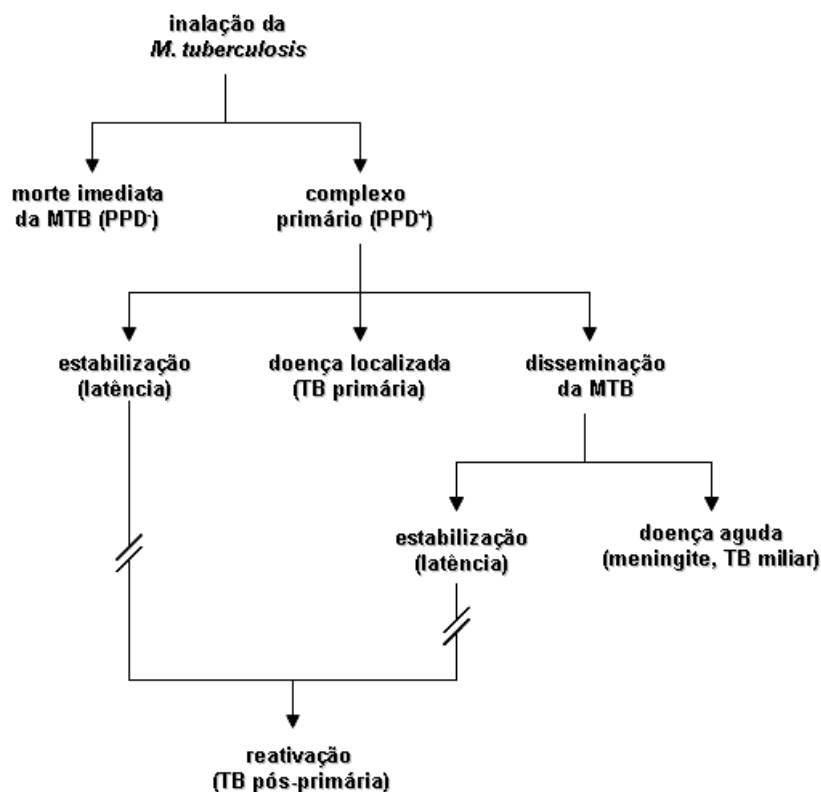


Figura 4 - Eventos cronológicos após a inalação da *M. tuberculosis* (Adaptado de van Crevel *et al.*, 2002)

1.1.1.2. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin

A vacina contra a tuberculose utilizada atualmente, BCG (bacillus Calmette-Guérin), foi obtida de um isolado clínico patogênico de *M. bovis* atenuado no Institut Pasteur em Lille, por Albert Calmette e Camille Guérin, após 230 passagens entre 1908-1921. A vacina foi administrada em humanos em 1921, e durante os anos 20, seu uso foi crescente na Europa, com evidências de sua eficácia a partir de estudos da Noruega. Os primeiros testes formais da BCG foram realizados nos Índios Norte Americanos nos anos 30. No fim dos anos 40 (quando a BCG era administrada principalmente pelas vias percutânea e intradermal), muitos estudos provaram a utilidade da BCG na proteção contra a tuberculose (Fine *et al.*, 1999).

A tuberculose emergiu no final da 2ª Grande Guerra Mundial, e o uso da BCG foi encorajado em muitos países, estimulados, em particular, pela UNICEF, Sociedades de Cruz Vermelha Escandinavas e pela WHO. Importantes testes foram realizados nos anos 50 pelo Conselho de Pesquisa Médica Inglês (BMRC) e pelo Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos (USPHS). Tornou-se evidente que os procedimentos empregados pela BMRC (cepa Copenhague, dada a crianças de 13 anos tuberculina negativas) ofereceram alta eficácia contra a tuberculose. Em

contraste, aqueles usados pela USPHS (cepas Park ou Tice, dadas a várias idades tuberculina negativas) ofereceram proteção muito baixa. Com base nestes resultados, as respectivas agências de saúde chegaram a conclusões lógicas: BCG foi recomendada como rotina para adolescentes tuberculina-negativos no Reino Unido, enquanto a BCG não foi recomendada para uso de rotina nos EUA, mas restrito a populações de alto risco. A maioria dos países seguiu a Europa e a WHO, e introduziram a BCG, primeiro em campanhas para crianças e após como rotina de vacinação em esquemas (ex.: ao nascimento, ao entrar ou sair da escola) (Fine *et al.*, 1999).

Duas hipóteses surgiram como explicações para os diferentes resultados obtidos nas diferentes avaliações da BCG. Uma atribuiu as diferenças a variações nas cepas de BCG e a outra considerou os fatores ambientais, em particular à exposição a várias micobactérias ambientais, como responsáveis pelas diferenças (Fine *et al.*, 1999).

A BCG foi incorporada ao Programa de Imunização Infantil em 1974. Atualmente, a cada ano, aproximadamente 100 milhões de crianças recebem a vacina (Fine *et al.*, 1999).

As vacinas BCG são produzidas em mais de 40 lugares pelo mundo, e existem hoje várias cepas (subcepas) usadas na produção da vacina e diferentes modos de cultivo da BCG (Fine *et al.*, 1999). As principais subcepas utilizadas são: Pasteur, Copenhagen, Glaxo, Tice, Tokyo, Russian, Brazilian/Moreau, Sweden (Martín, 2005).

O nível de proteção conferido pela BCG é extremamente variável; difere de acordo com a forma da TB e pode ser afetado nos casos de infecção associada com AIDS (Martín, 2005). A eficácia da vacina BCG contra a tuberculose pulmonar varia entre as populações, mostrando desde nenhuma proteção no Malawi até 50-80% no Reino Unido (Martín, 2005).

1.1.1.3. *Mycobacterium avium* - Micobactérias ambientais

Existem atualmente 91 espécies identificadas do gênero *Mycobacterium* não pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (Euzéby, 2002). Apesar da emergência de novas micobactérias, estudos recentes documentam que 30% das micobactérias isoladas da água, solo e ar, e de pacientes não pertencem a nenhuma das espécies

identificadas (Tortoli *et al.*, 2001). Micobactérias oportunistas ambientais são distinguidas dos membros do complexo *M. tuberculosis* (e *M. leprae*) pelo fato de não serem patógenos obrigatórios, mas são verdadeiros habitantes do ambiente. Podem ser encontradas como saprófitas, comensais e simbioses. Micobactérias ambientais incluem tanto espécies de crescimento lento (ex.: formação da colônia em 7 dias ou mais) e crescimento rápido (ex.: formação da colônia em menos de 7 dias). Deve ser notado que mesmo as de crescimento rápido crescem mais lentamente que a maioria das micobactérias. As micobactérias exibem grande variação nas taxas de crescimento (2 a 48h nos tempos de duplicação), morfologia das colônias (Wright *et al.*, 1996; Cooper *et al.*, 1998) sensibilidade a antibióticos e biocidas (Cangelosi *et al.*, 1999), plasmídeos (Dale, 1995; Kirby *et al.*, 2002; Picardeau & Vincent, 1998) e virulência (Cooper *et al.*, 1998). As características em comum com o complexo *M. tuberculosis* são a grande resistência, parede celular contendo micolato e patogenicidade intracelular.

1.1.1.3.1. Reservatórios ambientais

Micobactérias ambientais são habitantes normais de uma ampla categoria de reservatórios ambientais, incluindo águas naturais e municipais, solo, aerossóis de protozoários, animais, e humanos. A associação externa com ou invasão de plantas também podem ocorrer (Eaton *et al.*, 1995; Laukkanen *et al.*, 2000). A água é possivelmente a principal fonte de infecção pelo complexo *M. avium* em humanos (Goslee & Wolinsky, 1976), ainda que não seja a única fonte (von Reyn *et al.*, 2002). Os isolados de *M. avium* obtidos de doentes com AIDS foram idênticos para aqueles isolados da água potável dos pacientes quando analisados por método de DNA *fingerprinting* (von Reyn *et al.*, 1994).

A prevalência de muitas espécies de micobactérias ambientais no fornecimento de água potável municipal (Falkinham *et al.*, 2001) está diretamente explicada pela sua alta resistência inata a cloro e biocidas (Le Dantec *et al.*, 2002; Taylor, 2000). Além disso, micobactérias ambientais *M. fortuito* e *M. chelonae* (Hall-Stoodley & Lappin-Scott, 1998), e *M. avium* são capazes de formar biofilmes e desta forma populações micobacterianas podem persistir no sistema (ex.: sistema de distribuição de água) a despeito do seu lento crescimento.

Micobactérias ambientais apresentam também uma extraordinária sobrevivência à privação de alimentos (Nyka, 1974; Smeulders *et al.*, 1999),

mantendo-se apesar de baixos níveis de nutriente na água de torneira. Além disso, a tolerância a temperaturas extremas (Schulze-Robbecke & Buchholtz, 1992) resulta na contaminação de águas de torneira quentes, estâncias termais, e máquinas de gelo por micobactérias ambientais, sendo as espécies do complexo *M. avium*, *M. xenopi*, *M. phlei*, e *M. chelonae* as mais termoresistentes. *M. mucogenicum*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, e *M. flavescens* estão entre as muitas outras espécies de micobactérias ambientais isoladas de água potável pública (Covert *et al.*, 1999; Kubalek & Mysak 1996; Le Dantec *et al.*, 2002). A comida também é uma fonte de risco humano para estas micobactérias, que estavam presentes em 25 de 121 de amostras de comida (20%), e certos isolados de *M. avium* mostraram homologia genética com isolados clínicos (Yoder *et al.*, 1999).

Uma variedade de características fisiológicas de *M. avium* e *M. intracellulare* contribuem para o seu grande número nesses ambientes. *M. avium* e *M. intracellulare* têm um pH ácido perfeito para crescimento entre 4.5 e 5.5 (George & Falkinham, 1986), e o seu crescimento é estimulado por ácidos húmicos e fúlvicos, os principais compostos orgânicos nas águas castanhas de lagoas, rios e pântanos (Kirschner *et al.*, 1999). Um grande número de *M. avium* e *M. intracellulare* foi recuperado de águas e solos com baixos níveis de oxigênio (Brooks *et al.*, 1984; Kirschne *et al.*, 1992), e representantes destas espécies podem crescer em condições microaeróbias. Desta forma, as micobactérias são favorecidas para o crescimento nesses ambientes. Além disso, adaptações para condições ácidas e microaeróbias ajudam na virulência dos patógenos intracelulares.

1.1.1.3.2. Vias de infecção

Existe uma variedade de situações onde as distribuições ambientais e geográficas de humanos e micobactérias podem sobrepor-se e levar a exposição dos humanos assim como impactar a ecologia micobacteriana. A maior sobreposição ocorre na água. Os humanos estão expostos a micobactérias na água bebendo, nadando ou tomando banho. Aerossóis gerados durante estas atividades também levam à exposição humana.

Micobactérias ambientais estão presentes praticamente em todas as fontes de água municipais (Chang *et al.*, 2002), e padrões de restrição de fragmentos genômicos de *M. avium* isolados de água de hospitais são similares àqueles isolados de pacientes com AIDS (Aronson *et al.*, 1999).

Membros do complexo *M. avium* comumente infectam pássaros, apesar de a infecção sintomática ser mais rara e dificilmente transmissível (Thorel *et al.*, 2001). As vias de infecção primária são: oral e através de aerossol (Reddy, 1998). Consistente com a via de transmissão oral, *M. avium* exibe alta tolerância inata a ácidos e sais biliares (Bodmer *et al.*, 2000). *M. avium* infecta a mucosa intestinal no íleo terminal, principalmente através da superfície apical das células epiteliais e não via células M (Bermudez & Sangari, 2000; Sangari *et al.*, 2000; Sangari *et al.*, 2001).

Enquanto as micobactérias ambientais são oportunistas em uma variedade de pacientes imunocomprometidos, a ampla prevalência resulta em todos humanos serem comumente e continuamente expostos a baixos níveis (50-500 bacilos por dia). Apenas uma pequena porcentagem das interações humano-micobactéria evolui para a infecção micobacteriana, mas tal progressão é muito mais comum em pacientes imunocomprometidos, especialmente aqueles com AIDS (Arasteh *et al.*, 2000)

1.2. DISTRIBUIÇÃO, PREVALÊNCIA E MORTALIDADE

A tuberculose não apresenta variações cíclicas ou sazonais, de importância prática. A prevalência observada é maior em áreas de grande concentração populacional e precárias condições sócio-econômicas e sanitárias. A distribuição da doença é mundial, com tendência decrescente da morbidade e mortalidade nos países desenvolvidos.

Nas áreas com elevada prevalência de infecção pelo HIV, vem ocorrendo estabilização ou aumento do número de casos e óbitos por tuberculose. Estão mais sujeitos à doença indivíduos que convivam (contatos) com doente bacilífero, determinados grupos com redução da imunidade, como os silicóticos e pessoas que estejam em uso de corticosteróides ou infectados pelo HIV.

Antes do advento da moderna quimioterapia, a mortalidade era o indicador utilizado tanto para avaliar a tendência da endemia, como para fazer estimativas de morbidade - a prevalência era o dobro da incidência, que por sua vez era o dobro da mortalidade. Na era quimioterápica, essas equivalências romperam-se, hoje representando a mortalidade muito mais o desempenho do controle da doença, uma vez que praticamente todos teriam chance de se curar diante de um diagnóstico

precoce e tratamento corretamente administrado. A análise da mortalidade deve considerar a distribuição geográfica, os grupos etários e a associação com o HIV.

1.2.1. A TUBERCULOSE NO MUNDO

Estima-se que 8,8 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram em 2003 e 1,7 milhões de pessoas morreram desta doença no mesmo ano (WHO, 2007). A maioria dos casos acontece em países em desenvolvimento, sendo que a África sub-Saariana apresenta a taxa de incidência mais alta per capita, e o sudeste da região asiática têm o maior número de casos (Figura 5).

Segundo dados recentes da WHO, o Brasil está perto de alcançar a meta para o sucesso no tratamento da tuberculose e continua a fazer progressos para a ampla cobertura do DOTS – Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose (WHO, 2007).

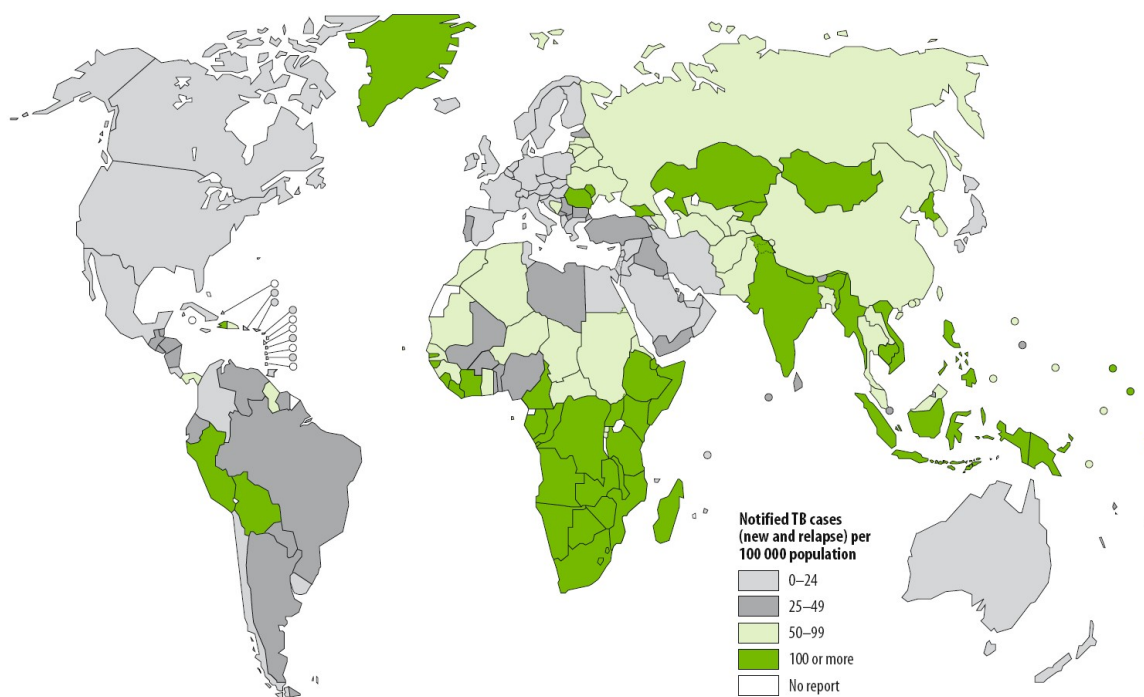


Figura 5 – Mapa mundial de casos notificados de TB a cada 100.000 habitantes em 2005 (WHO, 2007)

1.2.2. A TUBERCULOSE NO BRASIL

O Brasil é o país com o maior número de casos notificados de tuberculose nas Américas e a Organização Mundial de Saúde, em seu relatório anual de 2004, o coloca na 15ª posição no ranking dos 22 países com maior número de casos estimados de tuberculose (Boletim Informativo TB 2005 RJ).

Os dados mais recentes publicados pelo Ministério da Saúde indicam que a taxa de incidência de tuberculose vem se mantendo estável nos últimos anos, 55/100.000 habitantes em 2000, com cerca de 90.000 casos notificados e 6.000 óbitos a cada ano. Nos últimos anos, o compromisso do governo federal com as ações de controle da tuberculose tem sido crescente e o Ministério da Saúde priorizou a expansão do tratamento supervisionado como estratégia para alcançar as metas de detecção e cura (Boletim Informativo TB 2005 RJ).

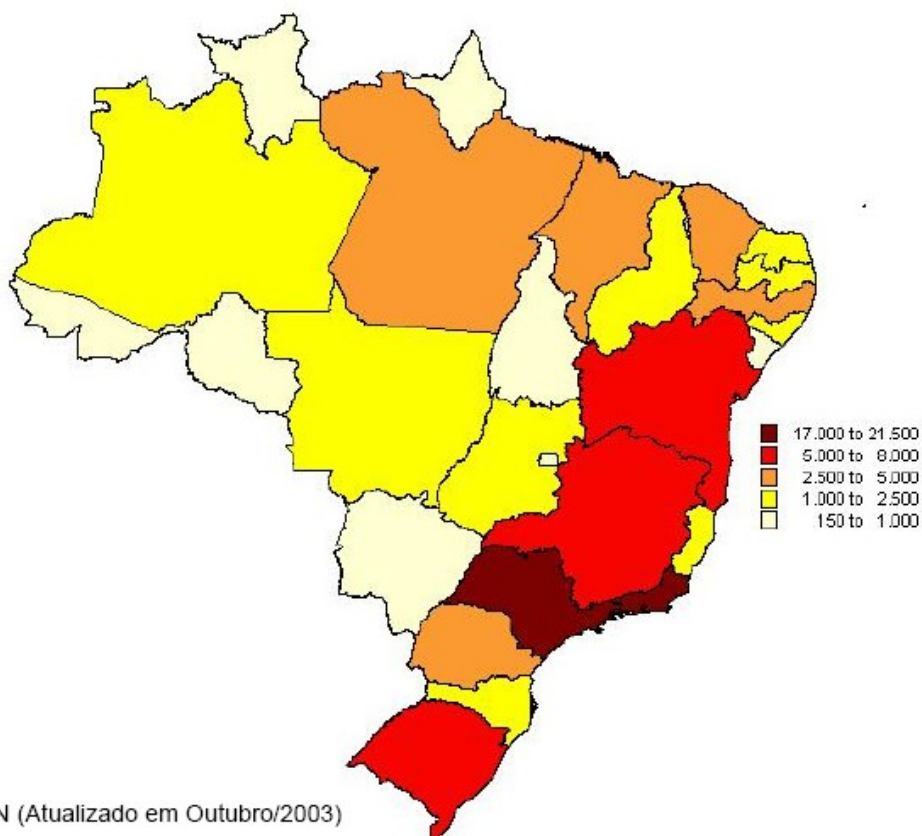


Figura 6 - Casos notificados de tuberculose no Brasil em 2001 obtidos pelo Sistema de Informações de Agravos de Notificação (SINAN)

Em 1996, a Organização Mundial de Saúde, passou a recomendar a estratégia DOTS – Estratégia do Tratamento Supervisionado da Tuberculose, como a mais eficaz para alcançar o controle da tuberculose. Em 1998, o Ministério da Saúde lançou o Plano Nacional de Combate à Tuberculose que, reconhecendo a prioridade do problema, propunha a implantação da estratégia DOTS e tinha como metas implementar a cobertura do PCT em 100% dos municípios, diagnosticar 92%

dos casos estimados e tratar 85% dos casos diagnosticados (Boletim Informativo TB 2005 RJ).

Em 2004, a tuberculose foi declarada prioridade nacional e foi aprovado um plano nacional para o período 2004-2007, no qual o PNCT estabeleceu critérios que incluíram os 315 municípios que concentram 70% dos casos da doença como prioritários para fortalecer as ações de controle e alcançar 100% de cobertura com o tratamento supervisionado nas unidades básicas de saúde (Boletim Informativo TB 2005 RJ).

A região sudeste é a que concentra grande parte dos casos de tuberculose no Brasil. O Estado do Rio de Janeiro é o que apresenta a mais alta taxa de incidência de tuberculose do país, como mostrado na Figura 7. O Ministério da Saúde define nove municípios como prioritários, mas o PCT-SES/RJ incluiu em seu rol de prioridade todos os municípios com mais de 100 mil habitantes. Os vinte e dois municípios prioritários, dos quais Campos dos Goytacazes é um deles, concentram 86% da população do estado e são responsáveis por 92% dos casos de TB (Plano Estratégico para o Controle da TB no Estado do RJ 2003-2005).

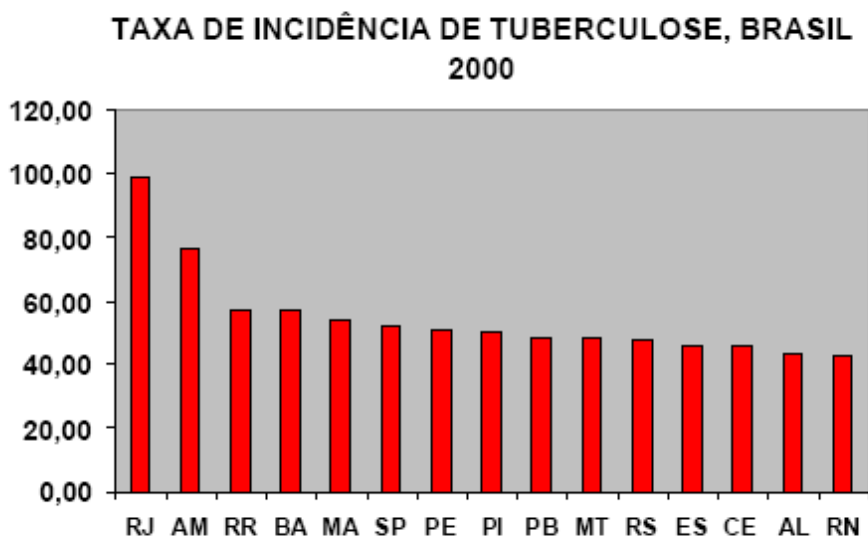


Figura 7 - Divisão percentual dos casos de Tuberculose por região do Brasil em 2000 (Plano Estratégico para o Controle da TB no Estado do RJ 2003-2005)

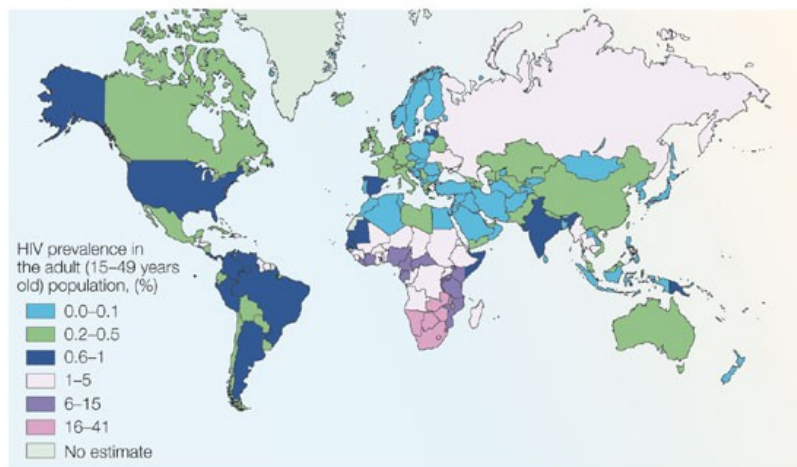
1.2.3. O CONTROLE DA TUBERCULOSE NA ERA DO HIV

A tuberculose e o HIV são as doenças infecciosas que mais matam adultos nos países em desenvolvimento, e cerca de 13 milhões de pessoas estão infectadas com ambos os organismos causadores (Nunn *et al.*, 2005). Estima-se que 8,8 milhões de novos casos de tuberculose ocorreram em 2003 e 1,7 milhões de pessoas morreram desta doença. De outro lado, cerca de 39 milhões de pessoas convivem com o vírus HIV, das quais 3,1 milhões morreram por HIV/AIDS (Nunn *et al.*, 2005).

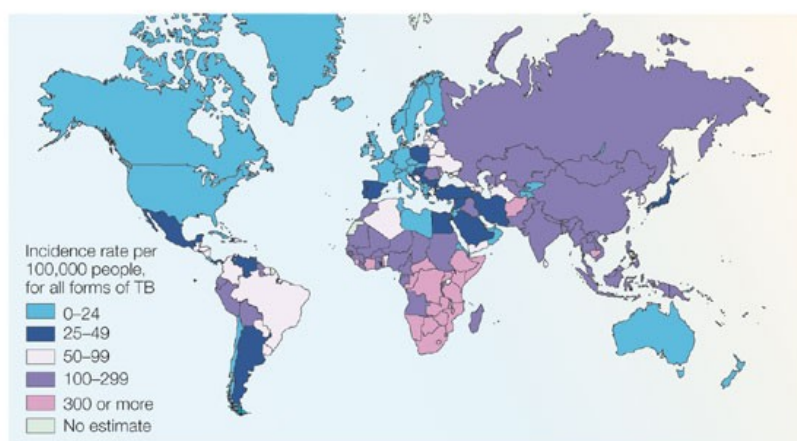
A WHO estima que cerca de 8% dos 8,8 milhões de novos casos de TB em 2003 estejam infectadas com HIV. Das 1,7 milhões de pessoas que morreram de TB em 2003, 229.000 estavam provavelmente infectadas com HIV (Nunn *et al.*, 2005).

A maior prevalência da infecção é vista no leste e

a PREVALÊNCIA DO HIV NA POPULAÇÃO ADULTA, 2003



b TAXA DE INCIDÊNCIA DE TB ESTIMADA, 2003



c PREVALÊNCIA DE HIV ESTIMADA EM CASOS DE TB, 2003



Figura 8 – Mapa ilustrando as interações entre tuberculose (TB) e HIV. a | Prevalência do HIV entre adultos (15-49 anos). b | Taxas estimadas de incidência de TB em 2003. c | Proporção de pessoas com TB também infectadas com HIV. (Nunn *et al.*, 2005)

sudeste da África. A incidência e notificação da TB estão fortemente associadas com a infecção por HIV (Fig. 8b) e 12 dos 15 países com o maior número de taxas de notificação estão na África sub-Saara (Nunn *et al.*, 2005). Em oito países do leste e sudeste da África, mais de 50% de todos os adultos infectados estão co-infectados com HIV (Fig. 8c).

1.3. SUSCETIBILIDADE E IMUNIDADE

A infecção pelo bacilo da tuberculose pode ocorrer em qualquer idade. Nem todas as pessoas expostas ao bacilo da tuberculose se tornam infectadas. A infecção tuberculosa, sem doença, significa que os bacilos estão presentes no organismo, mas o sistema imune está mantendo-os sob controle. Uma vez infectada, a pessoa pode desenvolver a tuberculose quando o sistema imune não pode mais manter os bacilos restritos nos granulomas, e eles se multiplicam rapidamente. As reativações de infecções antigas e latentes explicam grande parte dos casos de doença em idosos (Netea *et al.*, 2004).

Entre os infectados, a probabilidade de adoecer aumenta quando apresentam uma associação com a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e/ou outras formas de imunodepressão. Também é maior nas pessoas desnutridas, doentes, com silicose, diabetes e usuários de drogas endovenosas. A imunidade natural pode ser explicada por diferenças fisiológicas que existem nas várias espécies. No entanto, não existem diferenças fisiológicas que expliquem os diversos graus de imunidade, aparentemente natural, que são observados em uma mesma espécie animal. A maior ou menor imunidade natural parece estar relacionada com a maior ou menor velocidade com que o hospedeiro é capaz de adquirir imunidade. Assim, não haveria propriamente uma imunidade "natural", mas uma imunidade adquirida mais rápida e eficaz e, portanto, capaz de propiciar o controle da infecção numa fase precoce. Essa competência imunológica é controlada geneticamente, embora os fatores, como a desnutrição, possam suprimi-la (Netea *et al.*, 2004).

A defesa do hospedeiro contra microrganismos patogênicos envolve tanto a imunidade inata como a adquirida. Estes dois grupos relativamente distintos de respostas são seqüencialmente ativados durante a infecção e tem por fim garantir a eliminação do patógeno microbiano. O sistema imune inato é ativado minutos após a invasão do hospedeiro, sendo responsável pela defesa durante as horas iniciais e

mesmo dias de infecção. Apesar do sistema imune inato, compreendido por componentes celulares (ex.: monócitos, neutrófilos, células NK) e humoral (ex.: sistema complemento, lisozimas), ser muito efetivo nas infecções, uma segunda ativação mediada por linfócitos T e B (imunidade adquirida) é necessária para a eliminação do patógeno (Netea *et al.*, 2004).

1.3.1 Macrófagos

Metchnikoff em 1893 foi a primeira pessoa a usar o termo “macrófago” para descrever uma grande célula com capacidade de capturar microrganismos (Tauber & Chernyak, 1991). Mais tarde, Aschoff em 1924 qualificou estas células como integrante do Sistema Retículo Endotelial (SRE) que inclui células reticulares, células endoteliais, fibroblastos, histiócitos e monócitos (Auger, 1992). O termo Sistema Retículo-Endotelial foi substituído por Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), quando foi reconhecido que um subconjunto das células do SRE deriva de precursores da medula óssea (van Furth *et al.*, 1972). A família de células do SMF compreende células progenitoras da medula, pro-monócitos, monócitos do sangue periférico e macrófagos teciduais.

Os macrófagos fazem parte do sistema imune inato, reconhecendo, fagocitando e destruindo muitos patógenos em potencial, incluindo bactérias, protozoários e fungos. Os macrófagos podem também reconhecer células tumorais singênicas, células normais infectadas com vírus assim como células em processo de morte celular programada (apoptose) (Auger & Ross, 1992; Henson *et al.*, 2001). Além de suas funções na imunidade inata primária, os macrófagos agem como células reguladoras e efectoras tanto nas respostas imunes mediadas por células como na resposta imune humoral (Morrissette *et al.*, 1999). Após a fagocitose, os macrófagos degradam as proteínas e processam os antígenos para apresentação com as moléculas de MHC, onde as células T podem reconhecer as substâncias como estranhas (Unanue & Allen, 1986; Underhill *et al.*, 1999). Quando ativados numa resposta imune, os macrófagos adquirem atividades microbicidas e tumoricidas envolvendo espécies de oxigênio reativas e metabólitos de nitrogênio reativos (Adam & Hamilton, 1984; Nathan & Hibbs Jr., 1991; Fang & Vazquez-Torres, 2002).

O potencial destrutivo dos macrófagos e sua habilidade para secretar reguladores da função das células vizinhas contribuem em muitos aspectos da homeostase. Por exemplo, dentro da medula óssea e do baço, os macrófagos engolfam os núcleos expelidos dos eritrócitos maduros, e contribuem para controlar a hematopoiese através da secreção de uma ampla variedade de citocinas e também via mecanismo de contato imediato (Crocker & Milon, 1992; Sadahira & Mori, 1999). Durante o desenvolvimento embrionário, os macrófagos exercem um importante papel na remoção das células mortas e na limpeza das áreas de morte celular programada (Hopkinson-Woolley *et al.*, 1994; Lichanska & Hume, 2000). Essas funções são mantidas nos adultos, quando os macrófagos passam a estar diretamente ligados à recuperação de feridas, reparação de tecidos e remodelação óssea (Shapiro *et al.*, 1991; Wilson, 1997; Opdenakker & Van Damme, 1992).

Os macrófagos são também importantes em vários aspectos da homeostase, por exemplo, no mecanismo do colesterol (de Villiers *et al.*, 1998). A diversidade de funções dos macrófagos fornece uma ligação entre a imunidade inata e adquirida e as numerosas mudanças fisiológicas que contribuem para a defesa do hospedeiro. Por outro lado, a disfunção dos macrófagos causa muitas patologias de doenças infecciosas, inflamatórias e malignas (Mantovani *et al.*, 2004).

A ativação dos macrófagos ocorre através de forma especializada e polarizada. Interferon- γ (IFN- γ), certas citocinas como fator estimulador de colônia granulócito macrófago (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF) e produtos microbianos (ex.: lipopolissacarídeos - LPS) induzem a forma clássica de ativação do macrófago M1. Macrófagos M1 são geralmente caracterizados pelo fenótipo IL-12^{high}, IL-23^{high}, IL-10^{low}; produzem grandes quantidades de reativos de oxigênio e intermediários de nitrogênio além de citocinas inflamatórias; fazem parte das respostas polarizadas Th1 e medeiam a resistência contra parasitas intracelulares e tumores (Mantovani *et al.*, 2004) (Figura 9).

Macrófagos M2 é um nome genérico para as várias formas de ativação de macrófagos que não a clássica M1 e incluem células expostas a IL-4 ou IL-13, complexos imunes, IL-10 e hormônios glicocorticóides. As várias versões de células M2 geralmente apresentam o fenótipo IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high}; possuem altos níveis de receptores manose, galactose e *scavengers*; guiam o metabolismo da arginina a ornitina e poliamina e conseqüentemente a promoção do crescimento (Mantovani *et al.*, 2004). Células M1 e M2 expressam repertórios profundamente diferentes de receptores de citocinas e quimiocinas. Células M2 geralmente estão

envolvidas na resposta do tipo Th2; exercem função imunoreguladora; orquestram a encapsulação e contenção de parasitas; e promovem o reparo e remodelamento de tecidos (Mantovani *et al.*, 2004).

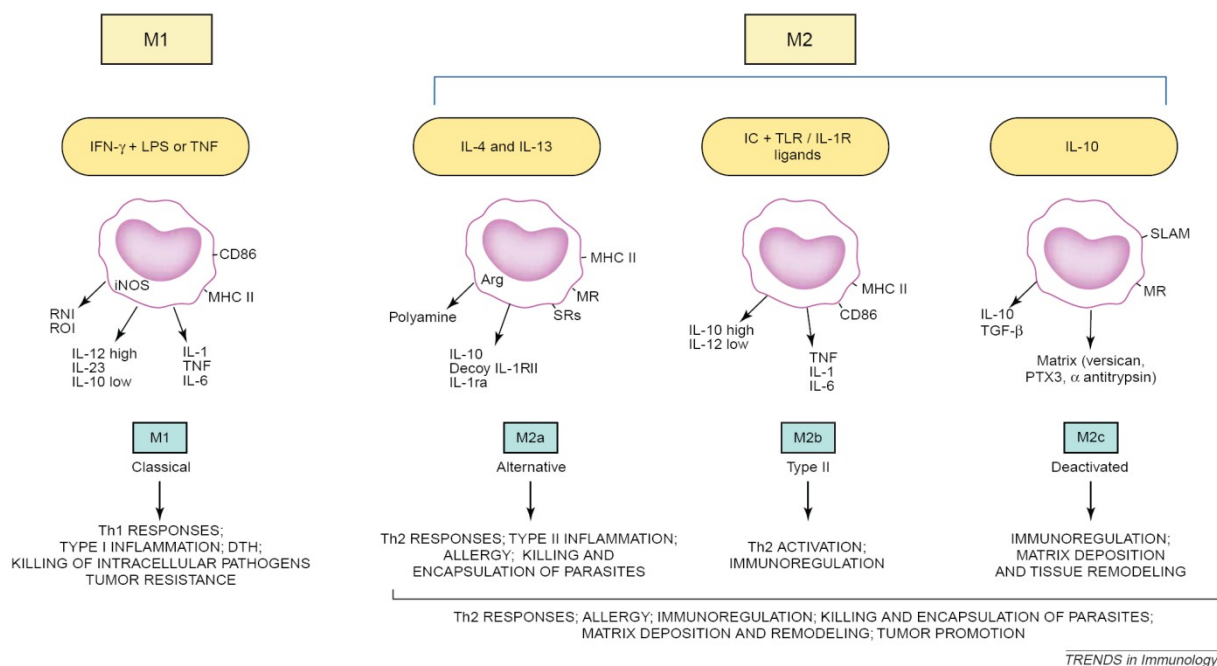


Figura 9 - Indutores e propriedades funcionais das diferentes populações polarizadas de macrófagos.

Abreviações: DTH, hipersensibilidade do tipo tardia; IC, complexos imunes; IFN- γ , interferon- γ ; iNOS, óxido nítrico sintase indutível; LPS, lipopolissacarídeo; MR, receptor manose; RNI, intermediários reativos de nitrogênio; ROI, intermediários reativos de oxigênio; SLAM, *signaling lymphocytic activation molecule*; SRs, receptores *scavenger*; TLR, receptor Toll-like. (Mantovani *et al.*, 2004)

A fagocitose pelos macrófagos é um evento mediado por receptores. É durante a interação inicial que o macrófago é capaz de distinguir se a partícula a ser fagocitada é um resto celular ou um patógeno possivelmente perigoso. O macrófago possui vários receptores em sua superfície e sua respectiva ligação pode resultar em várias respostas. Essas respostas podem variar desde uma simples fagocitose de uma célula sanguínea vermelha senescente a fagocitose de um patógeno e a ativação subsequente de mecanismos antibacterianos incluindo a ativação de uma resposta imune. Claramente, essa dramática variação nas conseqüências deve ser cuidadosamente controlada para que a maioria dos eventos de limpeza não leve a ativação dos macrófagos enquanto que uma captura ocasional de um patógeno resulte em um rápido e efetivo controle. Então, como estas respostas dos macrófagos são controladas pelo hospedeiro ou moduladas pelo patógeno?

O macrófago possui vários receptores de reconhecimento e de fagocitose, como mostra a Figura 10, que incluem receptores de complemento (CR), receptores

de imunoglobulinas (FcR) e os receptores de reconhecimento de padrões (PRR) como receptores de manose (MR), CD14 e receptores *Toll-like* (TLR).

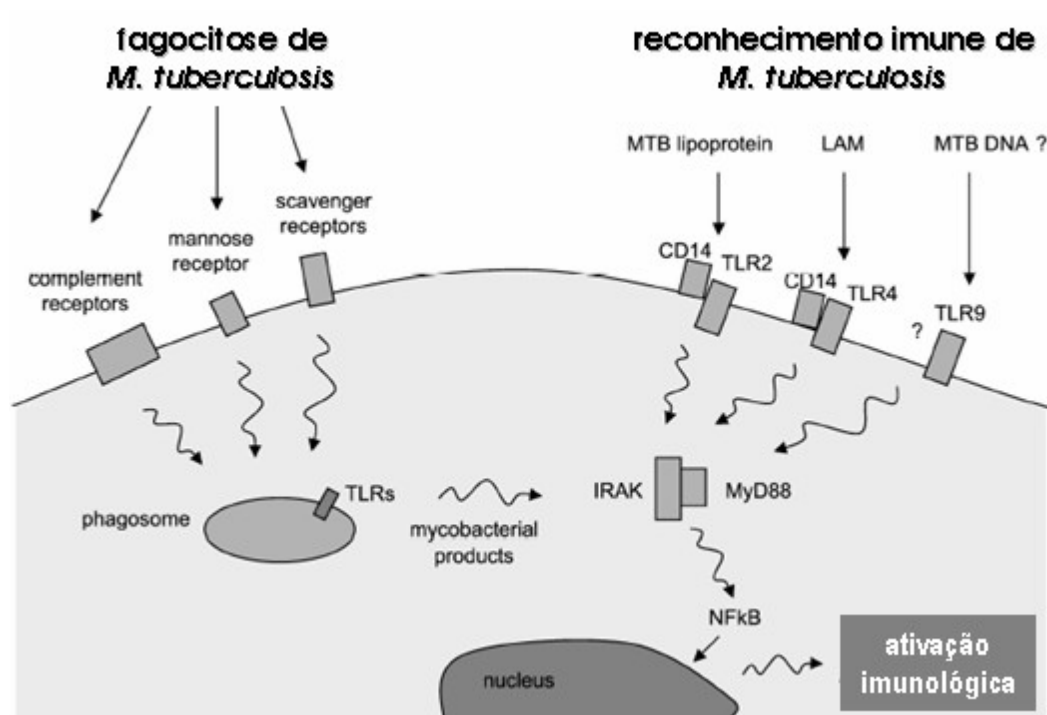


Figura 10 - Reconhecimento imunológico e fagocitose de *M. tuberculosis* (Adaptado de Reinout van Crevel et al., 2002)

1.3.1.1. Interação entre macrófagos e micobactérias

Uma das mais antigas e bem embasadas observações a respeito da interação entre micobactérias e macrófagos é a localização intracelular não usual das micobactérias. Após entrar no macrófago, as micobactérias patogênicas, como *M. avium* e *M. tuberculosis*, residem e replicam dentro de fagossomos. Muitos estudos mostraram que fagossomos micobacterianos são capazes de fundir com endossomos primários, mas falham na fusão com endossomos tardios ou lisossomos e estão associados a proteínas como receptor de transferrina (Clemens & Horwitz, 1996; Sturgill-Koszycki et al., 1994). Esses fagossomos não possuem próton ATPases e por isso não se acidificam (Sturgill-Koszycki et al., 1996).

A inibição induzida pelas micobactérias da nucleação dos filamentos de actina fagossomais pode possivelmente explicar a incapacidade de fusão com as vesículas endocíticas tardias. A lipoarabinomanana (LAM) presente na parede das micobactérias inibe a elevação do cálcio, o que está ligado à inibição das vias de

transporte entre o Complexo de Golgi e o fagossoma e pode contar para a ausência de bombas H^+ -ATPases e certas proteases nos fagossomas micobacterianos. Lipídios micobacterianos como Man-LAM e PIM podem ser responsáveis por alguns destes eventos, como mostra a Figura 11 (Hestvik *et al.*, 2005).

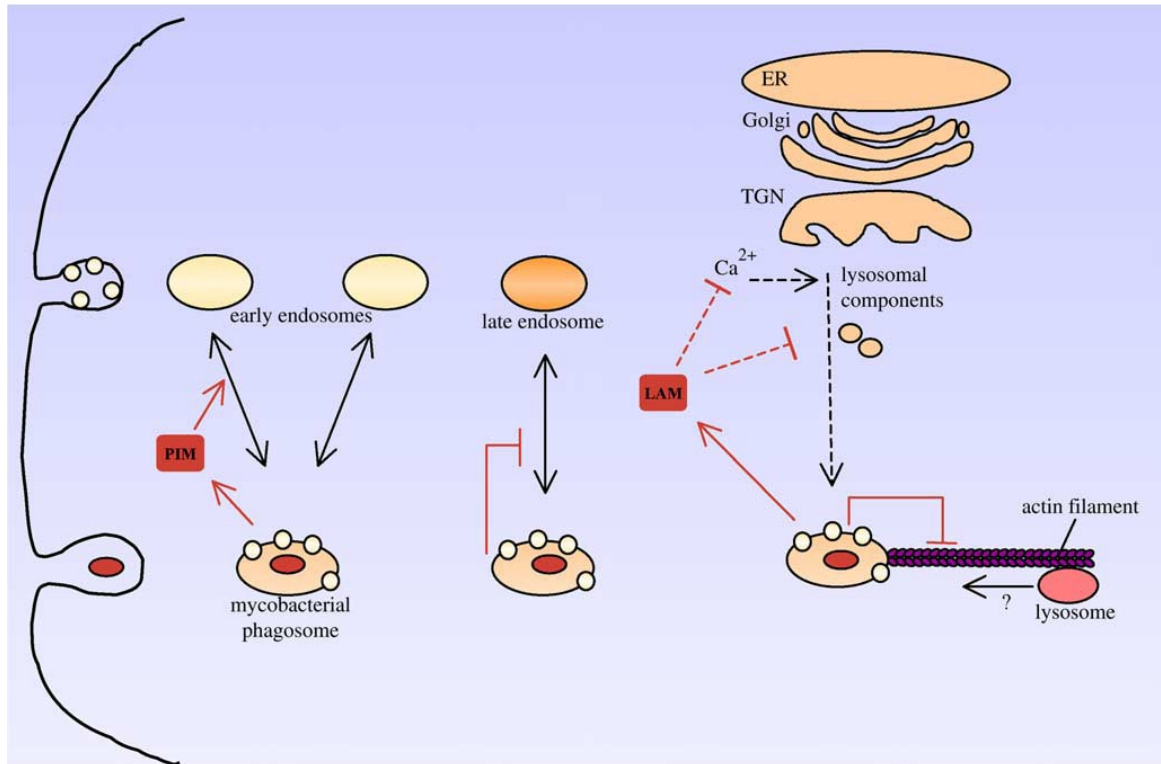


Figura 11 – Via endossomal/lisossomal da fagocitose das micobactérias (Adaptado de Hestvik *et al.*, 2005)

A falha dos fagossomas micobacterianos tanto em adquirir ou perder os marcadores associados com a maturação dos fagolisossomas indica que estes fagossomas não participam na série normal dos eventos de fusão necessários para gerar um ambiente antibacteriano dentro do fagolisossoma. Dados recentes sugerem que as micobactérias bloqueiam ativamente a maturação do fagossoma através da manipulação da maquinaria endossomal da célula hospedeira. Especificamente, estudos recentes desenvolvidos por Fratti e colaboradores demonstraram que os fagossomas contendo micobactérias ou produtos micobacterianos falham em recrutar moléculas efetoras importantes para a biogênese fagossomal (Fratti *et al.*, 2001). Apesar desta inibição da maturação do fagossoma ter sido mostrada em vários modelos, é aparente que a capacidade da micobactéria bloquear a formação do fagolisossoma é reduzida na presença de citocinas capazes de ativar o macrófago (Schaible *et al.*, 1998; Via *et al.*, 1998).

Os macrófagos produzem várias quimiocinas (ex.: RANTES e MCP-1) e citocinas (ex.: TNF- α e IL-1 β) após a infecção micobacteriana e estas moléculas imunes efetoras são necessárias para o recrutamento e ativação de leucócitos e o subsequente controle da infecção micobacteriana (Flynn & Chan, 2001).

Em particular, a ativação de macrófagos por células T estimuladas é de fundamental importância durante a infecção micobacteriana e resulta na expressão aumentada de mediadores antimicobacterianos como intermediários reativos de nitrogênio. Mantendo nosso foco que as micobactérias patogênicas ativamente limitam a resposta dos macrófagos, estas bactérias consistentemente induzem menos TNF- α e óxido nítrico sintase (NOS) que as micobactérias menos virulentas (Falcone *et al.*, 1994; Beltan *et al.*, 2000).

A capacidade das micobactérias mais virulentas de limitar a maturação do fagolisosoma e a produção de mediadores inflamatórios sugere que as micobactérias patogênicas iniciam um processo ativo para manipular as vias de transdução de sinal dos macrófagos. Isso é confirmado pela observação que as micobactérias patogênicas mortas são transportadas através do processo de maturação dos fagossomas (Barker *et al.*, 1997) e mostram produção diferencial de moléculas efetoras comparada à induzida pelas micobactérias vivas (Beltan *et al.*, 2000).

Um aspecto interessante das micobactérias é o seu extraordinariamente alto teor lipídico no envelope celular (Figura 12), constituindo mais que 40% do seu peso seco (Anderson, 1940). Além de conferir únicas propriedades tintoriais, que ajuda no diagnóstico de espécimes clinicamente infectantes, é importante no direcionamento das interações patógeno-hospedeiro (Petros *et al.*, 2004).

LAMs (lipoarabinomananas) são glicolipídios restritos às micobactérias e um dos moduladores das funções dos macrófagos e células dendríticas (DC). ManLAMs (*mannose-capped lipoarabinomannan*) são caracterizados pela presença de capas manosiladas e são encontradas nas micobactérias de crescimento lento: *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. bovis* BCG.

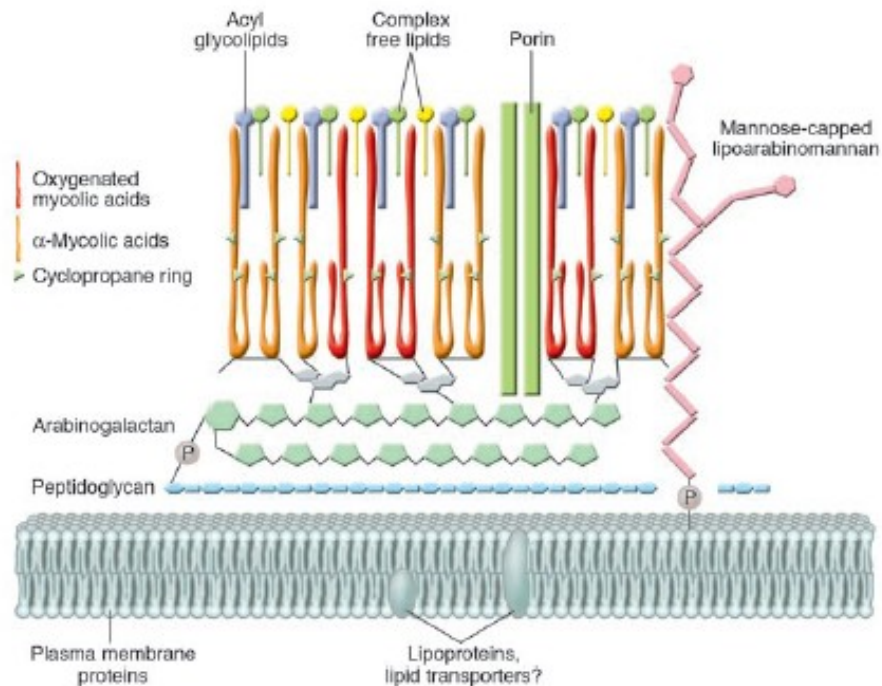


Figura 12 - Representação esquemática do envelope celular da *M. tuberculosis* segundo Riley, 2006

A ligação de ManLAM às DCs imaturas bloqueiam a maturação mediada por LPS e a secreção de IL-12. Sua ligação com o receptor DC-SIGN das células dendríticas interfere nos sinais de maturação como também induz a secreção de IL-10, contribuindo assim para a supressão da resposta imune. A ligação com DC-SIGN é uma das estratégias usadas pela *M. tuberculosis* para escapar da vigilância do sistema imune.

ManLAMs ativam a tirosina fosfatase SHP-1. É aceito que ManLAMs exercem suas funções anti-inflamatórias através da desfosforilação de quinases como MAPK, envolvidas na produção de TNF- α e IL-12. Muitas evidências sugerem que os macrófagos infectados com micobactérias sofrem apoptose. ManLAM é amplamente responsável pela inibição da apoptose, pois promove a fosforilação de Bad, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, que inibe a função de Bcl-X_L seqüestrando-o como heterodímero. ManLAM também é capaz de prevenir o influxo de cálcio induzido pela *M. tuberculosis* e conseqüentemente inibir os eventos dependentes de cálcio associados com a apoptose. Diferentemente de ManLAM, PIM₂s (fosfatidilinositol dimanosídeo) liberados pelas micobactérias intracelulares induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α e MCP-1 que são importantes promotores de uma resposta granulomatosa.

1.3.2. Receptores Toll-like

Receptores Toll-like (TLRs), amplamente distribuídos nas células do sistema imune, são sensores imunes para detecção de patógenos invasores, e suas vias de sinalização então ativadas iniciam a resposta imune inata e ajudam para uma melhor e mais forte resposta imune adquirida. São evolutivamente conservados e atuam no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), incluindo PAMPs de vírus, bactérias, fungos e parasitas (Figura 13). TLRs pertencem à superfamília TIR (receptores Toll/Interleucina-1), que é dividida em dois principais subgrupos: os receptores IL-1 e os TLRs. Todos os membros desta superfamília sinalizam de maneira semelhante utilizando um domínio conservado (TIR) na região citosólica, que ativa vias comuns de sinalização, mais notavelmente aquelas que levam à ativação do NF- κ B e proteínas quinases ativadas por estresse (Liew *et al.*, 2005).

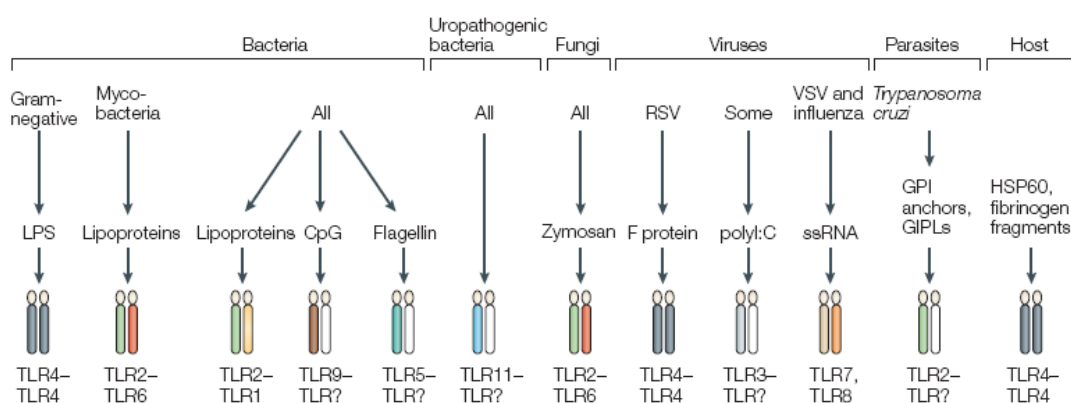


Figura 13 - Esquema mostrando a variedade de produtos derivados de patógenos reconhecidos pelos receptores Toll-like segundo Liew *et al.*, 2005

A ativação de TLR é uma faca de dois gumes. É essencial para gerar a resposta imune inata e aumentar a imunidade adaptativa contra patógenos. Entretanto, membros da família TLR também estão envolvidos na patogênese de doenças auto-imunes, inflamatórias crônicas e infecciosas. Por exemplo, uma das doenças mais severas é a sepsis causada por LPS, agonista de TLR4. Além disso, TLR9 parece estar envolvido no lúpus eritematoso sistêmico pela ativação direta de células B auto-reativas. TLRs podem também promover a patogênese de infecções pela hiper-indução de citocinas pró-inflamatórias, facilitando o dano tecidual ou por uma imunidade protetora deficiente pela indução de células T reguladoras. É

provável que a maior parte das doenças imunes e inflamatórias tenham de alguma forma um componente TLR envolvido. A natureza diversa de patógenos e proteínas de estresse são de tal ordem que se não forem checados, o hospedeiro ficará sobrecarregado de ativação imunológica. A sinalização e as funções de TLR são necessárias e precisam ser cuidadosamente controladas (Liew *et al.*, 2005).

A sinalização de TLR é iniciada pela dimerização dos TLRs, que pode formar homodímeros (como TLR4) ou heterodímeros (como TLR2 e TLR1). Todos os TLRs, com exceção do TLR3, utilizam a proteína adaptadora MyD88 para a sinalização (Figura 14).

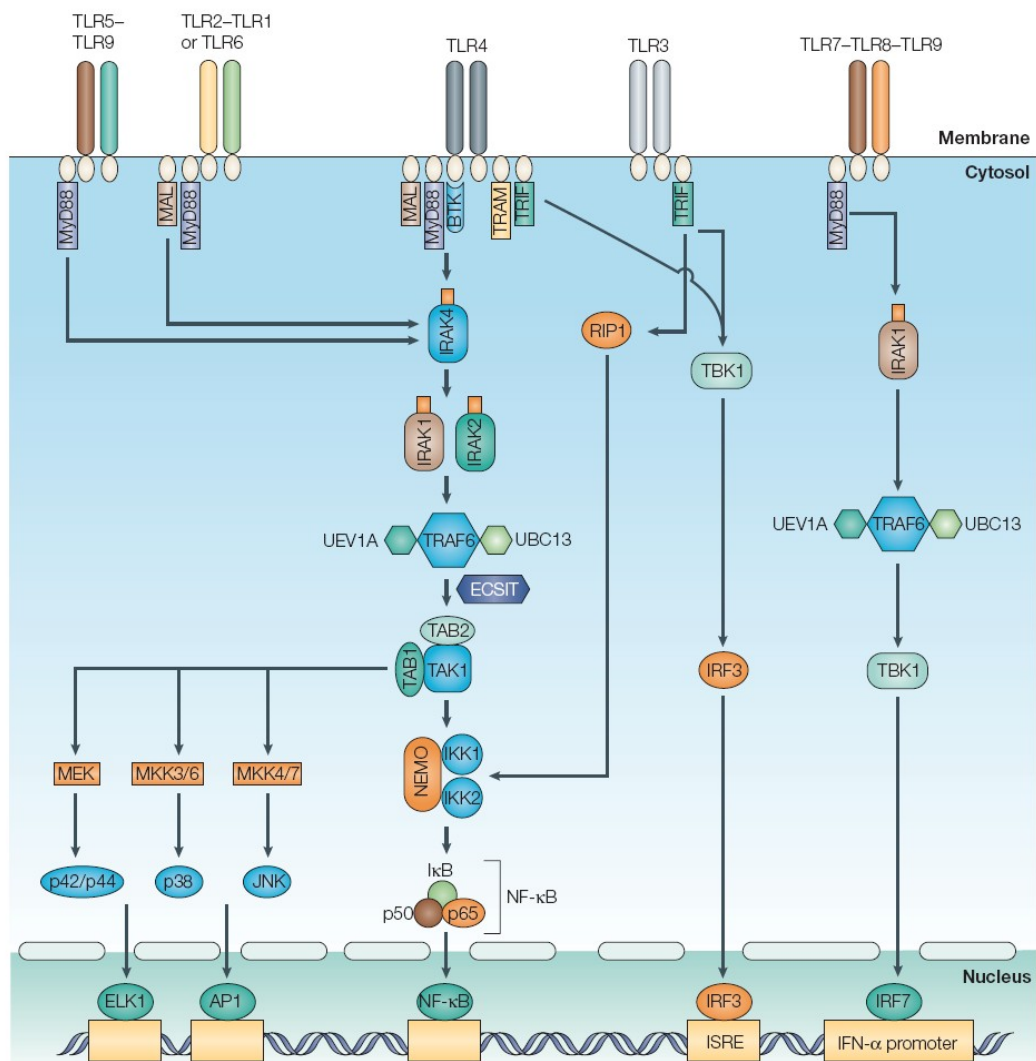


Figura 14 - Moléculas adaptadoras na sinalização de TLR. (Liew *et al.*, 2005)

Abreviações: AP1, *activator protein 1*; BTK, *Bruton's tyrosine kinase*; ECSIT, *evolutionarily conserved signaling intermediate in Toll pathway*; ISRE, *IFN-stimulated response element*; MKK, *MAP kinase kinase*; TAB2, *transforming growth factor-activated kinase (TAK)-binding protein-2*.

Na ativação do receptor, MyD88 é recrutado para o receptor através do seu domínio TIR, que interage com o domínio TIR do TLR. Isso permite o recrutamento e a ativação de uma família de quinases downstream, chamada IRAKs (quinases associadas ao receptor IL-1) 1, 2 e 4. IRAK4 é recrutada primeiro ao complexo, torna-se ativada e fosforila IRAK1. Essas quinases interagem com MyD88 através dos domínios comuns de morte a ambas proteínas, o que subsequente leva a ativação de TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de fator de necrose tumoral).

A ativação de quinases downstream, incluindo as quinases inibidoras de NF- κ B (IKKs), resulta na liberação de NF- κ B de I κ B, permitindo a translocação de NF- κ B para o núcleo que medeia um aumento na expressão de genes de citocinas inflamatórias. Ocorre também a ativação de MAPK (*mitogen-activated protein kinases*) como ERK 1/2 MAPK e JNK (*mitogen-activated protein*). Essas vias levam à produção de citocinas como fator de necrose tumoral (TNF) e outras proteínas pró-inflamatórias. MyD88 tem sido recentemente relacionado durante a ativação de IRF7 (*interferon (IFN)-regulatory factor 7*), que leva à indução de interferon- γ (Liew *et al.*, 2005).

Portanto, os TLRs utilizam a proteína adaptadora MyD88 para propagar os sinais aos genes alvos e gerar uma rápida resposta protetora, seja pela ativação de NF- κ B ou via outras rotas. MyD88 é também usado por outras vias de sinalização inflamatórias (ex.: IL-1 e IL-8). Entretanto, pelo menos dois TLRs (TLR3 e TLR4) podem usar adaptadores alternativos como TRIF (*Toll/IL-1 receptor-domain containing adaptor protein inducing IFN- β*) e TRAM (*TRIF-related adapter molecule*; usado por TLR4) que podem ativar respostas distintas daquelas induzidas por MyD88. Então, TLR4, por exemplo, pode utilizar tanto MyD88/TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*) como TRAM/TRIF para gerar respostas diferentes. Enquanto MyD88 tipicamente ativa NF- κ B, TRAM e TRIF podem ativar IRF-3 e IRF-7 e também induzir a ativação tardia de NF- κ B (Doherty & Arditi, 2004).

A imunidade inata orquestra a resposta adquirida através de TLR. No caso da infecção micobacteriana, as micobactérias são incorporadas em fagossomas das células apresentadoras de antígenos (APCs) por um dos muitos receptores. A sinalização por TLR é estimulada pela associação do TLR com os PAMPs localizados na superfície dos patógenos. Os fragmentos antigênicos são processados e apresentados por moléculas MHC II aos linfócitos T, que são então ativados. Uma sinalização TLR-MyD88 normal resulta em uma rápida e potente indução de citocinas do tipo Th1, essenciais para uma imunidade inata defensiva,

mas que também exerce profundo impacto na imunidade adquirida subsequente. As células T ativadas expressam IFN- γ , que estimula as APCs ativadas a continuar a produção das citocinas Th1. Entretanto, na ausência de MyD88, a expressão destas citocinas é profundamente comprometida, e citocinas Th2 podem então predominar e atenuar inapropriadamente a resposta defensiva (Figura 15).

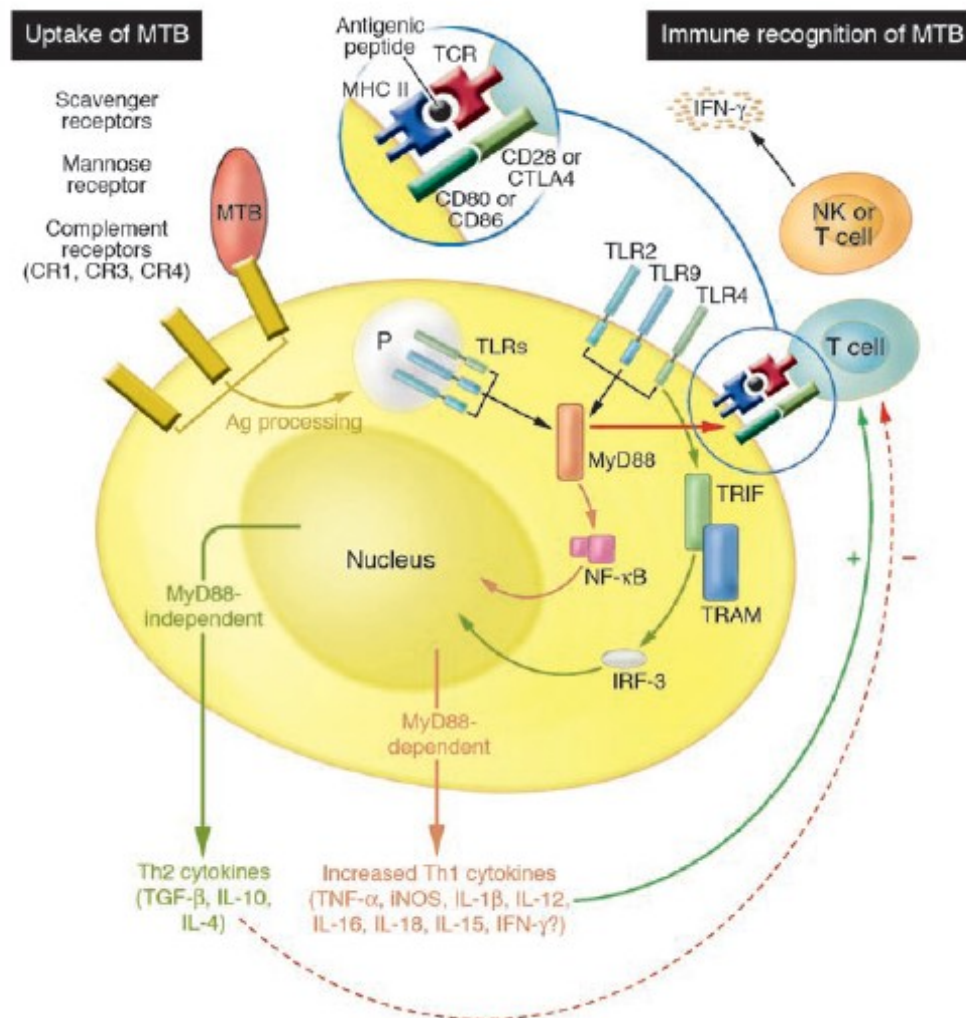


Figura 15 - Ponte entre as imunidades inata e adquirida. (Doherty & Arditi, 2004)

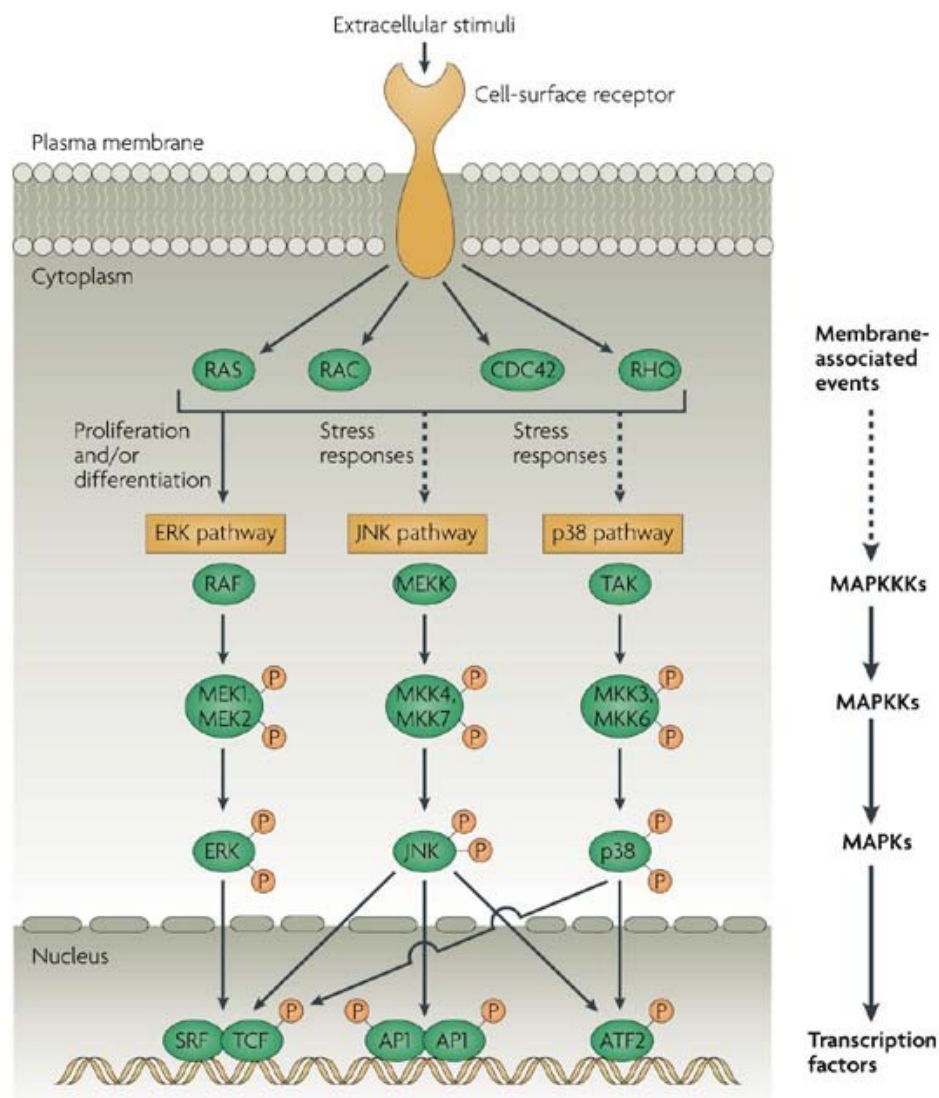
1.3.3. Cascatas “mitogen activated protein kinase” (MAPK) de sinalização celular

As cascatas MAPK, mostradas na Figura 16, estão envolvidas na mediação de respostas celulares aos sinais extracelulares e exercem um importante papel no balanço dinâmico entre a sobrevivência e a morte celular (Lewis *et al.*, 1998).

Duas dessas cascatas MAPK, as vias c-Jun quinase (JNK) e p38, são ativadas pelo estresse celular e estão envolvidas na apoptose como fatores pró-

apoptóticos (Leppa & Bohmann, 1999; Basu & Kolesnick, 1998). Vários estudos têm demonstrado que a ativação das quinases das vias p38 e JNK promove a apoptose das células (Kummer *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1995).

Em contraste com as proteínas quinases ativadas por estresse, as quinases reguladas pelos fatores extracelulares de crescimento e sobrevivência, p42/p44 (ERK 1 e 2) e a proteína quinase B (PKB/Akt), estão geralmente envolvidas na inibição da apoptose (Buckley *et al.*, 1999; Romashkova & Makarov, 1999). O balanço dinâmico entre estas vias opostas pode ser importante para determinar se a célula sobrevive ou sofre apoptose (Xia *et al.*, 1995).



Nature Reviews | Immunology

Figura 16 – Diagrama esquemático mostrando as três vias de sinalização das MAPK segundo Liu *et al*, 2007

1.3.4. Fosfoinosítideo 3 quinase (PI3K)

PI3K é uma família de enzimas amplamente expressas, e através da geração de segundos mensageiros exercem papel fundamental na regulação de muitos processos celulares. A ativação de PI3K forma uma das principais vias de sinalização intracelular. Uma alta proporção de receptores celulares, especialmente aqueles ligados a tirosina quinases ativa PI3K, e uma ampla variedade de funções celulares e eventos parecem ser influenciados pelos produtos lipídicos gerados por essas enzimas (Figura 17) (Stein & Waterfield, 2000).

A atividade enzimática primária das PI3Ks é a fosforilação de lipídios inositol. Diferentes membros da família PI3K geram diferentes produtos lipídicos (Stein & Waterfield, 2000).

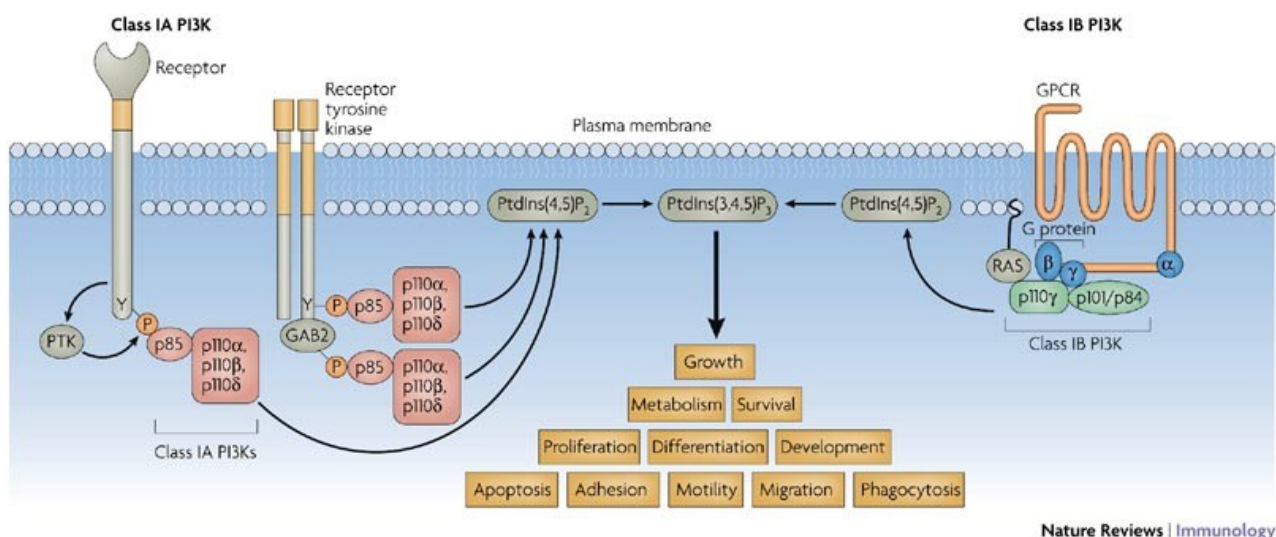


Figura 17 - PI3Ks: ligando os receptores da superfície celular às suas muitas funções na célula (Rommel *et al.*, 2007)

PI3K foi inicialmente purificado como um complexo heterodímérico consistindo de uma subunidade catalítica de 110kDa, conhecida como 110 α , e uma subunidade reguladora/adaptadora de 85kDa, conhecida como 85 α . Atualmente, oito PI3Ks são conhecidos e divididos em três classes: Classe Ia / Ib, II e III (Stein & Waterfield, 2000).

PI3K e seu produto lipídico PI(3,4,5)P3 tem sido amplamente associado ao controle da polarização e da migração celular. Durante a quimiotaxia dos leucócitos, PI3K classe Ia (Figura 18) mostrou-se necessário para a extensão dos lamelipódios e para a migração em resposta a CSF-1, enquanto que PI3K classe Ib foi necessário

para a quimiotaxia de neutrófilos em resposta a uma variedade de mediadores inflamatórios (Raftopoulou & Hall,2004).

Um sutil equilíbrio existe entre as atividades das pequenas GTPases GTPases Rac e Rho. A ativação de Rac é responsável pela estimulação do espalhamento e migração celular, enquanto a ativação de Rho promove a contratilidade e adesão celular. O balanço entre estes dois membros da família das GTPases é determinante para os rearranjos do citoesqueleto, controlando a morfologia celular e a migração (Caron, 2003). Cdc42 exerce papel fundamental na definição da polarização celular em resposta aos estímulos externos (Raftopoulou & Hall,2004) .

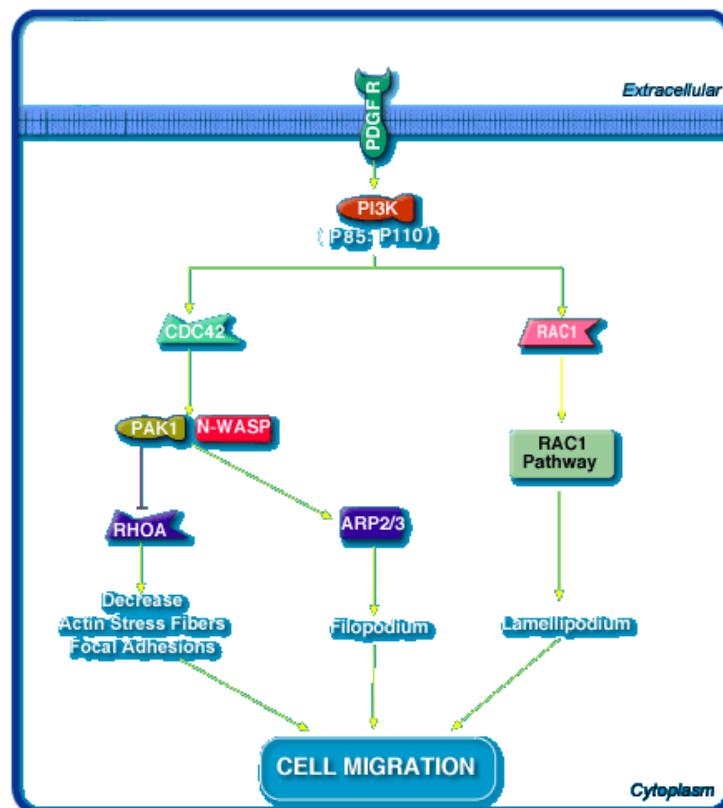


Figura 18 - Papel de PI3K na organização da actina e na migração celular.

http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/Pathways/BioCarta/h_cdc42racPathway/

1.3.5. Fator Nuclear κ B (NF- κ B)

O NF- κ B é um fator de transcrição eucariótico que existe potencialmente em todos os tipos celulares. Foi inicialmente descrito em 1986 como um fator nuclear necessário para a transcrição da cadeia leve *kappa* da imunoglobulina nas células B, daí o nome fator nuclear κ B (Sen & Baltimore, 1986). O NF- κ B pré-existe no citoplasma da maioria das células na sua forma inativa, ligada ao inibidor I κ B. Após receber um sinal apropriado, o NF- κ B é liberado do I κ B e é translocado até o núcleo, onde pode regular a transcrição de genes específicos (Figura 19). É importante notar que a capacidade do NF- κ B em responder a um sinal o faz um fator induzível, e o fato de a atividade do NF- κ B não requerer nova síntese de proteínas permite que o sinal seja transmitido rapidamente. O NF- κ B comunica-se com o citoplasma e o núcleo, sendo capaz de carrear mensagens diretamente aos seus alvos nucleares (Ghosh *et al.*, 1998).

Desde a descoberta do NF- κ B, seus sítios específicos (sítios κ B) têm sido caracterizados nos promotores e “enhancers” de muitos genes, fazendo do NF- κ B um componente importante na expressão induzida de muitas proteínas, incluindo citocinas, proteínas de resposta de fase aguda e moléculas de adesão celular (Grilli *et al.*, 1993; Kopp & Ghosh, 1995). Além desses genes induzíveis, o NF- κ B é encontrado na forma nuclear ativa em células B maduras, plasmócitos e alguns neurônios. Já que a diferenciação dessas células é definida pela produção de proteínas célula-específicas, a ativação constitutiva de NF- κ B provavelmente permite que algumas células mantenham um fenótipo diferenciado (Kopp & Ghosh, 1995).

NF- κ B é um dímero de membros da família de proteínas rel. Cada membro da família possui um domínio de homologia rel (RHD), que é uma região N-terminal conservada com aproximadamente 300 aminoácidos. Essa região é responsável pela ligação com o DNA, dimerização e interação com os membros da família I κ B (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , Bcl-3, I κ B- ϵ , p105, p100). O domínio de homologia rel contém a seqüência de localização nuclear (NLS), que é coberto com a ligação das proteínas inibidoras I κ Bs, retendo o NF- κ B no citoplasma (Karin, 1999).

Atualmente, são conhecidos cinco membros da família rel em mamíferos, NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA, RelB e c-Rel, que podem combinar-se de diferentes formas (Baeuerle & Henkel, 1994). Além de mostrar especificidade de ligação com o

DNA, cada combinação de proteínas rel tem seu próprio potencial de transativação (Verma *et al.*, 1995). Apesar da maioria das proteínas NF- κ B serem transcricionalmente ativas, algumas combinações parecem ser inativas ou repressoras. As combinações p50/p65, p50/c-rel, p65/p65 e p65/c-rel são ativas, enquanto p50/p50 e p52/p52 são transcricionalmente repressoras (Brown *et al.*, 1994; Hansen *et al.*, 1994). A primeira molécula de NF- κ B descrita foi o heterodímero das subunidades p50 e p65 (Auphan *et al.*, 1995; Kopp & Ghosh, 1995).

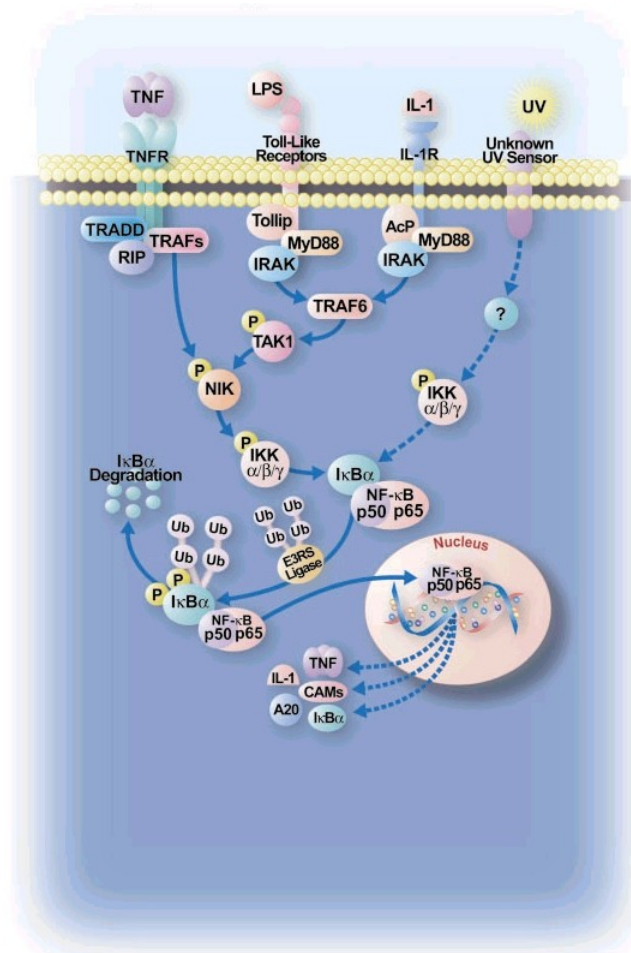


Figura 19 - Vias de ativação de NF- κ B

Muitos agentes induzem a ativação de NF- κ B, tais como intermediários de oxigênio reativo (ROIs), TNF- α , LPS, citocinas inflamatórias (IL-1, IL-2 e linfotoxina), proteínas de transativação viral, RNA dupla fita, esfingomiéline, ionóforos de cálcio, luz ultravioleta, éster de forbol (PMA), fatores de crescimento, estresse físico, inibidor de síntese protéica (ciclohexamida) (Sen & Baltimore, 1986; Ghosh *et al.*, 1998). A natureza dos sinais que levam à ativação de NF- κ B sugerem que este

participe na ativação das células do sistema imune, através da regulação positiva da expressão de muitas citocinas essenciais à resposta imune. Em particular, o NF- κ B estimula a produção de IL-1, IL-6, TNF- α , linfotóxina e IFN- γ . Algumas destas citocinas, como a IL-1 e o TNF- α ativam o NF- κ B, formando uma retroalimentação. O NF- κ B é uma proteína importante na regulação da resposta de fase aguda da inflamação, que é uma defesa sistêmica estabelecida para restabelecer a homeostase após uma infecção ou injúria (Ghosh *et al.*, 1998). É interessante notar que as drogas antiinflamatórias, como os salicilatos e o corticosteróide dexametasona, inibem a ativação do NF- κ B em células em cultura, sugerindo que o NF- κ B pode ser um bom alvo para possíveis terapias contra doenças inflamatórias crônicas (Kopp & Ghosh, 1995; Auphan *et al.*, 1995; Ray & Prefontaine, 1994; Scheinman *et al.*, 1994). Por outro lado, foi demonstrado que o tratamento com drogas inibidoras de NF- κ B aumenta a sensibilidade das células tumorais à indução de apoptose (Castonguay *et al.*, 1998).

Os trabalhos dos últimos anos demonstram que a ativação de NF- κ B em células diferentes está associada à resistência celular contra a apoptose (Wang *et al.*, 1996; Iimuro *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999), provavelmente através da transdução dos genes anti-apoptóticos TRAF1, cIAP-1, cIAP-2 (Beg & Baltimore, 1996).

1.3.6. Resposta imune

A imunidade mediada por células exerce o principal papel no controle das infecções intracelulares, como as causadas por micobactérias. As células T constituem-se no principal componente do mecanismo protetor estabelecido contra os antígenos micobacterianos e, por consequência, fornecem a especificidade para o sistema imune. As células T, apesar de serem essenciais para a resistência contra as micobactérias, não são por elas mesmas protetoras, mas atuam através de uma cooperação com os macrófagos. Estes são tanto ativadores como alvos das respostas das células T às micobactérias.

Os macrófagos, infectados com as micobactérias, apresentam antígenos micobacterianos às células T com receptores específicos antigênicos, levando a proliferação das mesmas. Após a infecção inicial com a *M. tuberculosis*, os macrófagos alveolares liberam citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas

IL-1, IL-6 e IL-12, TNF- α e GM-CSF, assim como IL-8 e RANTES, que facilitam o recrutamento de linfócitos e monócitos aos pulmões (Figura 20). O TNF- α exerce um papel central na formação e manutenção do granuloma, sendo considerado tanto protetor como patológico.

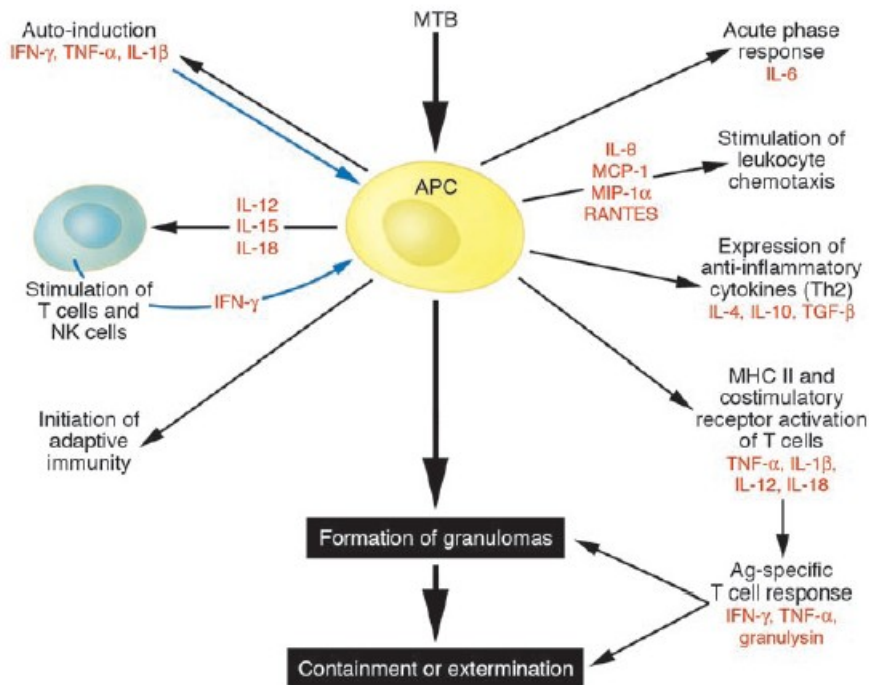


Figura 20 - Resposta imune multidirecional montada pelas APCs em resposta a MTB (Doherty & Arditi, 2004)

Apesar do TNF- α não ser essencial na indução das funções anti-tuberculosas do macrófago, esta citocina é um importante co-estimulador de IFN- γ . A IL-12 ativa as células NK e induz o desenvolvimento das células Th1. A secreção da IL-12 pelos macrófagos infectados por BCG depende da co-estimulação por IFN- γ (Barnes *et al.*, 1993).

Os macrófagos infectados também liberam IL-1, que estimula as células T a produzir IL-2, um fator de crescimento da célula T, e a expressar nas mesmas os receptores de superfície para esta interleucina. Os macrófagos pulmonares também liberam as citocinas IL-10 e TGF- β . O TGF- β , junto com IL-4, participa na regulação negativa das respostas Th1. A IL-10 inibe a ativação dos linfócitos T pelos macrófagos, inibe a formação de Th1, impedindo a formação de granulomas, provocando a disseminação da infecção (Tripp *et al.*, 1995).

As seguintes quatro subpopulações distintas de células T são freqüentemente consideradas como participantes da resposta imune contra as micobactérias: células T CD4⁺ α/β TCR, CD8⁺ α/β TCR, CD4⁻CD8⁻ δ/γTCR e CD4⁻CD8⁻ α/β TCR (Kaufmann & Andersen, 1998).

Os linfócitos T CD4 exercem importante papel nas defesas humanas contra a tuberculose. A falta de células CD4 em camundongos resulta numa infecção descontrolada por BCG, enquanto a transferência de células CD4 de animais sensibilizados confere proteção contra a tuberculose. O risco de desenvolvimento de uma tuberculose pulmonar e formas severas de doenças extrapulmonares correlaciona-se com o declínio da contagem de linfócitos CD4⁺ em humanos HIV positivos (Bloom *et al.*, 1999).

As células T CD4⁺ compreendem duas populações funcionalmente distintas, de perfil Th1 e Th2, que necessitam de diferentes fatores co-estimulatórios e formas de apresentação de antígenos. As células auxiliares Th1 produzem IFN-γ e IL-2, aumentando a atividade microbicida dos macrófagos e a DTH (hipersensibilidade do tipo tardio), que resulta na formação de granulomas e na eliminação das micobactérias. As células auxiliares Th2 produzem predominantemente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, favorecendo o crescimento das células B e a produção de anticorpos. Na infecção micobacteriana, as defesas efetivas do hospedeiro são dependentes da formação da resposta imune do tipo Th1 (Kaufmann & Andersen, 1998).

As células T CD8⁺ são linfócitos T citolíticos (CTLs) que lisam as células infectadas dos hospedeiros, sendo essenciais para o controle das infecções causadas pelos parasitas intracelulares. As CTLs contêm moléculas efetoras dentro de seus grânulos. Após o reconhecimento da célula-alvo pelo TCR dos CTLs, os grânulos fazem a exocitose de seu conteúdo, que atua diretamente nas células-alvo. Os componentes dos grânulos incluem perforina, que forma poros na membrana das células-alvo, levando à morte celular, e granzimas, que passa através dos poros formados pela perforina e induz apoptose através da ativação da cascata de caspases. Moléculas efetoras adicionais, incluindo granulicina, são encontradas dentro dos grânulos. A granulicina apresenta homologia de seqüência com a lisina das células NK ("natural killer"), e ambas moléculas expressam atividade citolítica. A granulicina foi demonstrada recentemente exercer atividades microbicidas, causando então a morte das bactérias intracelulares (Kaufmann, 1999). As células CTLs expressam Fas ligante (FasL), regulado positivamente pela estimulação do receptor de célula T (TCR). A interação de FasL com Fas nas células-alvo induz

uma cascata de moléculas de caspases, que por fim resulta na fragmentação do DNA e morte por apoptose das células do hospedeiro (Kaufmann & Andersen, 1998).

Além das células T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais, outras populações de células T não-convencionais participam da resposta às micobactérias como as células T $\gamma\delta$, que reconhecem fosfoligantes na ausência de moléculas de apresentação conhecidas, e as células duplo-negativas (DN), que são específicas para os glicolipídios micobacterianos apresentados por moléculas de CD1 (Laochumroonvorapong *et al.*, 1996). Estas moléculas contribuem na eliminação das micobactérias através da morte das células infectadas.

As citações acima relatadas demonstram a grande importância da imunidade celular na proteção contra as micobactérias.

1.4. MORTE CELULAR

A morte celular ocorre através de duas maneiras: necrose e apoptose. A necrose é um processo de morte acidental na qual a célula exibe características morfológicas e fisiológicas distintas, incluindo mudanças na função e morfologia mitocondrial e na capacidade da membrana plasmática em regular a pressão osmótica. Inicialmente, uma progressiva hidratação do citoplasma (Figura 21a) gerada pelo descontrole dos canais iônicos presentes na membrana plasmática, ocorre seguida pelo rompimento da membrana e das organelas, permitindo o extravasamento do lisossoma no citoplasma e finalmente a desintegração nuclear e o completo rompimento da célula (Figura 21b). Uma conseqüente reação inflamatória no tecido adjacente geralmente acontece devido à liberação dos conteúdos celulares para o espaço extracelular. A necrose não é vista no desenvolvimento normal, mas é invariavelmente a resposta à injúria ou lesões tóxicas (Cohen, 1993; Savill, 1996).

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo de suicídio celular contido num programa genético e bioquímico altamente regulado e conservado evolutivamente, que exerce funções importantes durante o desenvolvimento e homeostase tecidual nos organismos multicelulares. As células em apoptose manifestam mudanças profundas na arquitetura celular caracterizada por uma morfologia distinta e, a nível bioquímico, pela clivagem do DNA cromossomal em

fragmentos internucleossomais. A apoptose, nos organismos multicelulares, permite a eliminação de células desnecessárias ou lesadas de uma maneira imunologicamente silenciosa, na qual as células apoptóticas expressando moléculas de superfície específicas são fagocitadas por células fagocíticas, evitando então o extravasamento dos conteúdos intracelulares que poderiam causar inflamação e lesão tecidual (Cohen, 1993; Savill, 1996). Sendo a função principal da apoptose regular o número de células e manter a homeostase, um descontrole no mecanismo da apoptose resulta no acúmulo inapropriado ou na perda prematura de células e, assim, leva a uma situação patológica.

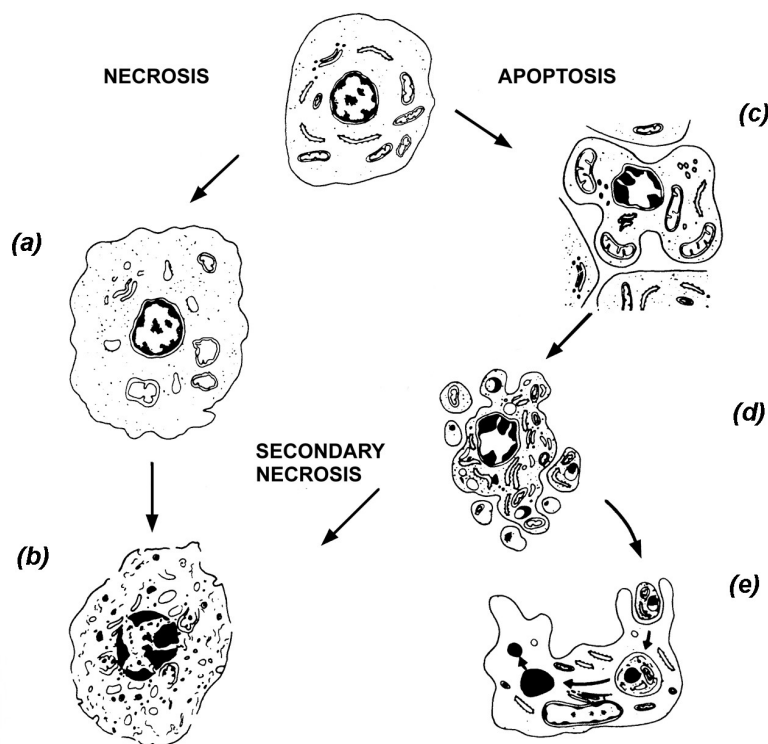


Figura 21 - Diferenças básicas entre apoptose e necrose (Blom, 2000)

Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo geneticamente controlado e determinado. Importantes modificações celulares durante a apoptose são a condensação e fragmentação da cromatina (Figura 21c), perda de volume celular e modificação do citoesqueleto, com formação de blebs na membrana plasmática (Figura 21d). Após estes eventos, corpos apoptóticos são formados contendo organelas e, geralmente, fragmentos nucleares. *In vivo*, os corpos apoptóticos são imediatamente reconhecidos e fagocitados pelas células vizinhas (Figura 21e) O reconhecimento das células apoptóticas pelos fagócitos deve-se ao movimento de

fosfolípídios da membrana apoptótica, como a fosfatidilserina, que passam do lado interno para o lado externo da membrana plasmática.

Uma das principais características bioquímicas da apoptose é o extensivo dano à cromatina nuclear que se revela como uma escada de fragmentos oligonucleossomais na eletroforese em gel de DNA. Apesar da fragmentação internucleossomal estar sempre associada à apoptose, este tipo de morte celular não é estritamente definida pela fragmentação internucleossomal e pode envolver outros tipos de fragmentação de DNA (Cohen, 1993; Savill, 1996).

A ativação das vias apoptóticas envolve uma variedade de indutores fisiológicos e não-fisiológicos determinados pela presença ou ausência de sinais extracelulares. Os principais grupos de indutores de apoptose são: 1) fatores de estresse – estresse oxidativo, radiação- γ ou UV, glicocorticóides e drogas anticancerígenas; 2) interação dos ligantes com os receptores de morte da superfície celular (DR - death receptors) que pertencem à superfamília de receptores TNF (TNFR1, Fas, DR3, DR4, DR5 e DR6) e 3) falta de fatores de crescimento e/ou fatores de sobrevivência (Cohen, 1993).

A célula responde aos sinais de morte de diferentes maneiras, dependendo da natureza do sinal e do comportamento celular, mas várias vias de transdução de sinal apoptótico juntam-se na fase efetora de apoptose, a ativação das caspases, proteases cisteínicas, que clivam seus substratos após o resíduo de aspartato, causando a morte celular.

As caspases são sintetizadas como zimógenos ou pró-enzimas (~30-50kDa) contendo um pró-domínio N-terminal associado a uma subunidade grande (~20kDa) e a uma pequena (~10kDa) (Cohen, 1997; Nicholson, 1999). As caspases podem ser subdivididas baseadas em vários critérios incluindo análise filogenética, especificidade de substrato e o comprimento de seus domínios pró. As caspases “iniciadoras”, incluindo as caspases 8 e 9, contêm longos pró-domínios que as permitem interagir com proteínas adaptadoras específicas. Tais interações levam as caspases iniciadoras a uma estreita proximidade com outras, ocorrendo a ativação de um zimógeno pelo outro (Muzio *et al.*, 1998). As caspases iniciadoras são responsáveis direta ou indiretamente pela ativação de várias caspases “efetoras”, incluindo as caspases 3, 6 e 7, que contêm pequenos pró-domínios. As caspases efetoras clivam várias proteínas estruturais e regulatórias, aproximadamente 40 proteínas são conhecidas como alvos (ex.: DFF45/ICAD, PARP, lamininas, citoqueratinas, STAT-1, etc.) e são diretamente responsáveis pela maioria das

características morfológicas de apoptose, causando a morte celular (Nicholson, 1999; Kumar, 1999).

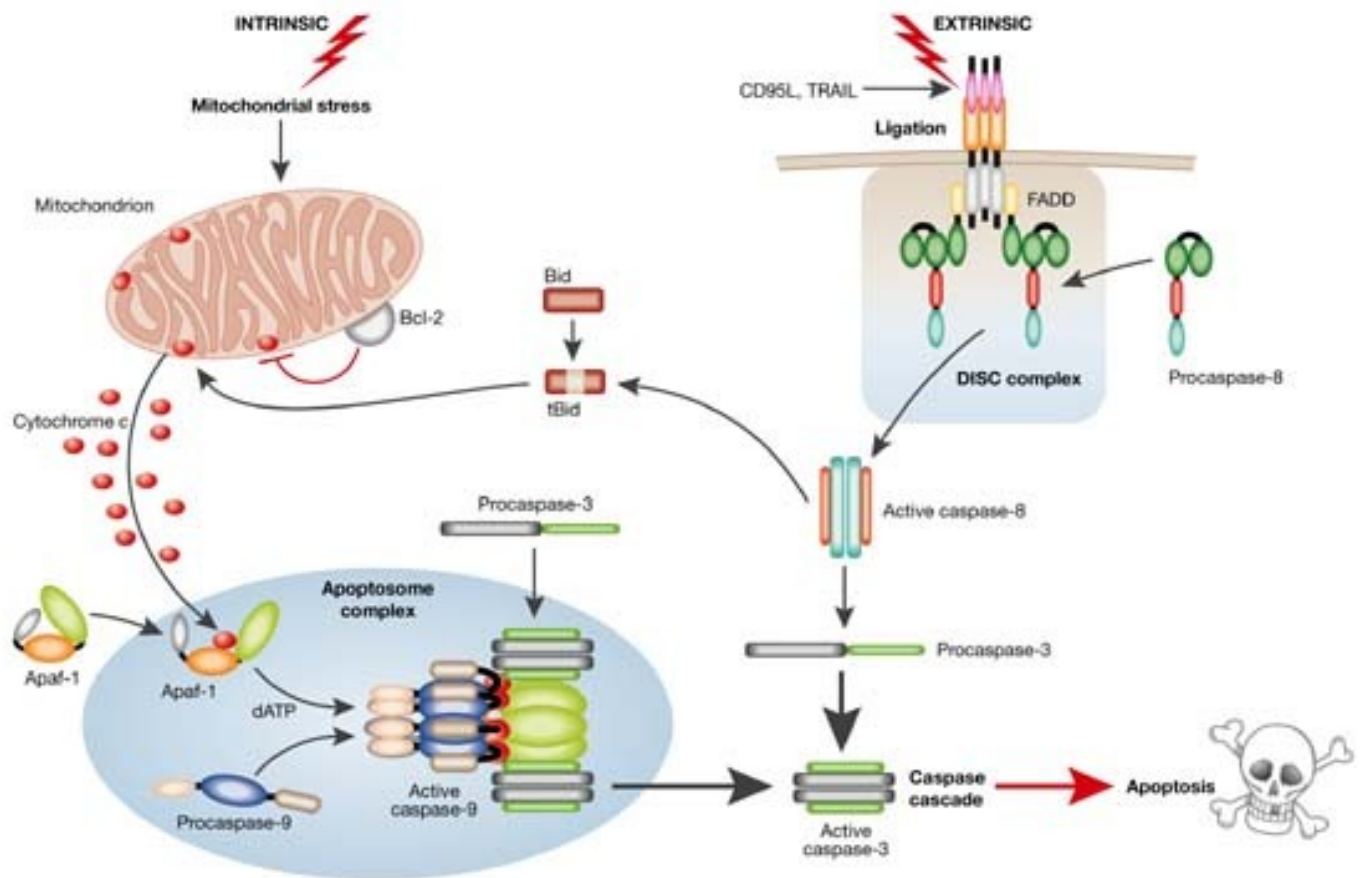


Figura 22 – Esquema de ativação das caspases na apoptose segundo MacFarlane & Williams, 2004

A ativação das caspases pelos fatores de estresse, na maioria dos casos, é mediada pelas mudanças mitocondriais (morte celular mediada pela mitocôndria), que causam a liberação das moléculas de citocromo C pela mitocôndria, que se ligam com moléculas adaptadoras de APAF-1, formando o complexo chamado apoptosoma, iniciando a clivagem de caspase 9 e outras caspases da cascata. A transdução do sinal através dos receptores de morte envolve a ligação de domínio de morte citoplasmático do receptor com moléculas adaptadoras FADD e RIP, com a formação do complexo DISC, iniciando a clivagem da caspase 8, caspase iniciadora da cascata das caspases efetoras (Figura 22) (MacFarlane & Williams, 2004).

A transdução do sinal apoptótico até a ativação das caspases e clivagem dos substratos é rigorosamente regulada em vários níveis pelas moléculas reguladoras de apoptose especializadas (as proteínas da família de bcl-2, moléculas IAPs,

FLIPs) e não-especializadas, que tem outras funções na fisiologia celular (oncogene c-myc, p53) (Kaufmann & Earnshaw, 2000).

A família Bcl-2 de proteínas da maquinaria central apoptótica inclui mais de doze proteínas que regulam tanto a morte celular como a sobrevivência (Cohen, 1993; Savill, 1996). Enquanto a expressão de algumas proteínas da família Bcl-2, como Bcl-2 e Bcl-x_L, suprime a apoptose, a expressão de outras, como Bax, Bad, Bak a promove. Foi sugerido que os fatores pró-apoptóticos Bax e Bak, quando dimerizam-se, formam canais iônicos, através de seus domínios formadores de poros, promovendo a liberação do citocromo c. A presença de Bcl-2 ou Bcl-x_L, capazes ligar Bax e Bak, previne a transição da permeabilidade mitocondrial e a liberação do citocromo c (Rathmell & Thompson, 1999). Bad, a proteína que fica no citoplasma, quando defosforilizada liga-se com Bcl-2 substituindo Bax nos heterodímeros Bcl-2/Bax, o que permite dimerização de Bax entre si, promovendo liberação do citocromo c.

A lista de moléculas envolvidas na regulação de apoptose vem aumentando. Entre estas, encontram-se moléculas chaves dos processos infecciosos e inflamatórios. As proteínas de estresse (hsp70), bem conhecidas como fator de sobrevivência celular, podem proteger as células através da regulação negativa da apoptose (Mosser *et al.*, 1997; Buzzard *et al.*, 1998).

A síntese de alguns reguladores de apoptose depende da ativação de determinados fatores de transcrição. A ação dos fatores pró e anti-apoptóticos é freqüentemente afetada pela modulação do estado de fosforilação destes, determinado pelo tipo de quinase envolvida no processo. As cascatas das quinases e fatores de transcrição envolvidos na regulação de apoptose estão sobre intensa investigação atualmente.

1.4.1. Regulação da morte da célula hospedeira por patógenos intracelulares

A regulação da apoptose da célula hospedeira é um fator determinante nas interações patógeno-hospedeiro. Os patógenos intracelulares manipulam a apoptose da célula hospedeira de diferentes maneiras para aumentar seu tempo de vida dentro das células infectadas ou espalhar a infecção quando atingidas por um estímulo externo.

Foi demonstrado que algumas bactérias, como *Shigella* e *Salmonella*, induzem a apoptose nos macrófagos *in vivo* e *in vitro*, num processo essencial para

a internalização bacteriana e o subsequente escape para o citosol. No citosol, a *S. flexneri* transloca, via um sistema de secreção do tipo III, o “invasion plasmid antigen B” (IpaB), que diretamente liga e ativa a caspase 1, resultando na apoptose (Gao & Kwaik, 2000a).

A ativação da caspase 1 e a morte por apoptose dos macrófagos infectados com *Shigella* causam a liberação da interleucina (IL)-1 β , que recruta leucócitos polimorfonucleares (PMNs) para os sítios de infecção, promovendo uma massiva invasão secundária da bactéria e inflamação aguda. Entretanto, a apoptose dos macrófagos é parte importante da patogenia da disenteria. *Salmonella* e *Listeria* apresentam mecanismos de invasão parecidos. A listeriolisina de *L. monocytogenes* foi demonstrada inserir-se na membrana mitocondrial causando a liberação do citocromo c, que ativa a cascata de caspases. Alternativamente, sua inserção na membrana mitocondrial e/ou do retículo endoplasmático pode causar um efluxo de Ca²⁺, ativando a protease calpaína dependente de Ca²⁺ e/ou as caspases (Gao & Kwaik, 2000b).

Foi demonstrado por Gao & Kwaik que as clamídias, rickettsias e coxielas, bactérias intracelulares obrigatórias, inibem a apoptose, pelo menos nas etapas iniciais da infecção (Gao & Kwaik, 2000b). *C. trachomatis* foi demonstrada por Fan *et al.* ser capaz de proteger as células hospedeiras contra vários indutores, incluindo estaurosporina, droga anticancerígena etoposide, TNF- α e anticorpos anti-Fas (Fan *et al.*, 1998).

O papel da apoptose na infecção micobacteriana está sendo muito estudado atualmente. A modulação das vias apoptóticas pelas micobactérias parece ser complexa e inclui tanto a indução da morte celular como os sinais de sobrevivência celular. Está bem estabelecido que a infecção com *M. tuberculosis* induz a apoptose dos monócitos/macrófagos humanos e murinos *in vivo* e *in vitro* (Plácido *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1998; Manfredi *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1999; Santucci *et al.*, 2000). A *M. tuberculosis* induz apoptose nos macrófagos pelas vias dependentes de TNF- α e caspase 1. Tanto a produção de TNF- α e a indução de apoptose são mediadas pela ligação dos componentes da parede celular micobacteriana e/ou lipoproteínas ao receptor Toll-like (TLR-2) (Aliprantis *et al.*, 1999). Foi demonstrado que outras micobactérias menos patogênicas ou atenuadas, *M. avium*, BCG, também são capazes de induzir apoptose dos macrófagos, sendo que as bactérias atenuadas induzem significativamente mais apoptose nos macrófagos do que as cepas virulentas (Keane J *et al.*, 1997). Por outro lado, há

evidências que a infecção com *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guérin (BCG) previne a apoptose dos monócitos humanos (Kremer L *et al.*, 1997). Paradoxalmente, as *M.tuberculosis* e *M.avium* também protegem as células contra a apoptose iniciando a produção da IL-10 pelos macrófagos infectados, o que causa um aumento na produção do receptor TNF 2 solúvel (sTNFR2) neutralizando a atividade pró-apoptótica do TNF- α (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998, Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1999).

Mais recentemente, foi demonstrado por Park e colaboradores que isolados clínicos de *M. tuberculosis* crescem muito rapidamente e induzem necrose celular nos macrófagos infectados, mas mínima apoptose (Park *et al.*, 2006), fator fundamental para a patogênese da tuberculose. Fato demonstrado também por Chen e colaboradores, que demonstraram que as *M. tuberculosis* virulentas H37Rv, mas não as atenuadas H37Ra, induzem uma ruptura na membrana mitocondrial interna dos macrófagos levando-os à necrose, e favorecendo o espalhamento da infecção.



OBJETIVOS →

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar os mecanismos de modulação da morte celular programada e da atividade funcional dos macrófagos infectados por micobactérias virulentas e avirulentas.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a viabilidade e o tipo de morte dos macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 e macrófagos derivados de células de medula óssea de camundongos C57BL/c selvagens e C57BL *knockout* para TLR-2 infectados por micobactérias virulentas e avirulentas, *Mycobacterium bovis* BCG, *M. tuberculosis* cepas H37Ra e H37Rv e *M. avium* cepas 27 translúcida, 27 opaca, 104 translúcida e 104 opaca *in vitro*.
2. Investigar a importância da produção de TNF- α pelos macrófagos, infectados pelas micobactérias virulentas e avirulentas, na regulação da apoptose.
3. Investigar o mecanismo de regulação da apoptose pelas micobactérias patogênicas e atenuadas, através da avaliação da importância da ativação do complexo NF- κ B e das cascatas de quinases MAPK e PI-3K envolvidas na ativação dos macrófagos.
4. Avaliar as alterações morfológicas do citoesqueleto causadas pelas micobactérias nos macrófagos infectados e as vias de sinalização responsáveis por essas.



METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Linhagens celulares

Foram utilizadas várias linhagens celulares: macrófagos murinos das linhagens Raw 264.7, macrófagos humanos da linhagem THP-1 e macrófagos M1 derivados de células de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens e C57BL/6 *knockout* para TLR-2.

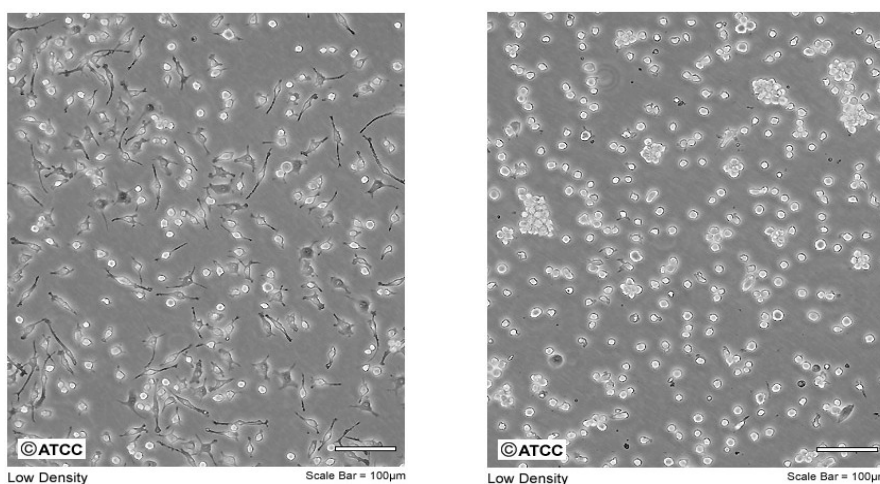


Figura 23 - Fotos ilustrativas das linhagens Raw 264.7 e THP-1

3.1.1. Cultura das células

As células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 e 75 cm² (Corning) em meio Dulbecco's modificado F-12 (DMEM F-12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) e 50 µg/mL de gentamicina (Gibco BRL) em estufa de CO₂ a 5% e 37°C (Forma Scientific – water-jacketed incubator) .

Para diferenciar os monócitos da linhagem THP-1 em macrófagos, as células foram plaqueadas com 20nM de forbol miristato (PMA). Após 18 horas, as culturas de monócitos já diferenciados em macrófagos tiveram o meio condicionado retirado e substituído por meio DMEM F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram cultivadas por mais 18 horas antes de serem infectadas pelas micobactérias.

As células de medula óssea de camundongos C57BL/6 selvagens e C57BL/6 *knockout* para TLR-2 foram retiradas e diferenciadas em macrófagos M1

adicionando ao meio de cultura 20% de meio condicionado da cultura da linhagem de fibroblastos L929 previamente coletado, centrifugado e armazenado a -20°C .

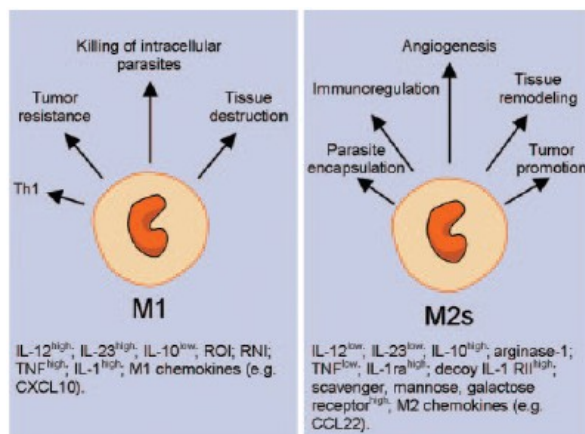


Figura 24 - Modelo esquemático indicando as diferenças entre os macrófagos diferenciados em M1 e M2 segundo Mantovani, 2006

Para os experimentos, os macrófagos foram plaqueados ($3 \cdot 10^5/\text{mL}$) em placas de 24 ou 96 poços (Costar) ou em garrafas de plástico de 25 ou 75 cm^2 (Corning), 18 horas antes da infecção.

3.2. Cepas de *Mycobacterium* sp utilizadas

Foram utilizadas sete cepas do gênero *Mycobacterium*.

As *Mycobacterium bovis* atenuadas (vacina onco-BCG viva, cepa Moreau, Copenhagen SEED#July, 1978) foram fornecidas pelo Instituto Butantan – São Paulo.

As *Mycobacterium avium* das cepas 27 e 104 translúcidas e opacas foram gentilmente cedidas pela professora Dr^a. Sylvia Luisa Pincherle Cardoso Leão da UNIFESP-SP.

As *Mycobacterium tuberculosis* das cepas H37Ra e H37Rv foram gentilmente cedidas pelo Dr. Phillip Suffys da FIOCRUZ-RJ.

3.3. Estoque e manutenção das culturas de *Mycobacterium* sp

3.3.1. Meios de cultura

Para a manutenção das culturas de *M. bovis* BCG e *M. avium*, foram utilizados os meios: sólido Middlebrook 7H10 (DIFCO) com 10% do suplemento OADC (BD) e líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO) com 10% do suplemento com ADC (BD).

Para a manutenção das colônias de *M. tuberculosis* H37Ra e H37Rv, foi utilizado o meio de cultura sólido Lowestein-Jansen.

3.3.2. Preparação de estoque

De uma cultura de micobactérias, em fase log (aproximadamente 8 dias), em meio líquido de 7H9-ADC, foi retirada uma alíquota de 850 μ L, transferida para um criotubo e adicionados 150 μ L de glicerol estéril. Os tubos foram mantidos a - 70°C.

3.3.3. Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Das amostras em questão, preparam-se diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶, utilizando PBS ou meio líquido 7H9-ADC estéreis, homogeneizando vigorosamente cada diluição. Semeia-se 40 μ L das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶ em triplicata nas placas com meio Middlebrook 7H10-OADC devidamente identificadas e espalha-se com a alça de Drigalski até secar. Coloca-se na estufa a 37°C. As UFCs podem ser contadas após 1 a 3 semanas de incubação aproximadamente.

3.3.4. Obtenção de colônias isoladas

No caso de obtenção de colônias isoladas, mergulha-se uma alça descartável estéril de 10 μ L no meio líquido 7H9-ADC contendo as micobactérias e esgota-se em 1/5 da placa de 7H10-OADC. Descarta-se a alça. Com outra alça, faz-se uma estria em zig-zag, puxando a primeira linha do esgotamento. Faz-se outra estria, em zig-zag, também com uma nova alça, puxando a primeira linha do começo da outra linha

(vide Figura 25). Vedam-se as placas com Parafilm® e coloca-se na estufa a 37°C. As colônias podem ser observadas após 15 dias.

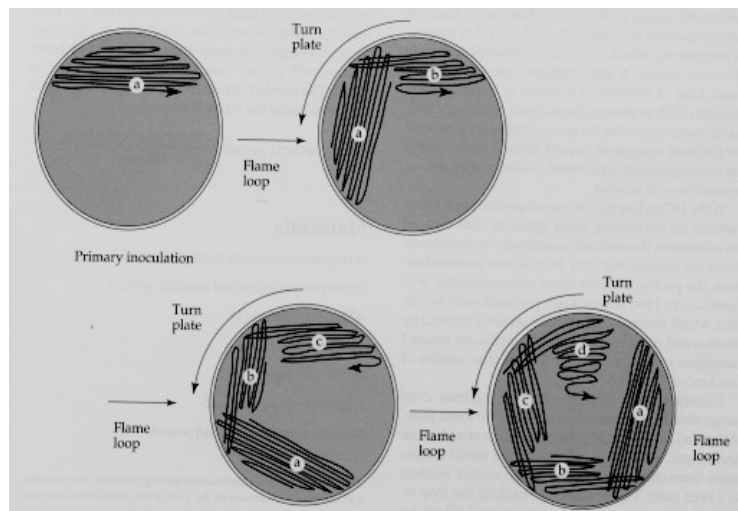


Figura 25 – Esquema de semeadura de micobactérias para isolamento de colônias

http://icb.usp.br/~bmm/materiais/bmm250_diurno2003.doc

3.4. Avaliação da viabilidade das culturas de *Mycobacterium sp*

Para a avaliação de viabilidade foi usado o método bacteriológico de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). As colônias foram contadas com o auxílio do microscópio invertido (Axioplan, Zeiss).

A viabilidade também foi avaliada através da análise da morfologia bacteriana por microscopia de fluorescência utilizando a coloração diferencial das bactérias vivas e mortas pelos corantes brometo de etídio (Sigma) 5µg/mL e laranja de acridina (Sigma) 5µg/mL.

3.5. Preparação do lisado de *M. bovis* BCG

Foram centrifugados 30mL da suspensão da vacina BCG à 4°C por 50 minutos a 4000 rpm. Adicionados ao sedimento 12mL do tampão de lise. O tubo contendo a BCG foi congelado no nitrogênio e descongelado à 37°C por 12 ciclos. Após esta etapa, a solução foi sonicada por 10 minutos a 100Hz e centrifugada novamente à 4°C por 50 minutos a 4000rpm. A concentração de proteínas foi quantificada pelo Método de Bradford.

3.6. Infecção dos macrófagos

Os macrófagos plaqueados foram infectados com *Mycobacterium bovis* BCG e/ou *M. avium* (das cepas 27 Op, 27 TI, 104 Op, 104 TI) e/ou *M. tuberculosis* H37Ra e H37Rv, na razão 1:1, 10:1, 30:1 e 50:1 bactérias:macrófago (MOI) ou tratados com lisado de *M. bovis* BCG ou de *M. tuberculosis* 1µg/mL. Após 3 horas de contato, o meio de cultura foi trocado para meio DMEM F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino para as células THP-1, 2% de soro fetal bovino para os macrófagos derivados de medula óssea e não suplementado para as células Raw 264.7.

Para destruir os grumos formados pelas micobactérias na suspensão, estas foram sonicadas por 60 segundos no banho de ultra-som (Ultrasonic Processor – model GE50T) e agitadas no vortex.

A padronização da dosagem das micobactérias foi feita em espectrofotômetro (Hitachi – Modelo U-1100) em DO 600nm.

3.7. Avaliação da fagocitose das micobactérias pelos macrófagos

Os macrófagos foram plaqueados em lamínulas e infectados com diferentes concentrações de micobactérias, como descrito no item 3.5. Após os períodos de incubação, as culturas foram lavadas com PBS e as lamínulas coradas com o uso da técnica de Ziehl-Nielsen e analisadas por microscopia óptica. As células infectadas e não-infectadas foram contadas e, o cálculo da porcentagem de células infectadas em relação ao total foi feito.

3.7.1. Método de Ziehl-Nielsen

Após a infecção dos macrófagos com as micobactérias, as lamínulas foram fixadas no fogo por 5 segundos, cobertas com fucsina de Ziehl (1% fucsina básica, 5% fenol cristalino, 10% álcool 95% em água destilada) e aquecidas até a emissão de vapores por 5 minutos, para permitir a entrada do corante através da parede celular das micobactérias álcool-ácido resistentes. O corante foi eliminado pela lavagem das lamínulas em água corrente de baixa pressão. As lamínulas foram mergulhadas na solução descorante (97% álcool etílico 95%, 3% ácido clorídrico concentrado) durante 1 minuto e depois foram lavadas em água corrente de baixa

pressão, para eliminar o descorante. Foram coradas com azul de metileno (0,5% azul de metileno, verde malaquita ou ácido pícrico em água destilada) por 30 segundos, lavadas em água corrente de baixa pressão e secas ao ar. Após os procedimentos, as lâminas foram observadas no microscópio óptico (Axioplan – Zeiss) com a técnica de campo claro.

3.8. Avaliação da viabilidade dos macrófagos e do tipo de morte celular nas culturas infectadas com *Mycobacterium* sp

Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e infectados com as micobactérias como descrito no item 3.6. Amostras dos macrófagos controle e infectados foram coletadas diariamente, dos dias 1 ao 14 após a infecção, para análise da cinética e o tipo de morte celular.

Para avaliar a viabilidade dos macrófagos, a cada dia após a infecção, as células foram coradas com azul de Trypan. Para avaliar o tipo de morte celular, os macrófagos foram corados com laranja de acridina e brometo de etídio.

3.8.1. Coloração dos macrófagos com laranja de acridina e brometo de etídio

Os macrófagos foram corados com os corantes de DNA laranja de acridina (5µg/mL) (Sigma) e brometo de etídio (5µg/mL) (Sigma) e analisados com o uso do Microscópio de Fluorescência (Axioplan - Zeiss) com aumento de 800x e filtro verde (Current Protocols of Immunology, 1998).

Foram adotados os padrões convencionais para a contagem da viabilidade com relação à morfologia das células, observadas por microscopia de fluorescência. A porcentagem de cada subpopulação celular (células vivas, apoptóticas e necróticas) em relação ao total foi calculada.

- células vivas - morfologia do núcleo intacto, DNA corado por laranja de acridina (cor verde)
- células apoptóticas:
 - a) primárias - condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por laranja de acridina (cor verde), que reflete a membrana plasmática intacta e não-permeável ao brometo de etídio

b) secundárias - condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, DNA corado por brometo de etídio (cor vermelha) e laranja de acridina, que demonstra a permeabilização necrótica da membrana plasmática que permite a entrada do brometo de etídio

● células necróticas - morfologia núcleo necrótico, corado por brometo de etídio

3.9. Avaliação do crescimento micobacteriano nos macrófagos infectados

Para avaliar o crescimento intracelular das micobactérias durante o período de experimentação, utilizamos o método bacteriológico de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC).

O crescimento micobacteriano foi avaliado nos seguintes pontos:

Dia 0 – após a troca de meio da cultura para meio fresco, depois do período de incubação de 3 horas;

Dia 6 – no sexto dia de infecção.

As células infectadas com MOI 1:1 foram lisadas com solução de saponina a 1% (concentração final de 0,1% na cultura) durante 20 minutos. Foram lisados dois poços para cada cepa estudada. Os poços foram misturados vigorosamente e o lisado diluído em diferentes concentrações (10^{-1} no Dia 0 e 10^{-3} no Dia 6), sendo 40 μ L (inóculo) de cada diluição plaqueados em meio Middlebrook 7H10. Foram feitas triplicatas de cada amostra.

O cálculo da quantidade de colônias foi realizado através de contagem de colônias após 21 dias. O número de CFU/mL foi obtido através da seguinte fórmula:

$$\text{CFU/mL} = [(\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 1000)/\text{inóculo}] \times \text{diluição}$$

Para apresentação dos resultados o n° de CFU/mL foi convertido para log₁₀.

3.10. Análise da produção de TNF- α pelos macrófagos infectados

Após 24 e 72 horas, os sobrenadantes dos macrófagos controles e infectados foram coletados para análise de TNF- α .

3.10.1. Bioensaio com células L929

As células L929 (linhagem de fibroblastos murinos) foram tratadas com solução de tripsina 0,025% + EDTA 0,2% e plaqueadas na concentração 2×10^5 células/mL com meio DMEM-F12 contendo 10% de SFB e 20 μ g/mL de gentamicina (100 μ L/poço), em placas de cultura com 96 poços (Corning). Após a incubação das placas a 37°C por 24 horas, o meio de cultura foi removido e 50 μ L das diluições seriadas dos sobrenadantes de Raw 264.7 ou da curva padrão contendo TNF- α recombinante e 50 μ L de meio de cultura com actinomicina D (2 μ g/mL) (SIGMA) foram adicionados para cada poço. A curva padrão de TNF- α recombinante foi iniciada em 200pg/mL com diluições subseqüentes na base 2 até 3.125pg/mL. Após nova incubação por 24h a 37°C, a viabilidade celular foi determinada pela técnica de MTT.

3.10.1.2. Teste MTT

As células L929 foram incubadas à 37°C durante 1 hora com 0,5mg/mL da solução de corante MTT (“3’-[4,5-dimethylthiazol-2yl] 2,5-diphenyltetrazolium bromide”). Esta droga, nas células vivas, é convertida em cristais azuis insolúveis (formazana) pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Para dissolver os cristais, 0,04M de HCl/Isopropanol foi adicionado às células sem o sobrenadante. A densidade óptica foi medida com o uso do leitor de ELISA (Dynatech MR5000) com filtro de teste 570nm e filtro de referência 630nm.

3.11. Avaliação da susceptibilidade dos macrófagos infectados à apoptose mediada por diferentes indutores

Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços, infectados com micobactérias conforme descrito no item 3.4 e após 18 horas de cultivo,

determinadas concentrações dos indutores padrão foram adicionadas para indução de apoptose.

Foram escolhidos indutores com diferentes vias de indução de apoptose: 1) mediada pela mitocôndria e 2) mediada pelos receptores de morte. Como representantes do primeiro grupo de indutores, foram usados: a) cisplatina 20 μ M (Sigma), droga anticancerígena, induz apoptose p53 dependente através de danos no DNA; b) ATP3 μ M (Sigma), adenosina trifosfato, induz apoptose e necrose secundária através da ligação com receptores purinérgicos P2Z/P2X7. Como representantes do segundo grupo, foram usados anticorpos agonistas anti-Fas 20 μ L/mL (clone Jo2, Pharmingen.), que se ligam aos receptores de morte Fas/CD95.

Após 5 ou 18 horas de incubação, os macrófagos foram examinados para avaliar o tipo de morte celular, por análise da morfologia celular por microscopia de fluorescência, como descrito anteriormente no item 3.7.1, ou através da análise da ativação da caspase 3.

3.11.1. Análise da ativação da caspase 3

As células Raw 264.7, após serem induzidas à apoptose, foram coletadas e centrifugadas durante 5 minutos a 200g. As células do sedimento foram lisadas em 50 μ L de tampão de lise I (50mM HEPES, 5mM EGTA, 2mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM PMSF, 5 μ g/mL leupeptina). As amostras foram congeladas à -70°C e descongeladas à 4°C 3 vezes. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 200g. Os sobrenadantes foram colocados no gelo e a concentração de proteínas foi medida pelo Método de Bradford [1976]. Uma quantidade de 100 μ g de proteína foi misturada com 5 μ g de substrato para caspase [substrato fluorogênico II para caspase 3 (Calbiochem) e o volume foi completado até 100 μ L com tampão II (100mM HEPES, 10% sacarose, 0,1% CHAPS, 1mM DTT). As amostras foram incubadas por 45 minutos a 37°C e, em seguida, lidas no Fluorímetro (Fluorescence Spectrophotometer F-4500 HITACHI). A especificidade da reação foi testada através da inibição da atividade da caspase 3, na presença do inibidor específico para esta caspase: Z-DEVD-FMK (Stratagene).

3.12. Investigação dos mecanismos de regulação da apoptose por *M. bovis* BCG

3.12.1. Inibição da ativação de NF- κ B

Foi avaliada a importância da ativação do complexo NF- κ B por BCG para o efeito anti-apoptótico observado nas células infectadas. A ativação do NF- κ B nas células infectadas foi confirmada, através da análise da translocação ao núcleo do complexo ativado, por Western blotting da fração nuclear e citoplasmática usando anticorpos policlonais de coelho (1:1000) anti-p65 (doação do Dr. Nancy Rice, Frederick Cancer Institute, USA).

A inibição da ativação de NF- κ B nas células infectadas foi feita pelo tratamento dos macrófagos com o inibidor PDTC (50 μ M) (BioMol) e/ou peptídeo inibitório permeável celular NF- κ B SC50 (18 μ M) (BioMol).

As células Raw 264.7 foram plaqueadas, infectadas com *M. bovis* BCG (MOI = 5:1) e induzidas à apoptose com ATP (3 μ M). A infecção foi realizada na presença ou ausência dos inibidores de NF- κ B. Após 5 horas da indução de apoptose, foi feito o teste MTT das placas e, a leitura da densidade óptica (D.O.).

3.12.2. Inibição das cascatas de MAP quinases

A inibição de ERK, p38, PI-3K e PKA quinases foi feita através do tratamento dos macrófagos pelos inibidores específicos correspondentes para cada via: PD-98059 (ERK) (0,1 μ M) (Calbiochem), SB-203580 (p38) (0,02 μ M) (Calbiochem), LY-294002 (PI-3K) (0,1 μ M) (Calbiochem) e PKA 5-24 (PKA) (0,1 μ M) (Calbiochem).

As células Raw 264.7 foram tratadas com inibidores específicos para as MAP quinases 30 minutos antes de serem infectadas com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), e induzidas à apoptose com ATP (3 μ M) e cisplatina (20 μ M) após 1 e 24 horas da infecção. Após 24 horas de indução de apoptose, as células foram coletadas, tratadas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas por microscopia de fluorescência, para avaliação da morfologia celular.

3.12.3. Cinética da expressão de ERK, p38, JNK e Akt nos macrófagos infectados

Os macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 foram plaqueados em garrafas de plástico 75 cm² e tratados com lisado de *Mycobacterium bovis* BCG ou de *M. tuberculosis*. Após 15, 30, 45 e 60 minutos, amostras foram coletadas para análise por Western Blotting da expressão das formas nativas e fosforiladas de: ERK, p38, JNK e Akt.

3.13. Western Blotting

3.13.1. Obtenção dos extratos celulares totais

Os extratos celulares foram obtidos através da ressuspensão dos sedimentos de 2×10^6 células em 100µL de tampão de lise *low ripa* (20mM tris HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% triton X-100, 1mM PMSF, 1mM ortovanadato de sódio). As amostras foram agitadas, congeladas e descongeladas por três vezes, e centrifugadas a 3500g por 5 minutos. A concentração das proteínas foi determinada pelo Método de Bradford (1976). As proteínas foram precipitadas com acetona (3 vezes o volume da amostra), à -20°C por 90 minutos, desnaturadas em tampão de amostra 4x (60 mM tris pH 6,8, 2% SDS, 5% 2-β- mercaptoetanol, 10% glicerol, 0,025% azul de bromofenol), levadas ao banho-maria à 100°C por 5 minutos e centrifugadas por 5 minutos a 3500g. Quantidades iguais de proteína celular de diferentes amostras foram usadas para a eletroforese de proteínas em SDS-PAGE.

3.13.2. Obtenção do extrato nuclear e citoplasmático das células

A suspensão de 10mL contendo 5×10^6 células/mL foi centrifugada a 2500g por 5 minutos à 4°C e ressuspensas em PBS. Após 3 lavagens seguidas com PBS, as células foram ressuspensas em 400µL de tampão de lise da membrana citoplasmática (10mM HEPES; 10mM KCl, 0,1mM EDTA; 0,1mM EGTA; 1mM DTT, 0,5mM PMSF), e incubadas em banho de gelo por 20 minutos. A seguir, adicionou-se a solução detergente Nonidet P-40 até a concentração final de 0,6% e por 10 segundos as amostras foram agitadas e centrifugadas a 2500g por 30 segundos. O

sobrenadante foi retirado e foi dosada a concentração de proteínas citoplasmáticas pelo Método de Bradford [1976]. As quantidades de proteína citoplasmática foram ajustadas a 60µg/amostra, adicionou-se 5 partes de acetona e as amostras foram incubadas à -20°C overnight. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6000g por 10 minutos, a acetona foi retirada e seca à temperatura ambiente. O sedimento foi usado para obtenção da fração nuclear.

Ao sedimento, obtido no final do método acima descrito, foram adicionados 50µl de tampão de lise da membrana nuclear (20mM HEPES; 0,4M NaCl; 1mM EDTA, 1mM EGTA; 1mM DTT; 1mM PMSF), e as amostras foram submetidas à agitação por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 6000g por 10 minutos e as concentrações das proteínas dos sobrenadantes foram determinadas pelo Método de Bradford. As quantidades protéicas foram ajustadas a 50µg/amostra. Em seguida, foram adicionadas 5 partes de acetona e as amostras incubadas à -20°C overnight. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 6000g por 10 minutos, foi retirada a acetona e as amostras foram secas a temperatura ambiente.

3.13.3. Imunoprecipitação

Os macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 foram plaqueados em garrafas de plástico de 75 cm², infectados com *Mycobacterium bovis* BCG na proporção MOI 5:1. Após 15 ou 30 minutos, as células foram retiradas das garrafas, centrifugadas e lavadas com PBS, e ao sedimento foi adicionado o tampão de lise. Após 2 horas de incubação no gelo, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 2500rpm à 4°C. 600µg da proteína obtida foram tratadas com anticorpos anti-TLR2 (Sigma) ou anti-PI3K (p85) (Sigma) em agitação à 4°C durante 1 hora. Para ocorrer a imunoprecipitação dos complexos, foi usada agarose/proteína A. Os imunoprecipitados foram analisados por Western Blotting usando os mesmos anticorpos.

3.13.4. SDS-PAGE

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada, segundo a metodologia de Laemmli (1970), em gel descontínuo constituído de: gel separador (10%

acrilamida, 0,2% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,375M tris pH 8,8), gel de empilhamento (5% acrilamida, 0,5% bisacrilamida, 0,1% SDS e 0,125M tris pH 6,8) e tampão de corrida (25mM tris, 192mM glicina e 0,1% SDS pH 8,3).

As corridas eletroforéticas foram realizadas no sistema de mini-gel (Mini-Protean II - BioRad Laboratories), utilizando-se tampão de corrida sob 60V constante no gel de empilhamento e 160V constante no gel separador. A massa molecular foi determinada por comparação com padrões de massas moleculares conhecidas (Molecular Weight Marker Kit – SIGMA).

3.13.5. Immunoblotting

Após a corrida eletroforética, as proteínas foram transferidas para matriz de nitrocelulose com poros de 0,45 μm , utilizando equipamento de transferência BioRad.

Após a transferência das proteínas para membranas, estas foram incubadas com solução bloqueadora (5% de leite desnatado em PBS/tween 0,05%) durante 18 horas a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos adequados. As membranas foram lavadas com PBS contendo tween 20 a 0,05% (PBS/tween) por 3 vezes durante 10 minutos. Ao término da lavagem, foram removidos o PBS/tween e acrescentados os anticorpos secundários de cabra anti-IgG de camundongo conjugados com peroxidase (1:1000) (Southern Biotechnology Associates, Inc.) por 45 minutos. Novamente, as membranas foram lavadas com PBS/tween, nas mesmas condições citadas anteriormente.

A revelação do complexo foi feita pelo tratamento das membranas com o coquetel quimioluminescente (ECL, Amersham) por 1 minuto e logo após, expostas ao filme Hyperfilm (Amersham). O filme foi revelado com solução reveladora Polimax T (Kodak), lavado com água e fixado em solução fixadora Polimax T (Kodak). Posteriormente, as mesmas membranas foram reveladas com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina) (100 μL tris HCl 2M pH 7,5, 4,9 mL H₂O, 5mg DAB, 0,3mL imidazol 0,1M, 5 μL H₂O₂ em 5mL de água destilada).

3.14. Análise dos filamentos de actina dos macrófagos através de marcação com Faloidina

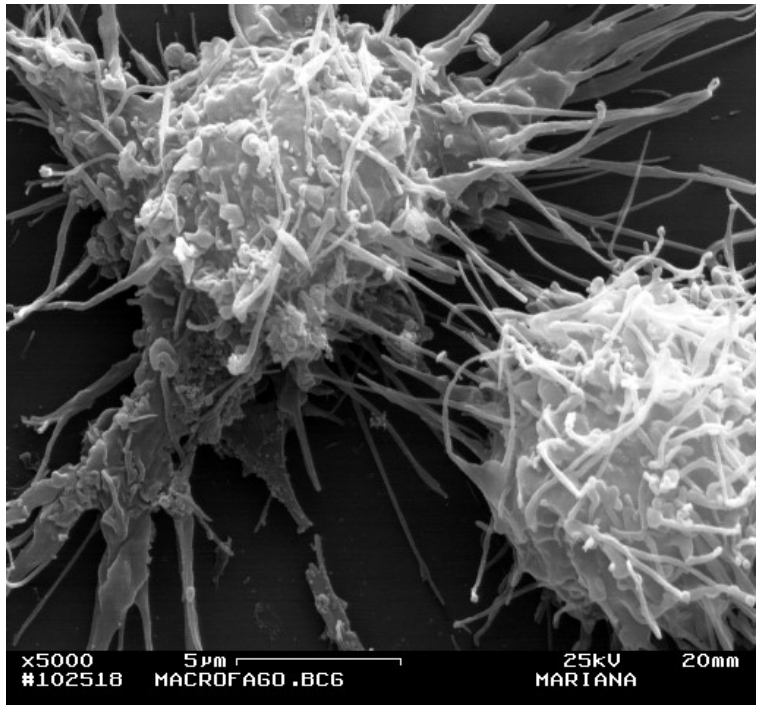
Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram plaqueados, na concentração de 2×10^5 células/mL, em lamínulas redondas em placas de 24 poços, e incubadas por 18 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 18 horas, as amostras foram infectadas com *M. bovis* BCG (MOI 10:1) por diferentes períodos de tempo. As amostras foram lavadas com PBS por duas vezes. Em seguida, foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 10 minutos em temperatura ambiente e lavadas com PBS duas vezes. As amostras foram permeabilizadas com Triton X-100 0,5% por 4 minutos, lavadas com PBS duas vezes, tratadas com cloreto de amônio 0,1%, novamente lavadas com PBS duas vezes e tratadas com TRITC-Faloidina. As amostras foram analisadas utilizando Microscopia de Fluorescência.

3.15. Análise da morfologia dos macrófagos através de Microscopia Eletrônica de Varredura

Os macrófagos da linhagem Raw 264.7 foram plaqueados, na concentração de 2×10^5 células/mL, em lamínulas redondas em placas de 24 poços, e incubados por 18 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Após 18 horas, foram tratados com inibidores de quinases [PD-98059 (ERK) (0,1μM), SB-203580 (p38) (0,02μM), LY-294002 (PI-3K) (0,1μM) e IC (PI-3K) (0,1μM)] por 60 minutos e infectados com *M. bovis* BCG (MOI 10:1) por 3 horas. As amostras foram lavadas com PBS por duas vezes. Em seguida, fixadas com paraformaldeído 2% e glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1%. Após 10 minutos, foram lavadas com PBS por duas vezes e pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2% em tampão fosfato 0,1% por 3 minutos. Novamente lavadas com PBS duas vezes. As amostras foram então desidratadas com etanol 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por 5 minutos em cada concentração. Foi feito o ponto crítico e as amostras foram metalizadas com ouro. As amostras foram observadas em 25kV no Microscópio Eletrônico de Varredura Zeiss DSM-940A.

3.16. Análise estatística dos resultados

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad INSTAT (Graphpad Software V2.05 a 9504225, USA). Os dados foram expressos com duas variáveis utilizando o Teste T (Student-Newman-Keuls).



RESULTADOS

4. Resultados

Para estudar os mecanismos de modulação da morte celular programada e da ativação funcional dos macrófagos por micobactérias virulentas e avirulentas, utilizamos como modelo: macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7, monócitos humanos da linhagem THP-1, diferenciados em macrófagos com PMA, e macrófagos M1 derivados de células de medula óssea de camundongos C57BL selvagens e C57BL *knockout* para TLR-2 infectados com as micobactérias *Mycobacterium bovis* BCG, cepas 27 opaca e translúcida e 104 opaca e translúcida de *M. avium*, cepas H37Ra e H37Rv de *M. tuberculosis* e com lisado de *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*.

Buscou-se, com o uso de 7 cepas diferentes de micobactérias, avaliar se diferentes graus de virulência influenciariam no tipo de resposta de macrófagos. As micobactérias da vacina BCG são *M. bovis* atenuadas, e por isso consideradas avirulentas. Dentre as 4 cepas de *M. avium*, foi demonstrado na literatura haver um grau de virulência entre elas, sendo as mais opacas mais virulentas que as translúcidas e a cepa 104 mais virulenta que a 27. Sendo assim, seria esperado que houvesse um grau decrescente nas cepas: 104 translúcida (104TI) – 104 opaca (104Op) - 27 translúcida (27TI) – 27 opaca (27op). Com relação às cepas utilizadas de *M. tuberculosis*, já é conhecido que a cepa H37Ra é avirulenta e a H37Rv virulenta.

4.1. Avaliação da fagocitose das micobactérias pelos macrófagos

Os macrófagos foram infectados com diferentes MOIs de acordo com o experimento nas razões que variaram entre 1:1 e 50:1. Como exemplo das infecções, a Figura 26a mostra macrófagos da linhagem Raw 264.7, infectados com *M. bovis* BCG, corados com a técnica de Ziehl-Nielsen. Pode-se observar a presença de bacilos no citoplasma dos macrófagos.

A porcentagem de fagocitose das micobactérias pelos macrófagos foi calculada e, no caso da infecção de células Raw 264.7 com *M. bovis* BCG, a MOI de 1 micobactéria para cada macrófago levou a cerca de 5% de células na cultura com internalização de micobactérias (Figura 26b). Para as MOIs de 5:1, 10:1 e 50:1, a porcentagem foi de cerca de 10, 25 e 50%, respectivamente.

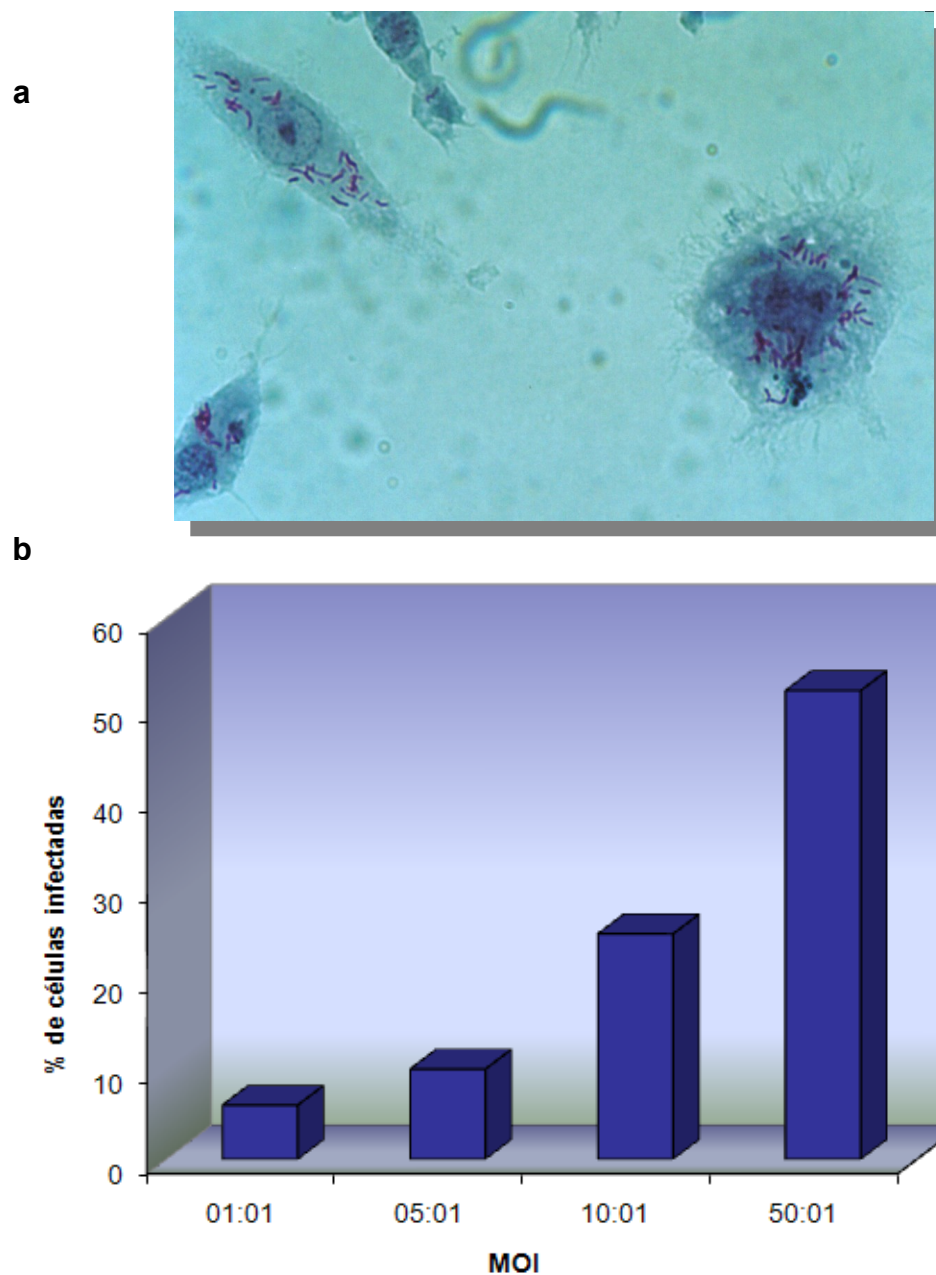


Figura 26 – Avaliação da porcentagem de macrófagos infectados com *Mycobacterium* BCG pelo método de Ziehl-Nielsen

As culturas dos macrófagos Raw 264.7, em lamínulas, foram infectadas com as micobactérias da vacina onco-BCG nas razões (MOI) 1:1, 5:1 e 10:1 bactérias vivas/macrófagos e, após 3 horas de incubação à 37°C, as bactérias extracelulares foram removidas por lavagem com PBS e as lamínulas foram coradas com a técnica de Ziehl-Nielsen e analisadas por microscopia óptica (Axioplan – Zeiss) com a técnica de campo claro e aumento de 800x. As células infectadas e não-infectadas foram contadas e foi feito o cálculo da porcentagem de células infectadas em relação ao total.

a. Foto ilustrativa da técnica de Ziehl-Nielsen

b. Porcentagem de macrófagos que internalizaram micobactérias

4.2. Avaliação da cinética de viabilidade e o tipo de morte celular dos macrófagos infectados com:

4.2.1. *Mycobacterium bovis* BCG

No caso da infecção dos macrófagos com *M. bovis* BCG, pode-se observar que na fase inicial da infecção, até o 3º dia pós-infecção, a viabilidade dos macrófagos é mantida. Após o 4º dia de infecção, foi observada perda na viabilidade dos macrófagos, de maneira dose-dependente e com expressiva maioria de apoptose.

A Figura 27a mostra que as MOIs 1:1 e 5:1 quase não alteram a viabilidade celular até o 5º dia comparando-se às células controle. Uma diferença significativa ocorre no 6º dia pós-infecção, quando mesmo as células controle perdem 30% de sua viabilidade devido ao declínio da cultura celular. De modo diferente, ocorre com a proporção de 10 micobactérias para cada macrófago, onde já no 4º dia há uma acentuada morte celular por apoptose, representando cerca de 40%. A perda de viabilidade é quase total no 6º dia.

A morte celular por necrose foi observada em uma pequena porcentagem de células nas culturas infectadas por *M. bovis* BCG nessas condições (Figura 27b).

4.2.2. *Mycobacterium avium*

Os macrófagos infectados com as quatro cepas de *M. avium* apresentaram perda de viabilidade acentuada já nos primeiros dias pós-infecção, 20% de células mortas no dia 1 e cerca de 60% de células mortas no dia 3 após a infecção (Figura 28). Diferente do esperado, não houve variação na resposta dos macrófagos infectados pelas quatro cepas de *M. avium*. Todas as cepas provocaram perda de viabilidade, com variação insignificante entre as proporções 10:1 e 30:1.

Portanto, não conseguimos correlacionar os diferentes graus de virulência das cepas 27 e 104 translúcidas e opacas com a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem Raw 264.7, o que nos levou a não prosseguir com este modelo de infecção.

4.2.3. *Mycobacterium tuberculosis*

A infecção dos macrófagos com as cepas H37Rv e H37Ra induziu perda acentuada na viabilidade celular, observada nos dias 3 e 4 pós-infecção (Figura 29). A proporção de 50 micobactérias para 1 macrófago provocou mais morte celular que 10 micobactérias por macrófago, mostrando a tendência dose-dependente, tanto nas culturas infectadas com H37Rv como H37Ra. Pode-se observar também que a cepa avirulenta H37Ra induziu mais morte nas culturas dos macrófagos (75% de células mortas no 3º dia de infecção, MOI 10:1) que a cepa virulenta H37Rv (60% de células mortas no 3º dia de infecção, MOI 10:1).

Para investigar o tipo de morte induzida pelas micobactérias, as células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e a porcentagem de células apoptóticas e necróticas foram quantificadas utilizando microscopia de fluorescência. Pode-se ver que a *M. tuberculosis* H37Ra (MOI 10:1) induziu predominantemente apoptose nos macrófagos (30% de células apoptóticas versus 10% de células necróticas no dia 3 pós-infecção), enquanto que a dose maior de infecção induziu claramente mais necrose na cultura celular (12% de células apoptóticas versus 50% de células necróticas no dia 3 pós-infecção) (Figura 30).

A cepa virulenta H37Rv induziu mais necrose (70% de células necróticas no dia 3 pós-infecção) que a cepa avirulenta H37Ra. De maneira inversa, a cepa avirulenta H37Ra induziu mais apoptose nos macrófagos (30% de células apoptóticas no dia 3 pós-infecção) que a cepa virulenta H37Rv (10% de células apoptóticas no dia 3 pós-infecção).

Estes dados demonstram que a morte exagerada dos macrófagos observada na infecção pelas micobactérias virulentas (*M. tuberculosis* H37Rv) está associada com a indução da necrose. As bactérias avirulentas (*M. tuberculosis* H37Ra) ou atenuadas (*M. bovis* BCG) induzem mais apoptose nas culturas infectadas. O aumento da dose das micobactérias avirulentas na infecção leva a inversão do tipo de morte celular de apoptose para necrose.

A extensa necrose induzida pelas micobactérias *M. tuberculosis* virulentas H37Rv pode ser explicada pelo crescimento mais rápido destas bactérias comparado com as micobactérias atenuadas *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* H37Ra, como mostra a Tabela 1.

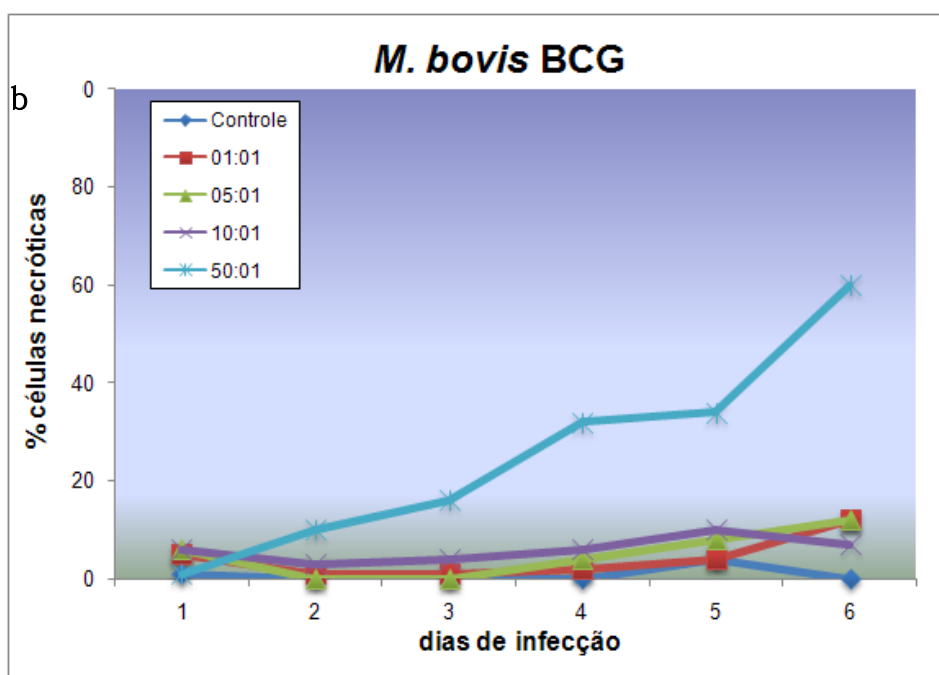
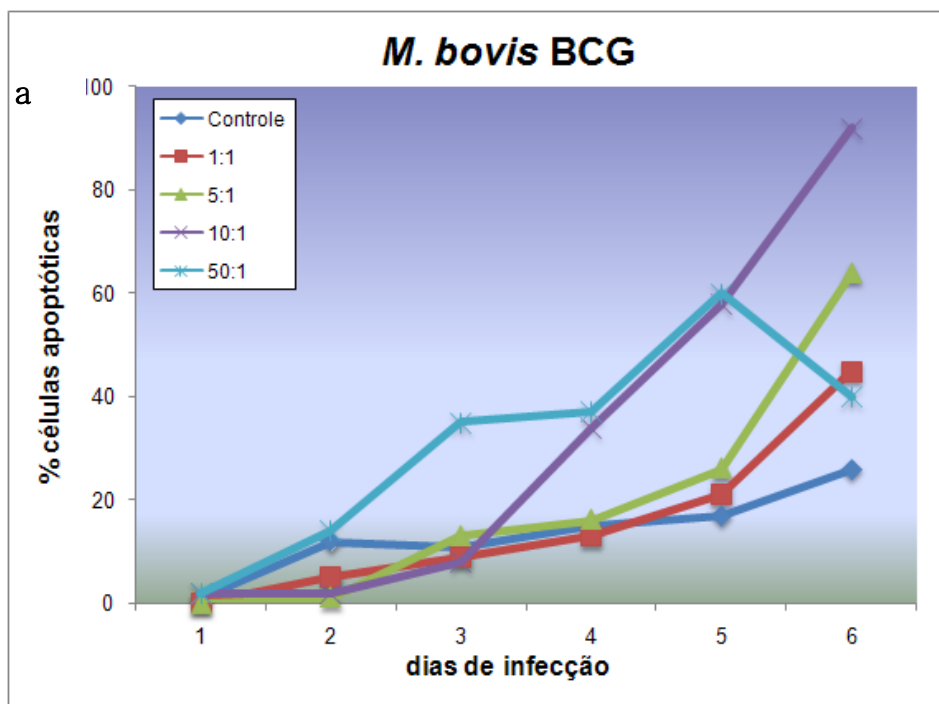


Figura 27 – Análise do tipo de morte celular dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e infectadas com *M. bovis* BCG, nas razões MOI 1:1, 5:1 e 10:1 e após 1, 2, 3, 4, 5, 6 dias da infecção, as amostras foram coletadas para avaliar a viabilidade dos macrófagos. A análise da morfologia das células, coradas com laranja de acridina e brometo de etídio, foi feita com o uso de microscopia de fluorescência.

a. Células apoptóticas

b. Células necróticas

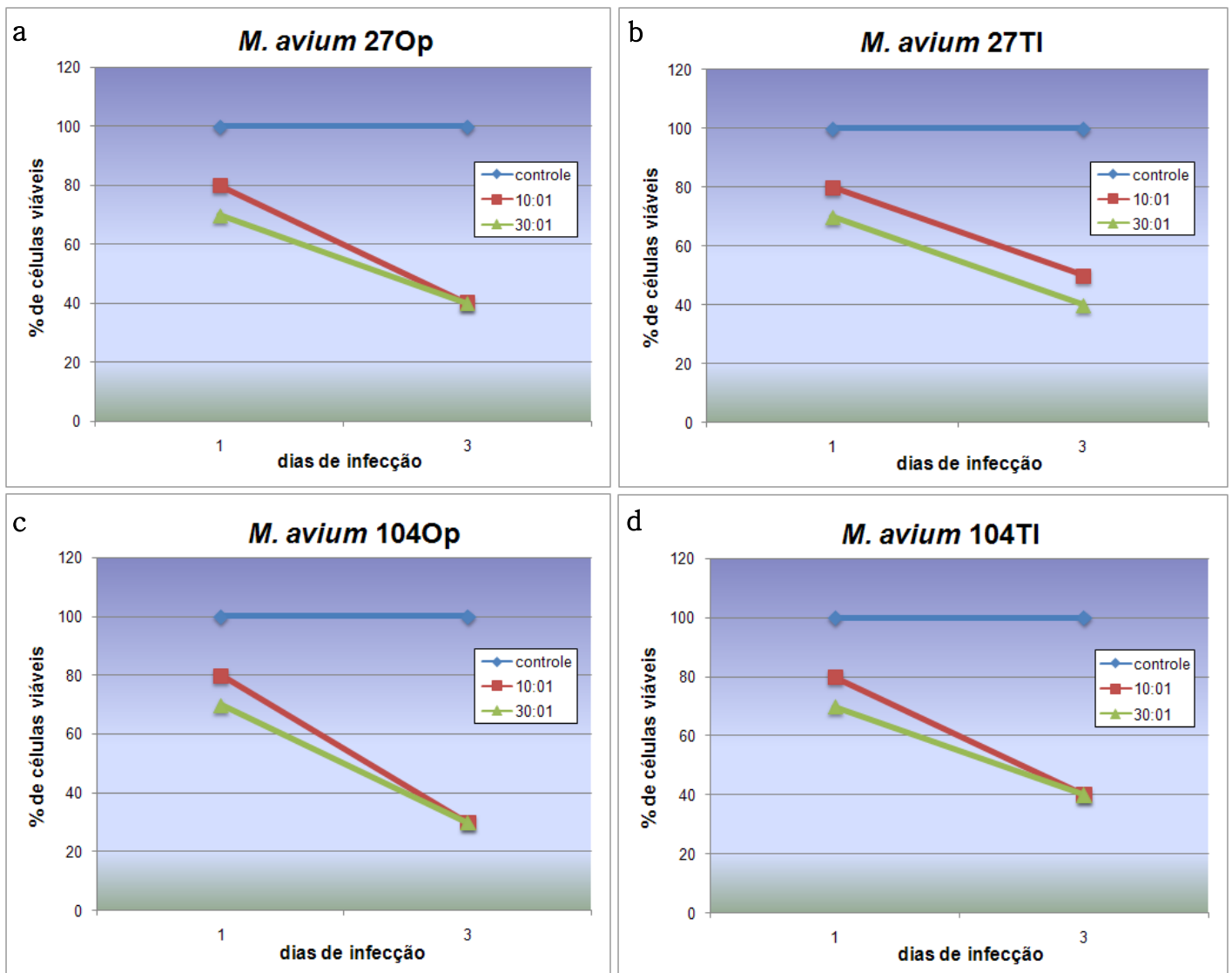


Figura 28 - Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com *M. avium*

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e infectadas com *M. avium*, cepas 27 opaca e translúcida (a, b) e 104 opaca e translúcida (c, d), nas razões MOI 10:1 e 30:1 e após 24 e 72 horas de infecção, as amostras foram coletadas para avaliar a viabilidade dos macrófagos. A análise da viabilidade celular foi feita através da adição do corante vital Azul de Trypan 1:1 vol/vol.

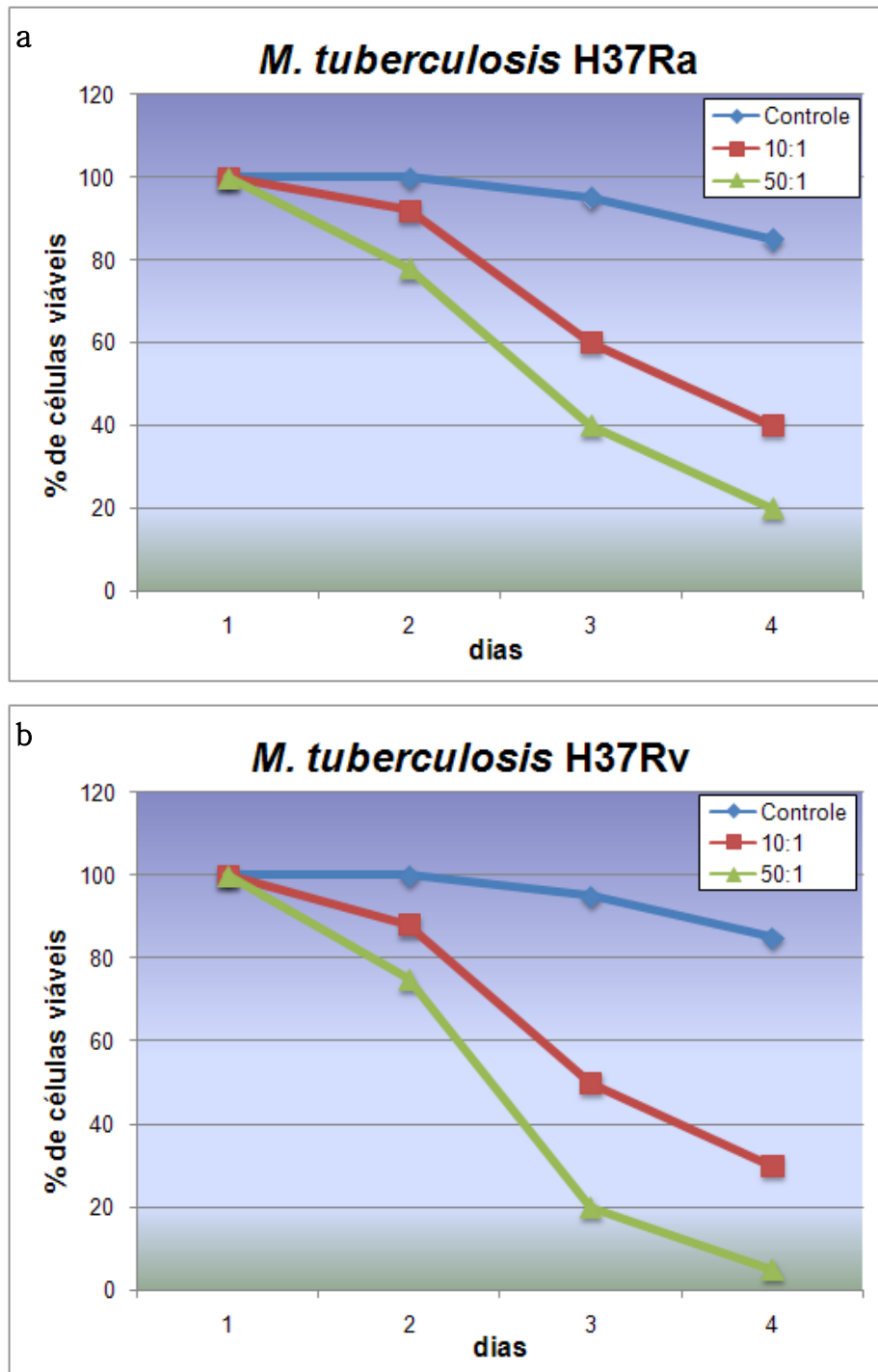


Figura 29 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e infectadas com *M. tuberculosis*, cepas H37Ra (a) e H37Rv (b), nas razões MOI 10:1 e 50:1 e após 1, 2, 3 e 4 dias da infecção, as amostras foram coletadas para avaliar a viabilidade dos macrófagos. A análise da viabilidade celular foi feita através da adição do corante vital Azul de Trypan na proporção 1:1 volume/volume e observadas com microscópio invertido.

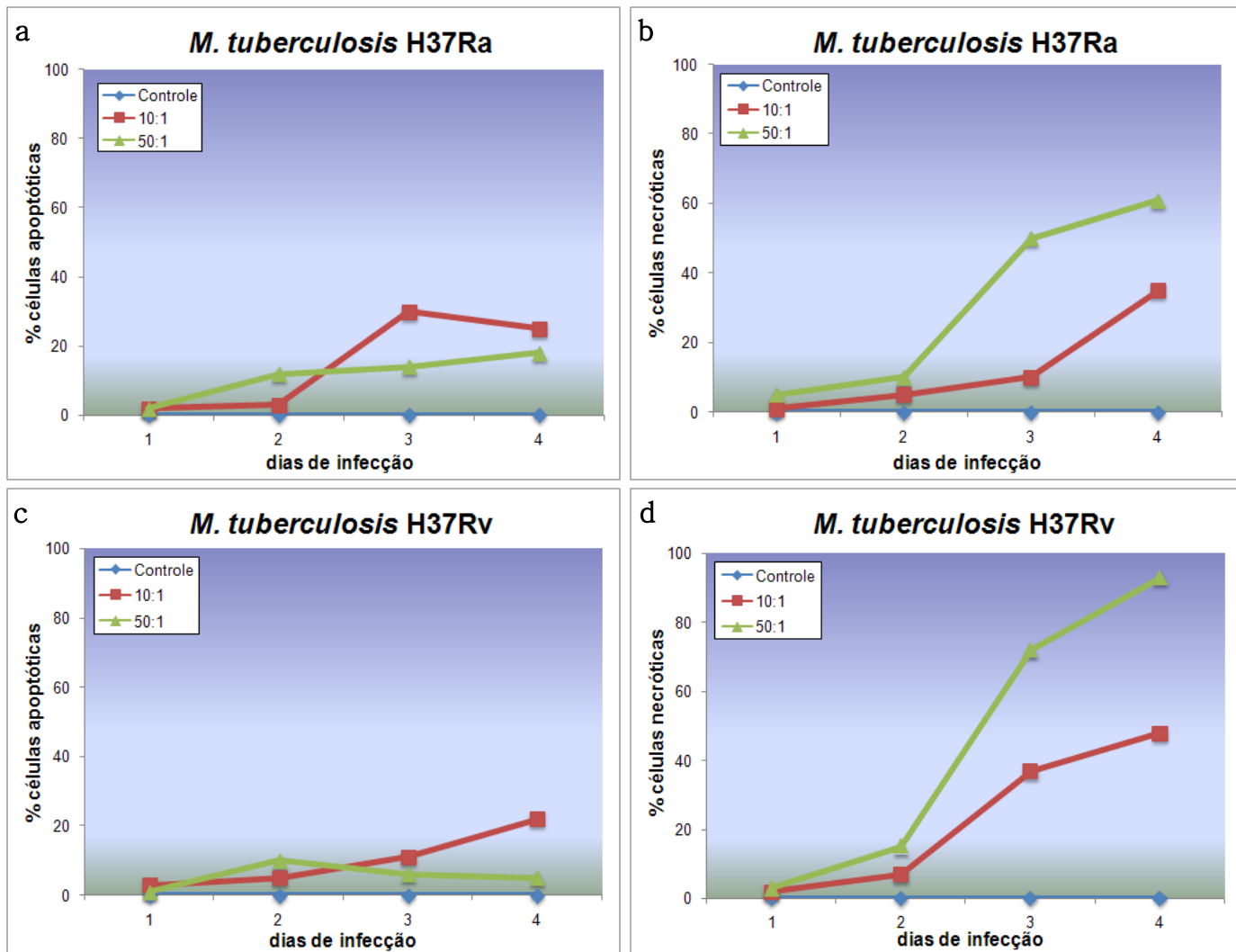


Figura 30 – Análise do tipo de morte dos macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e infectadas com *M.tuberculosis*, cepas H37Ra (a,b) e H37Rv (c,d), nas razões MOI 10:1 e 50:1 e após 1, 2, 3 e 4 dias da infecção, as amostras foram coletadas para avaliar o tipo de morte dos macrófagos. As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio e a análise da morfologia celular foi feita com o uso de microscopia de fluorescência.

Tabela 1 – Curva de crescimento micobacteriano intracelular: comparação entre:

	Dia 0		Dia 6	
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-4}
BCG	12.500	25.000	62.500	-
H37Ra	32.500	75.000	112.500	500.000
H37Rv	55.000	25.000	-	625.000

4.3. Avaliação da produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com:

Sabe-se que a citocina pró-inflamatória TNF- α produzida pelos macrófagos é essencial na resposta imune contra a tuberculose. Dessa maneira, a produção de TNF- α pelos macrófagos infectados pelas micobactérias, assim como a importância dessa produção para a apoptose e/ou necrose dos macrófagos foram investigados.

4.3.1. *Mycobacterium bovis* BCG

Os macrófagos infectados com *M. bovis* BCG apresentaram níveis bem altos de produção de TNF- α já após 3 horas da infecção (Figura 31), alcançando mais de 3000 pg/ml na MOI 10:1. O pico de produção de TNF- α ocorreu após 24 horas da infecção, porém manteve-se alto até pelo menos 48 horas. Deve-se notar que a produção de TNF- α foi induzida de maneira dose-dependente, como mostra a Figura 31.

4.3.2. *Mycobacterium tuberculosis*

A cepa avirulenta H37Ra induziu cerca de 3 vezes mais produção de TNF- α pelos macrófagos em comparação com a cepa virulenta H37Rv. Nota-se o dobro da produção de TNF- α pelos macrófagos quando a MOI é de 50:1, apresentando indução da produção de maneira dose-dependente (Figura 32).

Comparando-se os níveis de produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (Figura 31), observou-se que os macrófagos infectados tanto com cepa virulenta de *M. tuberculosis*, H37Rv, como a avirulenta, H37Ra, apresentaram níveis de produção de TNF- α marcadamente mais baixos (Figura 32). Os macrófagos infectados pela cepa H37Ra produziram cerca de 3 vezes menos TNF- α , e pela cepa H37Rv, cerca de 5 vezes menos do que as células infectadas com *M. bovis* BCG.

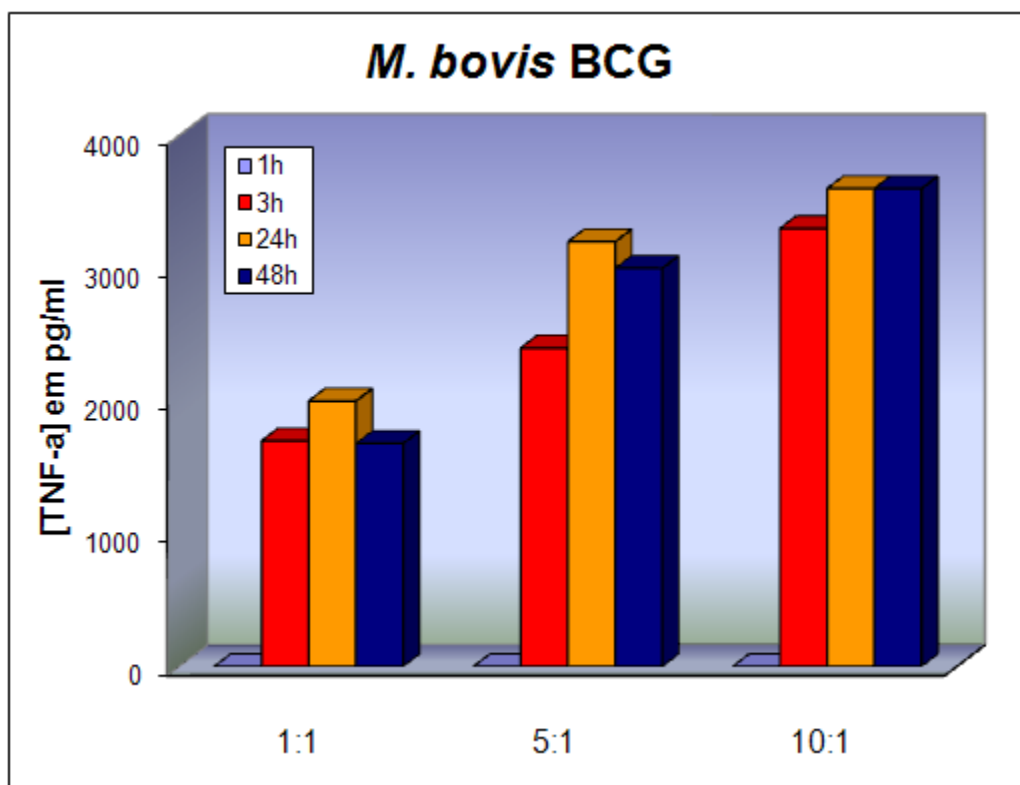


Figura 31 – Produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e após 18 horas foram infectadas com *M. bovis* BCG, MOI = 1:1, 5:1 e 10:1. A dosagem de TNF- α (por Bioensaio com células L929) foi feita nos sobrenadantes coletados 1, 3, 24 e 48h após a infecção.

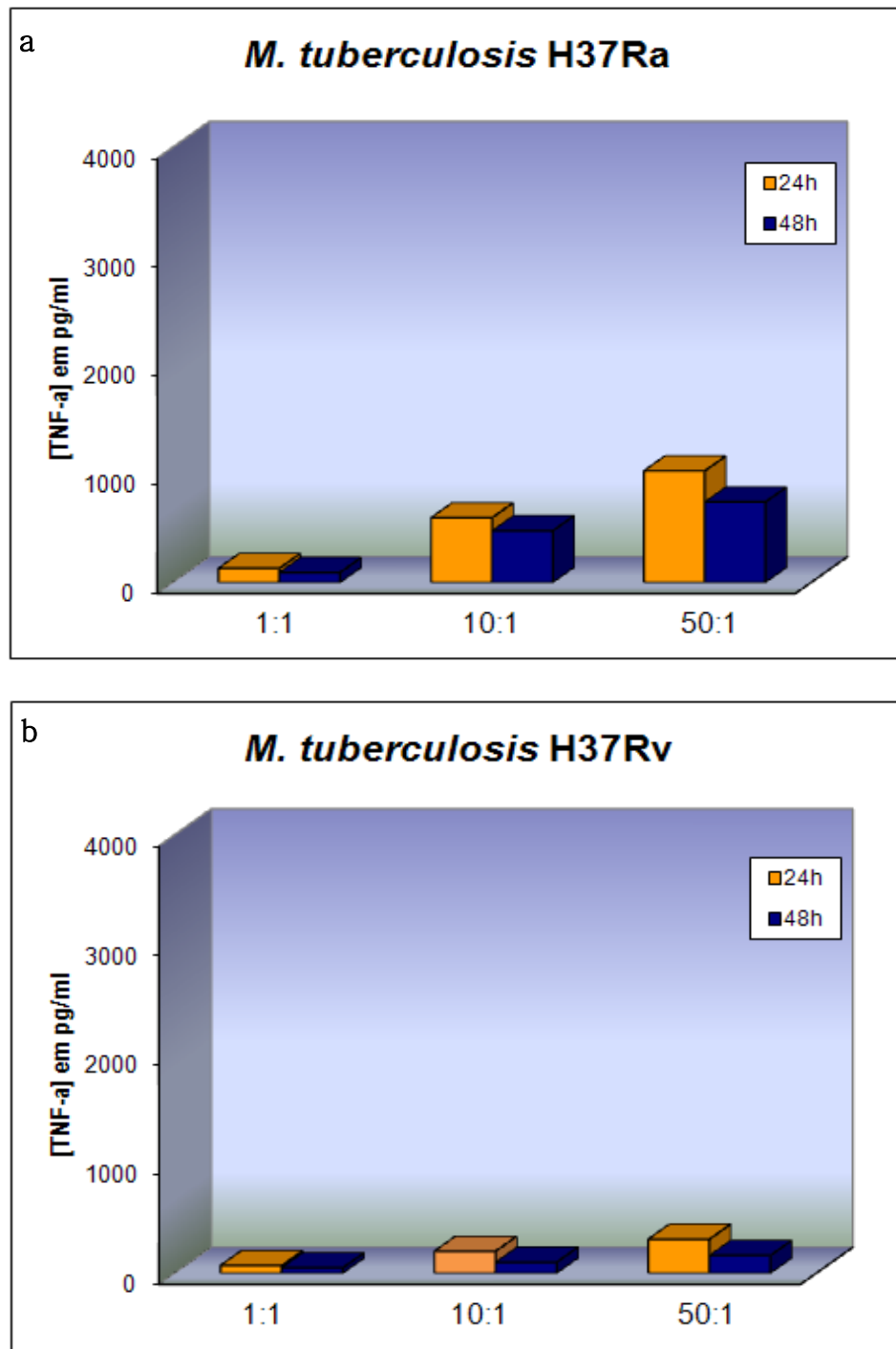


Figura 32 – Produção de TNF- α pelos macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

As células Raw 264.7 foram plaqueadas e após 18 horas foram infectadas com *M. tuberculosis* cepas H37Ra (a) e H37Rv (b), MOI = 1:1, 10:1 e 50:1. A dosagem de TNF- α (por Bioensaio com células L929) foi feita nos sobrenadantes coletados 24 e 48h após a infecção.

4.4. Papel do TNF- α na indução de morte nos macrófagos infectados

Para entender o papel de TNF- α produzido pelos macrófagos infectados com micobactérias na indução da apoptose e/ou necrose, utilizamos anticorpos anti-TNF- α para neutralizar seu efeito como potencial causador da morte celular.

Para aumentar a susceptibilidade dos macrófagos ao TNF- α , as células foram tratadas com actinomicina D, um inibidor de transcrição. O tratamento com actinomicina D é conhecido por aumentar a susceptibilidade das células à indução de apoptose por TNF- α , inibindo a transcrição dos genes, incluindo os genes anti-apoptóticos. A porcentagem de apoptose aumentou de maneira tempo-dependente nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), o que permite sugerir a ação citotóxica do TNF- α autócrino (Figura 33).

Quando foram adicionados anticorpos anti-TNF- α , houve uma considerável diminuição da citotoxicidade, o que leva à conclusão de que o TNF- α produzido pelos macrófagos é um fator de indução de apoptose maneira autócrina nestas células de. Entretanto, os macrófagos Raw 264.7 são resistentes à ação do TNF- α autócrino produzido durante a infecção com *M. bovis* BCG, pelo menos durante 72 horas de infecção, indicando que as micobactérias protegem os macrófagos contra a apoptose na fase inicial da infecção.

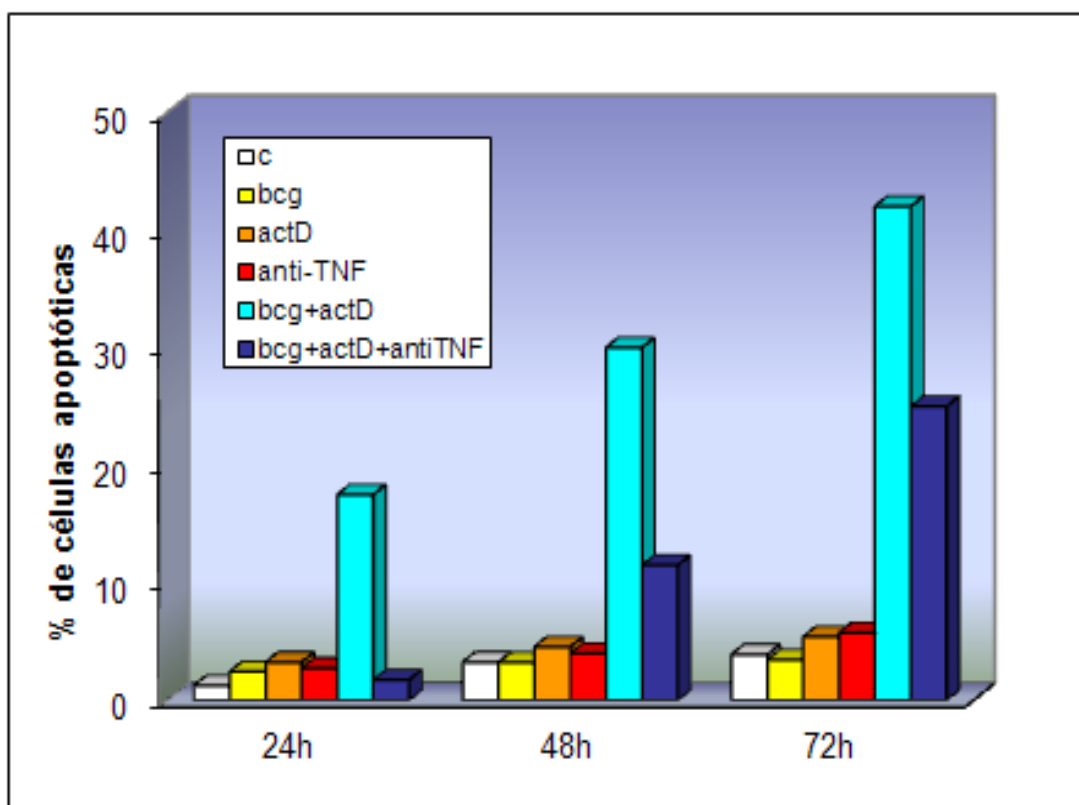


Figura 33 – Susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à ação citotóxica do TNF- α autócrino

Os macrófagos Raw 264.7 foram plaqueados e infectados com BCG, na relação bactéria:célula = 5:1, e cultivados durante 72 horas na presença ou ausência de actinomicina D (actD, 1 μ g/ml) e/ou anticorpos anti-TNF- α murino (20 μ g/ml). A análise da morfologia das células, coradas com laranja de acridina e brometo de etídio, foi feita com o uso de microscopia de fluorescência.

4.5. Análise da suscetibilidade aos indutores padrão de apoptose das células infectadas com micobactérias

A resistência dos macrófagos à ação pró-apoptótica do TNF- α , observada nas etapas iniciais da infecção, leva à seguinte pergunta: as células infectadas são mais protegidas contra a indução de apoptose por outros indutores? Para verificar esta hipótese, as células infectadas por BCG foram induzidas à apoptose por diferentes indutores de apoptose padrão: ATP, cisplatina e anticorpos anti-Fas.

Os resultados obtidos demonstram que as células infectadas com BCG e induzidas à apoptose por ATP e cisplatina apresentaram duas vezes menos células apoptóticas do que as células controle induzidas à apoptose pelos mesmos indutores, indicando uma proteção das células infectadas contra à apoptose (Figura 34a). As células infectadas com BCG e induzidas à apoptose por anticorpos anti-Fas não apresentaram proteção contra apoptose.

Houve uma inibição da ativação da caspase 3 nas células infectadas com BCG e induzidas à apoptose por cisplatina e ATP, correlacionando-se com a proteção dessas células contra a apoptose. A especificidade da ativação da caspase 3 foi confirmada na presença do inibidor específico ZVAD. Nas células infectadas com BCG e induzidas à apoptose por anticorpos anti-Fas não houve inibição da ativação da caspase 3 (Figura 34b).

Os dados obtidos demonstram a resistência dos macrófagos infectados por *M. bovis* BCG à indução da apoptose, pelo menos por alguns indutores (TNF- α , ATP, cisplatina) o que sugere uma ativação dos mecanismos de regulação negativa da apoptose nas células infectadas com *M. bovis* BCG.

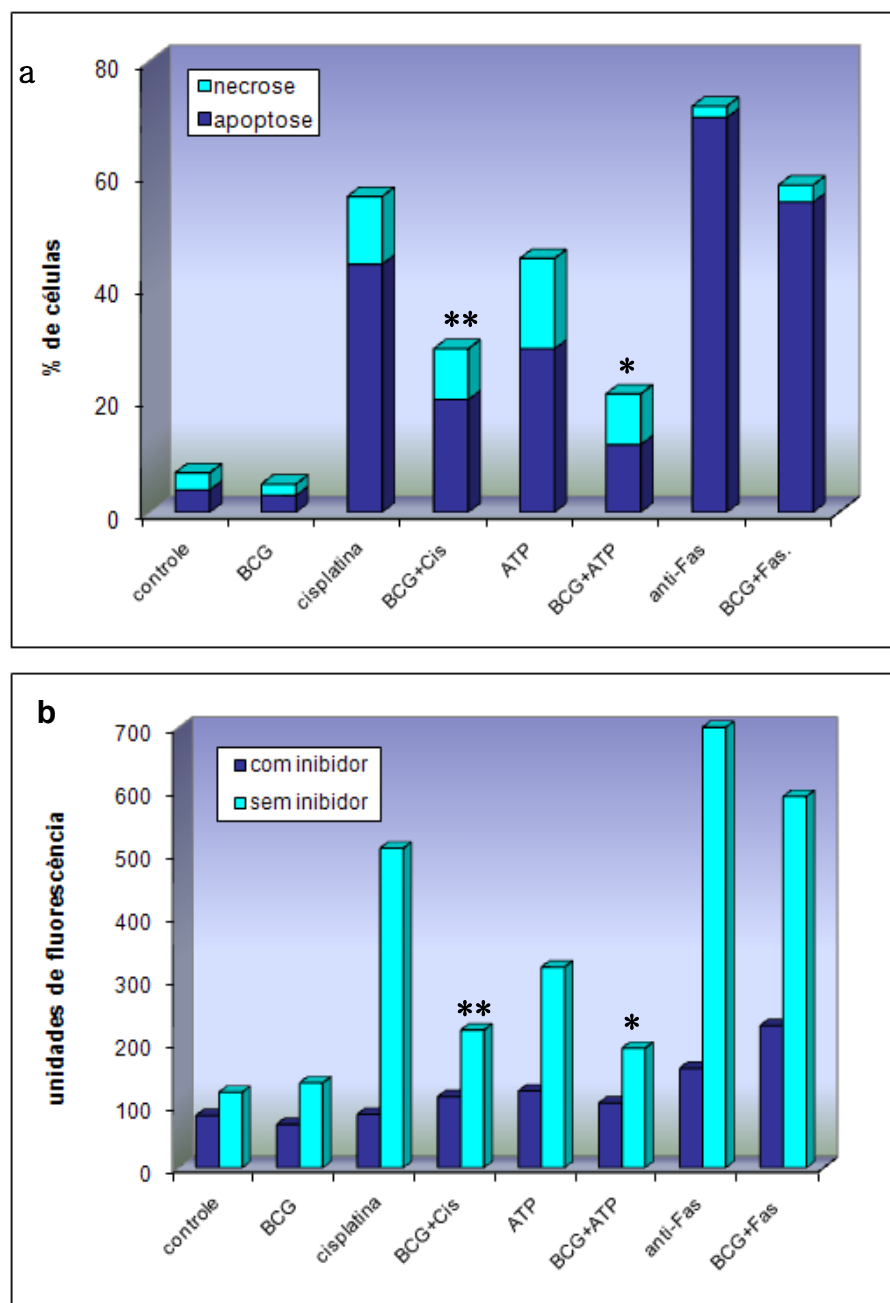


Figura 34 – Susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG aos indutores de apoptose

As células Raw 264.7 foram infectadas por *M. bovis* BCG (B) na razão bactéria/célula = 5/1. Depois de 18h de incubação, as células foram induzidas à apoptose por indutores – cisplatina (C), ATP (A) ou anticorpo anti-Fas (F) - durante 24h, na presença ou ausência do inibidor da caspase 3.

a. Análise por microscopia de fluorescência das células coradas por laranja de acridina e brometo de etídio

b. Detecção da atividade da caspase 3 através do teste fluorogênico

Os valores são referentes à M+DP. Asteriscos indicam $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) (teste Student-Newman-Keuls) em comparação aos valores observados nas células controles ou infectadas que foram induzidas à apoptose por indutores diferentes.

4.6. Estudo dos mecanismos de proteção das células contra a apoptose

4.6.1. Análise da ativação do complexo NF- κ B nos macrófagos infectados por *M. bovis* BCG, lisado de *M. bovis* BCG e de *M. tuberculosis*

As proteínas do complexo do fator nuclear κ B (mais freqüentemente os heterodímeros p65/p50) localizam-se no citoplasma da maioria das células na sua forma inativa, ligadas ao inibidor I κ B. Após receber um sinal apropriado, ocorre a degradação proteossomal promovendo a liberação do complexo p65/p50 e a sua translocação até o núcleo, onde regula a transcrição de genes específicos.

Para analisar se a infecção com *M. bovis* BCG assim como se o estímulo por *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* lisadas estava induzindo a ativação do NF- κ B nos macrófagos, investigamos a translocação do complexo NF- κ B ao núcleo, através do uso de anticorpos anti-p65.

Os macrófagos Raw 264.7 infectados com *M. bovis* BCG apresentaram ativação do complexo NF- κ B, o que foi observado através da translocação da proteína p65/Rel A ao núcleo celular a partir de 1 hora, prolongando-se até pelo menos 48 horas após a infecção (Figura 35).

O lisado de *M. bovis* BCG induziu uma ativação de NF- κ B menos acentuada em relação à induzida pelas *M. bovis* BCG inteiras. A ativação ocorreu já após 1 hora do estímulo, mas teve um declínio em 48 horas (Figura 35).

A ativação de NF- κ B foi mais consistentemente induzida pelo lisado de *M. tuberculosis*, apresentando padrão semelhante ao induzido pelas micobactérias *M. bovis* BCG. A ativação de NF- κ B ocorreu após 1 hora, prolongando-se até pelo menos 48 horas após o estímulo (Figura 35).

4.6.2. Análise do papel de NF- κ B na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à indução da apoptose

Para avaliar a participação do NF- κ B na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à apoptose, utilizamos dois inibidores de NF- κ B, PDTC e NS-50.

Os macrófagos foram infectados na presença dos inibidores de NF- κ B e induzidos à apoptose por ATP, e a viabilidade dos macrófagos foi monitorada pelo teste MTT. Os macrófagos infectados e induzidos à apoptose apresentaram níveis de viabilidade consideravelmente maiores (D.O.= 0.326) do que as células induzidas à apoptose (D.O.= 0.155) (Figura 36). Mas, quando esses macrófagos foram infectados na presença dos inibidores de NF- κ B, PDTC e NS-50, o efeito protetor foi reduzido, demonstrando queda de viabilidade, D.O.= 0.150 e 0.177, respectivamente. Deve-se notar que as concentrações utilizadas dos inibidores de NF- κ B não foram citotóxicas para os macrófagos (Figura 36).

Esses dados indicam a importância da ativação do NF- κ B na proteção dos macrófagos, conferida pelas micobactérias *M. bovis* BCG à apoptose provocada por ATP.

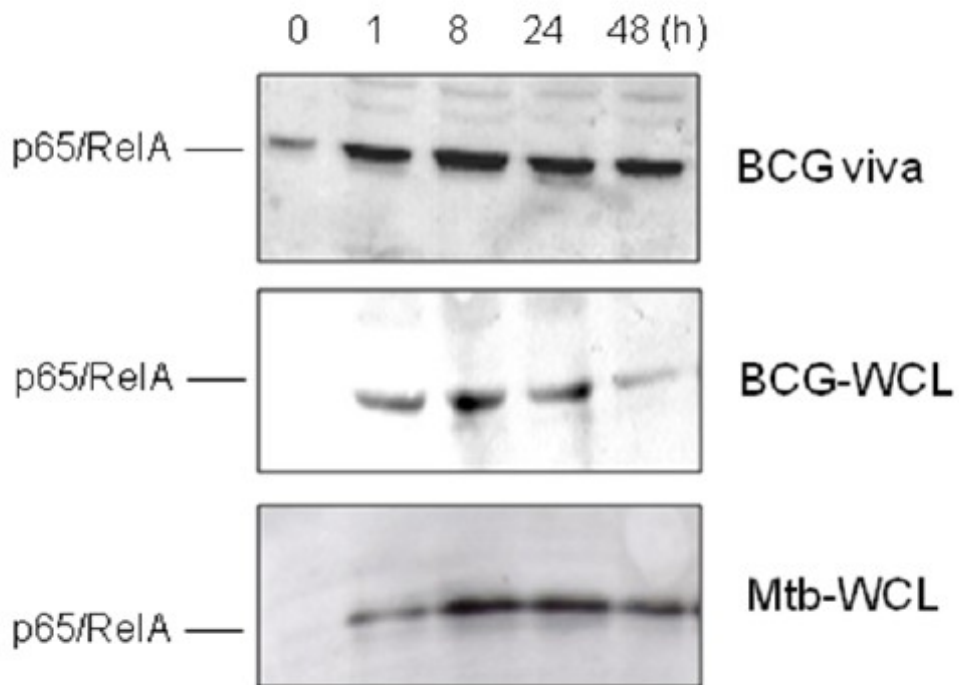


Figura 35 – Análise da ativação do complexo NF- κ B pelas micobactérias, através do monitoramento da translocação da p65 ao núcleo

As células Raw 264.7 foram infectadas pelas micobactérias da vacina BCG (MOI= 5:1), por BCG lisada (1 μ g/ml) ou *M. tuberculosis* lisada (1 μ g/ml). Após 1, 8, 24 e 48h da infecção, as células foram lisadas e os extratos nucleares submetidos à SDS-PAGE (10%) e Western blotting. 50ug dos extratos nucleares foram usados em cada raia. As membranas foram tratadas com o anticorpo anti-p65.

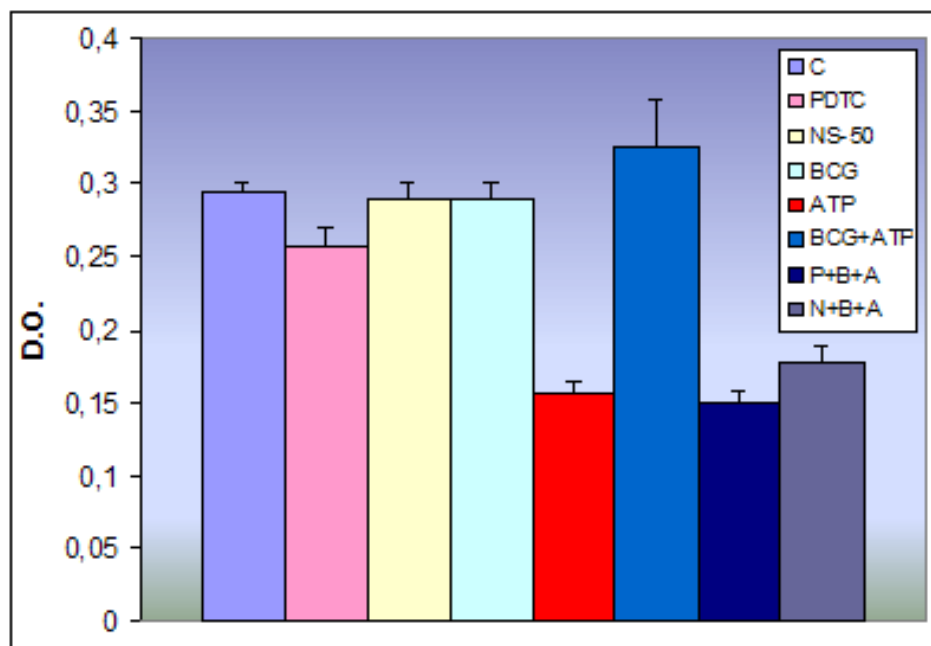


Figura 36 – Análise do papel da ativação de NF- κ B na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG aos indutores de apoptose

As células Raw 264.7 foram plaqueadas, infectadas com *M. bovis* BCG (B) (MOI = 5:1) por 3 horas e induzidas à apoptose com ATP (A). A infecção foi realizada na presença ou ausência dos inibidores de NF- κ B, PDTC (P) ou NS-50 (S). Após 24 horas após a indução de apoptose, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada pelo teste MTT.

4.6.3. Análise da ativação das cascatas de quinases PI3K e MAPK nos macrófagos infectados por *M. bovis* BCG

As vias das MAPK e PI3K também contribuem para a transmissão dos sinais extracelulares que podem resultar direta ou indiretamente na fosforilação de vários fatores de transcrição e alterações na expressão de genes. A fim de avaliar quais vias de sinalização estariam sendo ativadas, as células Raw 264.7 foram infectadas com *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*, e a cinética de ativação das MAPK ERK, p38 e JNK foram avaliadas durante 4 horas após a infecção. Para determinar a ativação da via PI3K por *M. bovis* BCG, foi examinada a fosforilação de Akt, componente “downstream” da via PI3K.

As micobactérias *M. bovis* BCG causaram uma rápida e transitória ativação de ERK1/2, que após 15 minutos de infecção apresenta uma forte ativação, retornando ao nível basal após 4 horas. As ativações de p38, JNK e Akt apresentam padrões semelhantes com uma ativação um pouco mais demorada, porém persistente, pois até 4 horas após a infecção, observa-se ativação das vias (Figura 37).

A ativação de ERK1/2, p38 e JNK foi bem mais atenuada nos macrófagos infectados com *M. tuberculosis*. Porém, a ativação da via PI3K, através da fosforilação de Akt, ocorreu de maneira semelhante à induzida por *M. bovis* BCG (Figura 37).

4.6.4. Análise do papel das quinases na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à apoptose

Os dados apresentados na Figura 37 demonstram que as vias de MAPK e PI3K são ativadas nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG. Será que estas vias, quando ativadas pelas micobactérias, estariam contribuindo para a proteção contra a apoptose observada nos macrófagos infectados?

Para verificar esta hipótese, uma abordagem de inibição das quinases pelos inibidores específicos foi aplicada. Os macrófagos infectados com *M. bovis* BCG, na presença dos inibidores das quinases PI3K (LY-294002) e p38 (SB-203580) apresentaram um aumento na susceptibilidade das células infectadas à indução da apoptose por cisplatina, após 1 hora de infecção (Figura 38). O inibidor de PKA também diminuiu parcialmente esta proteção celular. Os macrófagos infectados com

BCG durante 24 horas foram ainda mais resistentes à cisplatina. A proteção foi diminuída pelo tratamento com os inibidores de p38 e PI3K.

Em relação à apoptose induzida por ATP, foi demonstrado que a via PI3K inibida também provocou a diminuição da viabilidade dos macrófagos após 1 hora de infecção, indicando a perda da proteção celular contra a apoptose conferida pelas micobactérias (Figura 39). O inibidor de PKA também diminuiu um pouco esta proteção.

Esses resultados sugerem que a ativação das cascatas de sinalização de PI3K e p38 MAPK por *M. bovis* BCG contribui para a proteção dos macrófagos contra os indutores de apoptose ATP e cisplatina.

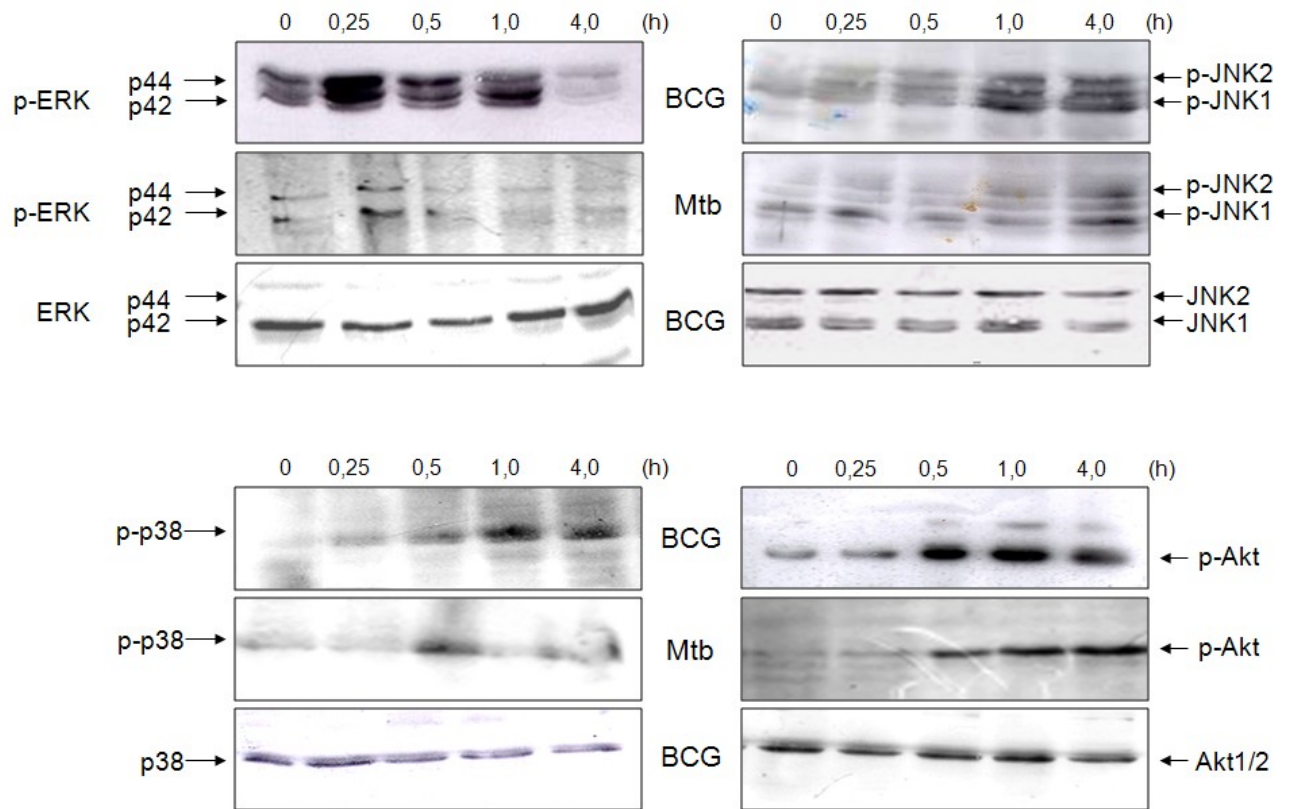


Figura 37 - Ativação das vias MAPK e PI-3K nas células Raw 264.7 tratadas com *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* lisadas

As células foram tratadas com lisado de *M. bovis* BCG (1µg/ml) e *M. tuberculosis* H37Rv (1µg/ml) nos tempos indicados e foram lisadas. Quantidades iguais de proteína dos extratos celulares (100µg/raia) foram usadas para Western blotting. As membranas foram tratadas com anticorpos para as formas fosforiladas e não-fosforiladas de ERK, p38, JNK e Akt.

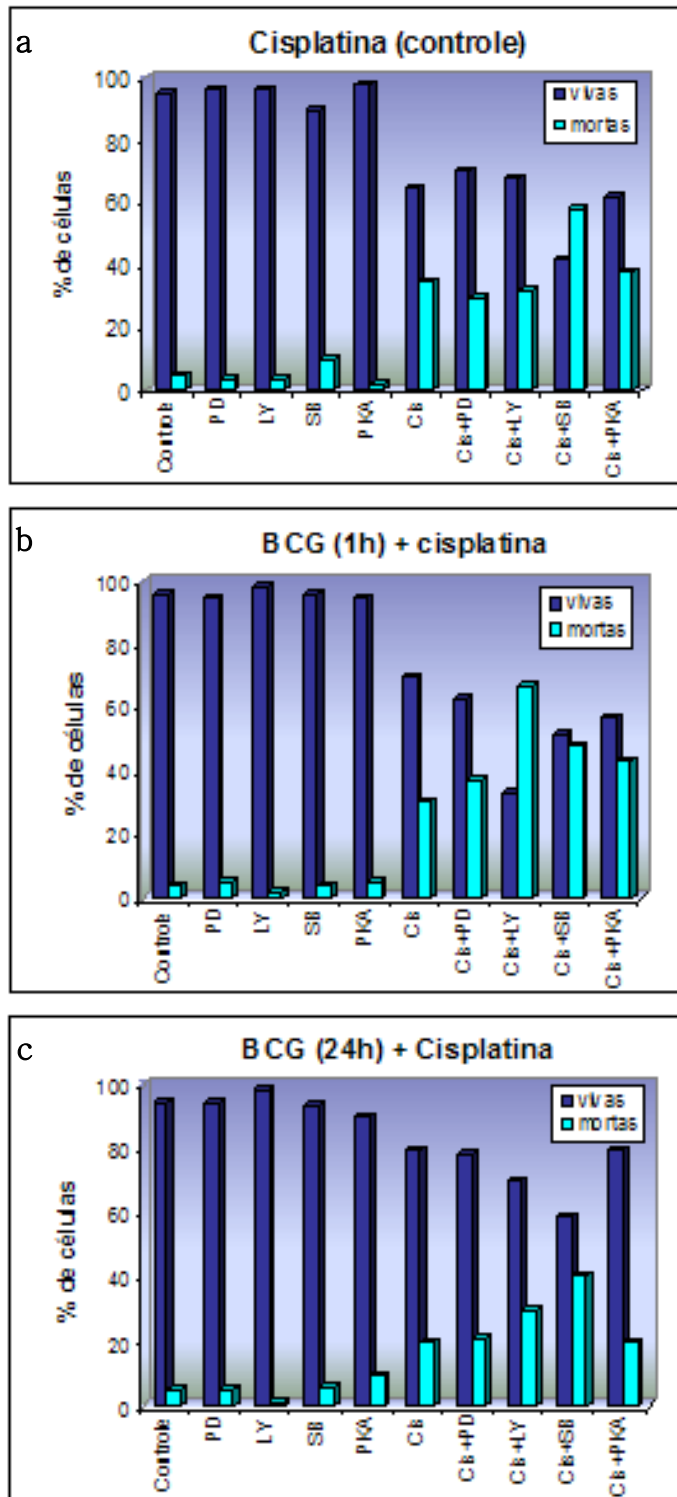


Figura 38 – Análise do papel da ativação das MAP quinases na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à indução de apoptose por cisplatina

As células Raw 264.7 foram tratadas com inibidores específicos para as MAP quinases 30 minutos antes de serem infectadas (a) com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), e induzidas à apoptose com cisplatina após 1 (b) ou 24 (c) horas da infecção. Foram usados inibidores para as quinases MEK1,2/ERK, (PD98059), PI-3K (LY294002), PKA (PKA5-24) e p38 (SB203580). Após 24 horas de indução de apoptose, as células foram coletadas, tratadas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas por microscopia de fluorescência, para avaliação da morfologia celular.

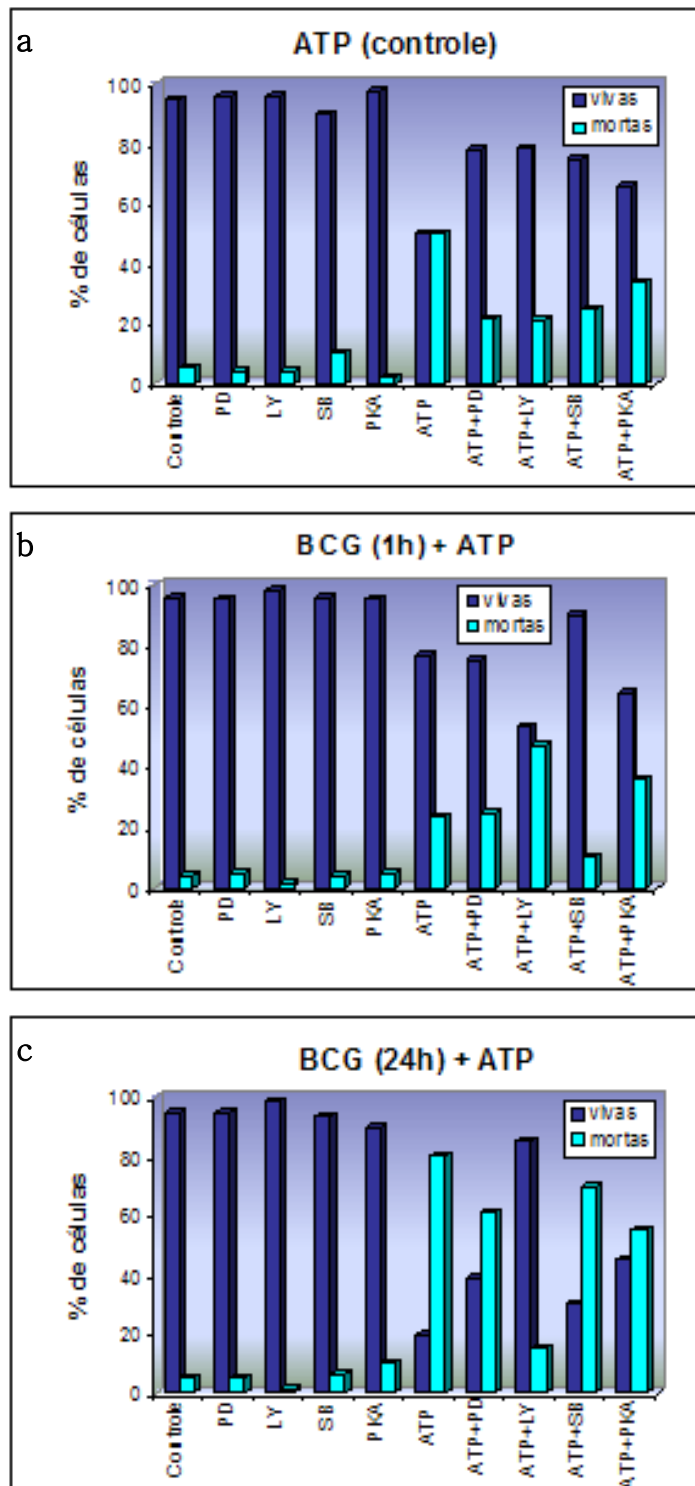


Figura 39 – Análise do papel da ativação das MAP quinases na susceptibilidade dos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG à indução de apoptose por ATP

As células Raw 264.7 foram tratadas com inibidores específicos para as MAP quinases 30 minutos antes de serem infectadas (a) com *M. bovis* BCG (MOI 5:1), e induzidas à apoptose com ATP após 1 (b) ou 24 (c) horas da infecção. Foram usados inibidores para as quinases MEK1,2/ERK, (PD98059), PI-3K (LY294002), PKA (PKA5-24) e p38 (SB203580). Após 24 horas de indução de apoptose, as células foram coletadas, tratadas com laranja de acridina e brometo de etídio e analisadas por microscopia de fluorescência, para avaliação da morfologia celular.

4.7. Papel do TLR-2 na modulação da morte dos macrófagos

4.7.1. Análise do papel do TLR2 na ativação de PI3K induzida pela *M. bovis* BCG

Recentemente foi demonstrado que *Staphylococcus aureus* ativa PI3K através da interação com o receptor TLR2. Para verificar o envolvimento de TLR2 na ativação de PI3K induzida pelas micobactérias, foi estudada a interação física da subunidade p85 de PI3K com TLR2 nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG.

A presença de PI3K e TLR2 no complexo protéico imunoprecipitado por ambos os anticorpos anti-PI3K e anti-TLR2 demonstrou a interação física entre estas proteínas, sugerindo que a ativação da via PI3K nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG ocorre através da ligação com TLR2 (Figura 40).

4.7.2. Infecção de macrófagos derivados de camundongos *knockout* para TLR2

Para melhor caracterizar a importância do receptor TLR2 na infecção micobacteriana, foram utilizados macrófagos derivados da medula óssea de camundongos *knockout* para este receptor. Estes macrófagos foram infectados com as micobactérias *M. avium* cepas 27 opaca e translúcida e 104 opaca e translúcida e *M. tuberculosis* cepas H37Ra e H37Rv.

A falta do receptor TLR2 nos macrófagos infectados com as cepas de *M. avium* levou a resistência total à morte induzida pelas micobactérias, com exceção da cepa 27 opaca, que apresentou perda de viabilidade a partir do 7º dia de infecção (Figura 41).

No caso da infecção dos macrófagos TLR2^{-/-} com *M. tuberculosis*, a proteção celular ocorreu nas células infectadas com a cepa virulenta H37Rv. Os macrófagos TLR2^{-/-} infectados com a cepa avirulenta H37Ra apresentaram acentuada perda de viabilidade já no 4º dia de infecção (Figura 42).

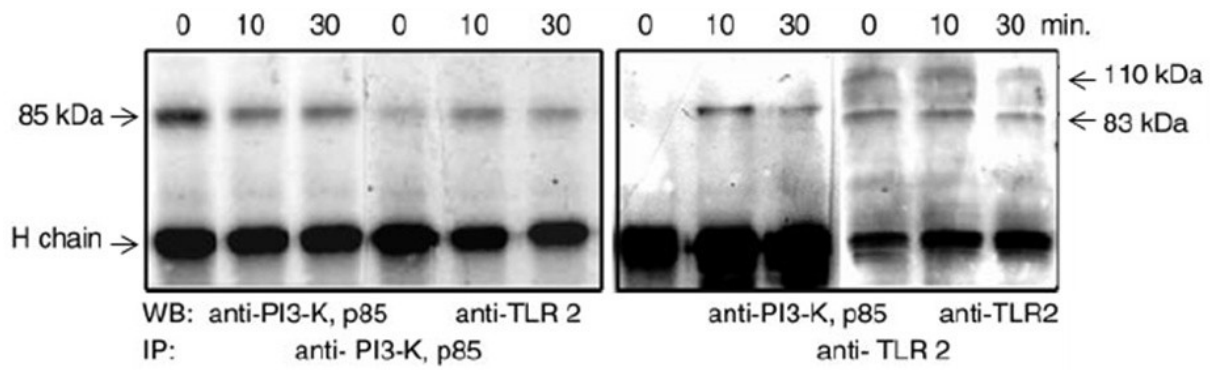


Figura 40 – Imunoprecipitação de TLR-2 e PI3-K.

As células Raw 264.7 foram lisadas 10 e 30min após a infecção com *M. bovis* BCG na razão MOI=5:1 bactéria/macrófago. Os extratos protéicos, 600µg, foram imunoprecipitados com anticorpos anti-TLR2 ou anti-PI-3K (p85). Os imunoprecipitados resultantes foram analisados por Western blotting usando os mesmos anticorpos.

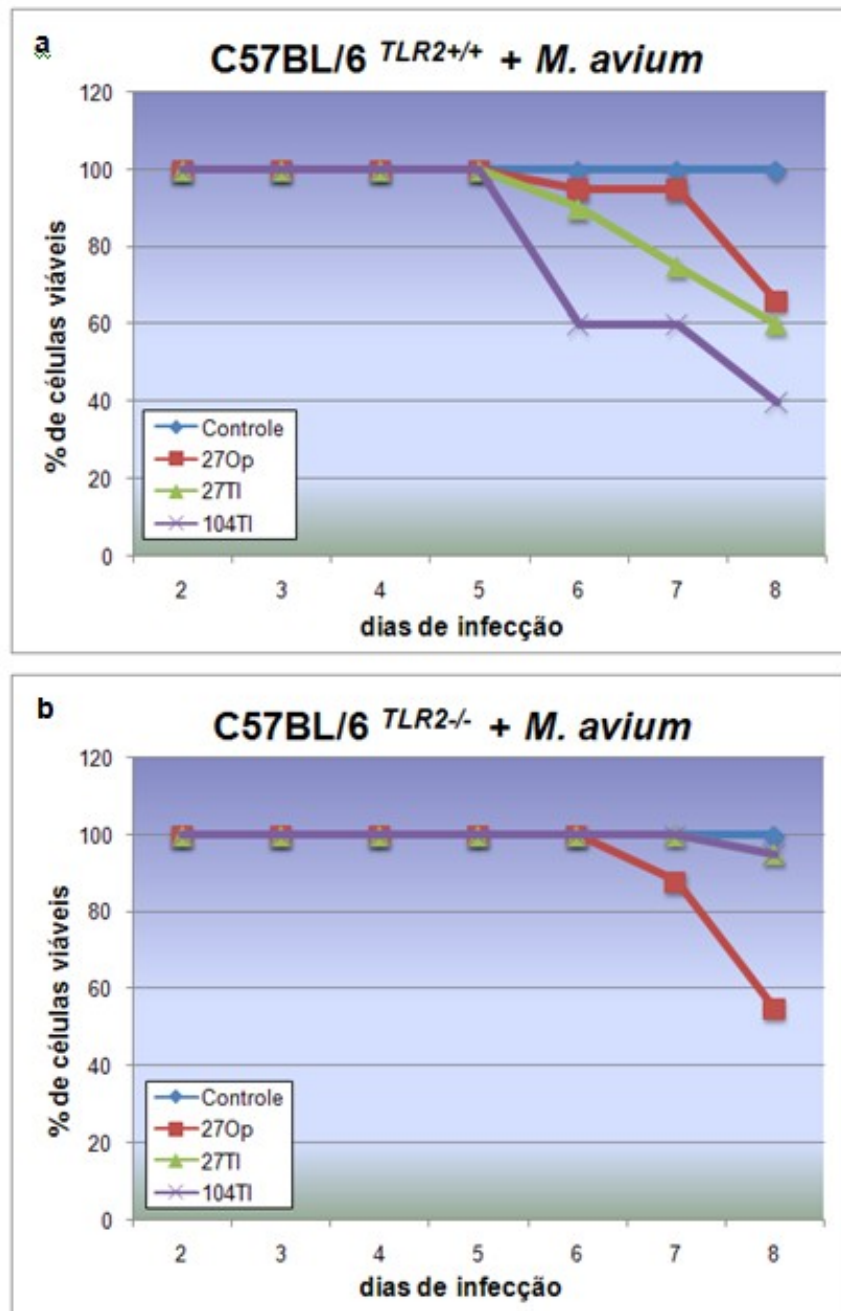


Figura 41 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com *M. avium*

As células isoladas de fêmur de camundongos C57BL selvagens (a) e C57BL *knockout* para TLR-2 (b) foram diferenciadas em macrófagos M1 com a suplementação do meio de cultura (DMEM F-12 + 10% de soro fetal) com 20% de sobrenadante de cultura de células L929 previamente coletado, centrifugado e congelado. Após a diferenciação, os macrófagos foram infectados com *M. avium* e a cinética de viabilidade foi realizada através da contagem das células vivas e mortas, usando o corante vital Azul de Trypan na proporção 1:1 volume/volume, com microscópio invertido.

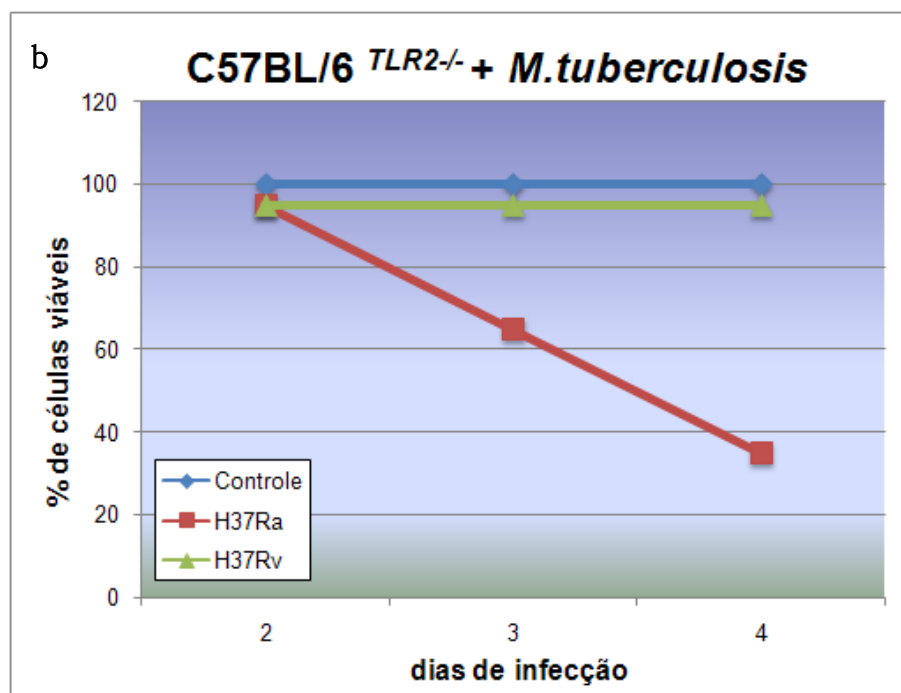
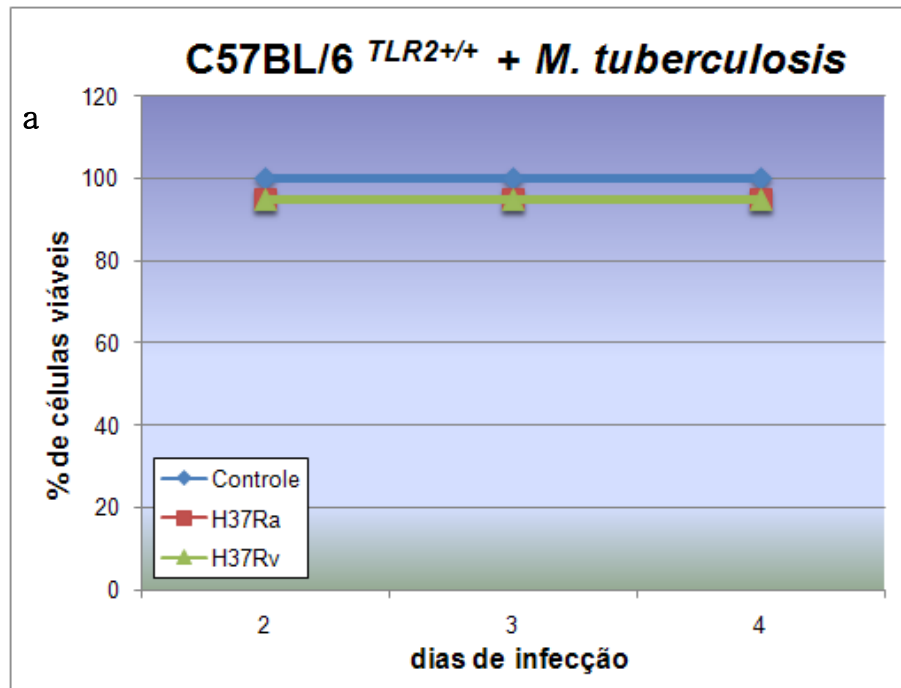


Figura 42 – Análise da viabilidade dos macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

As células isoladas de fêmur de camundongos C57BL selvagens (a) e C57BL *knockout* para TLR-2 (b) foram diferenciadas em macrófagos M1 com a suplementação do meio de cultura (DMEM F-12 + 10% de soro fetal) com 20% de sobrenadante de cultura de células L929 previamente coletado, centrifugado e congelado. Após a diferenciação, os macrófagos foram infectados com *M. tuberculosis* e a cinética de viabilidade foi realizada através da contagem das células vivas e mortas, usando o corante vital Azul de Trypan na proporção 1:1 volume/volume, com microscópio invertido.

4.8. Avaliação da ativação funcional dos macrófagos após a infecção destes com micobactérias

Micobactérias são potentes ativadores de macrófagos, e induzem a produção de mediadores pró-inflamatórios, indispensáveis para a imunidade inata e a indução da imunidade adquirida contra as micobactérias. Além de induzir a transcrição de genes pró-inflamatórios, a infecção micobacteriana também induz rapidamente mudanças morfológicas nos macrófagos, como o espalhamento celular, processo fundamental para a migração e a diferenciação celular.

Para avaliar se existia alguma diferença nas mudanças morfológicas induzidas pelas micobactérias atenuadas *M. bovis* BCG e virulentas *M. tuberculosis* cepa H37Rv, os macrófagos foram infectados e observados. Foi verificado que não há grande diferença no padrão de ativação dos macrófagos pelas micobactérias. Em ambos os casos, os macrófagos foram ativados, mostrando polarização, embora as micobactérias *M. bovis* BCG tenham induzido um maior espalhamento em comparação àquele induzido por *M. tuberculosis* (Figura 43).

O citoesqueleto de actina é o determinante principal da forma e motilidade celular. Sua reorganização é uma resposta celular inicial a uma variedade de sinais extracelulares. Avaliamos, então, as mudanças morfológicas dos macrófagos quando infectados com micobactérias e correlacionamos às modificações no citoesqueleto de actina.

Pode-se observar que a maioria das células controle possui uma morfologia arredondada, com um visível anel de F-actina (Figura 44a,e). 30 minutos de infecção com *M. bovis* BCG estimulou a produção de numerosas e finas protrusões da membrana, filopódios ricos em actina, o que levou a um aumento na área celular do macrófago, resultando no espalhamento celular (Figura 44b,f). Após 3 horas de infecção, a área celular dos macrófagos aumentou consideravelmente (Figura 44 c,g) comparada às células controle (Figura 44a,e). A formação de filopódios, lamelipódios e o espalhamento celular foram mediados pela forte polimerização da actina na periferia celular como revelado nas células marcadas com TRITC-faloidina (Figura 44f,g). Nas 21 horas seguintes, a forma dos macrófagos mudou significativamente. A reorganização do citoesqueleto de actina resultou na redução do número das finas protrusões de membrana. A maior parte das células adotou uma morfologia bipolar alongada com finas protrusões nas extremidades formadas por proeminentes lamelipódios (Figura 44d,h).

Essas mudanças morfológicas demonstram que ocorre espalhamento e polarização dos macrófagos em resposta à infecção por *M. bovis* BCG.

Foi demonstrado anteriormente que as micobactérias induzem a fosforilação, e assim a ativação, de várias quinases. Para estudar a importância das vias de quinases distintas para os rearranjos do citoesqueleto observados nos macrófagos infectados com as micobactérias, nós avaliamos as mudanças morfológicas nas células pré-tratadas com específicos inibidores de quinases.

O efeito mais pronunciado nas mudanças morfológicas dos macrófagos foi observado nas células pré-tratadas com inibidor de PI3K. LY294002 reduziu dramaticamente o espalhamento celular e a formação de filopódios induzidos por *M. bovis* BCG. A análise por microscopia de varredura da morfologia celular revelou que as células tratadas com LY294002 apresentavam-se arredondadas ou estelares, menos alongadas, com menos filopódios e muitas protrusões dorsais (microvilos). O inibidor de PI3K, LY294002, parece reduzir a capacidade dos macrófagos de emitir os filopódios, o que leva à formação do “ruffling” na membrana celular (Figura 45c).

A inibição de ERK com PD98059 reduziu um pouco o alongamento das células, apesar da morfologia da superfície celular apresentar-se similar à das células somente infectadas com *M. bovis* BCG. A ativação de ERK parece não ser essencial para a emissão dos filopódios e o espalhamento inicial, mas contribui para a polarização dos macrófagos (Figura 45d).

Em contraste com ERK, a inibição de p38 pelo inibidor específico SB203580 não teve efeito na polarização e nem no espalhamento dos macrófagos induzidos por *M. bovis* BCG, sugerindo um papel pequeno de p38 nos rearranjos do citoesqueleto dos macrófagos induzido pelas micobactérias (Figura 45e).

A ativação dos macrófagos por *M. bovis* BCG leva à ativação de NF- κ B e à subsequente transcrição de genes dependentes de NF- κ B para quimiocinas e fatores estimulantes de colônias, que poderiam induzir a atividade migratória do macrófago de maneira autócrina. Para verificar o papel de fatores dependentes de NF- κ B nas mudanças induzidas por *M. bovis* BCG na morfologia dos macrófagos, a ativação de NF- κ B foi suprimida com IC. A inibição de NF- κ B não teve influência no espalhamento inicial dos macrófagos e efeito ligeiramente inibidor na polarização dos macrófagos (Figura 45f). Os macrófagos apresentaram-se um pouco maiores, mais espalhados e menos polarizados comparados àqueles somente estimulados com *M. bovis* BCG. Isso sugere que fatores dependentes de NF- κ B promovem a

polarização induzida por *M. bovis* BCG, mas não exercem efeito no espalhamento inicial, o que demonstra o efeito direto das micobactérias tanto no espalhamento como na polarização subsequente.

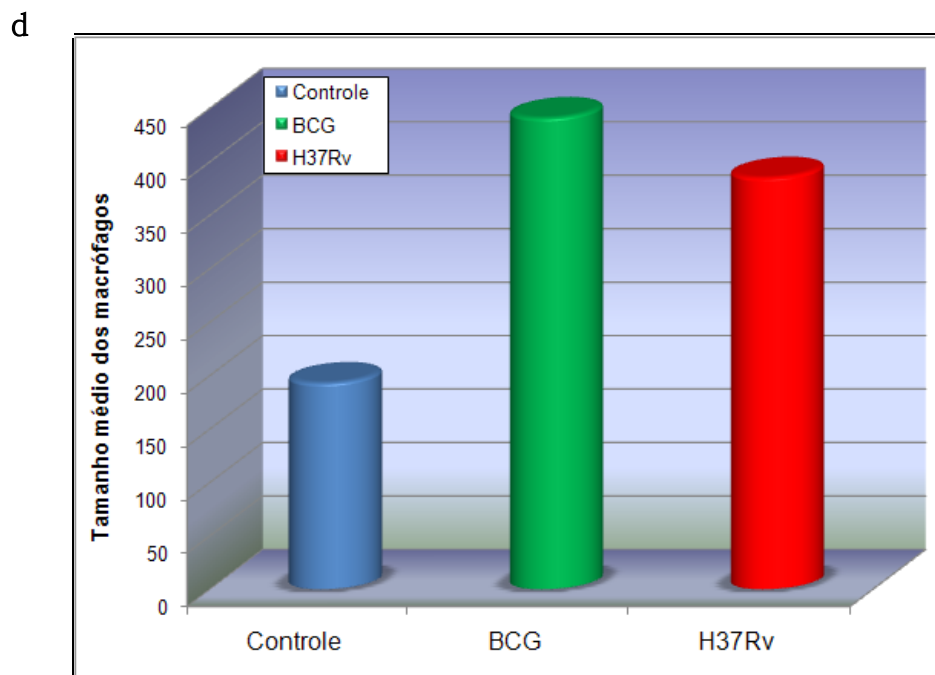
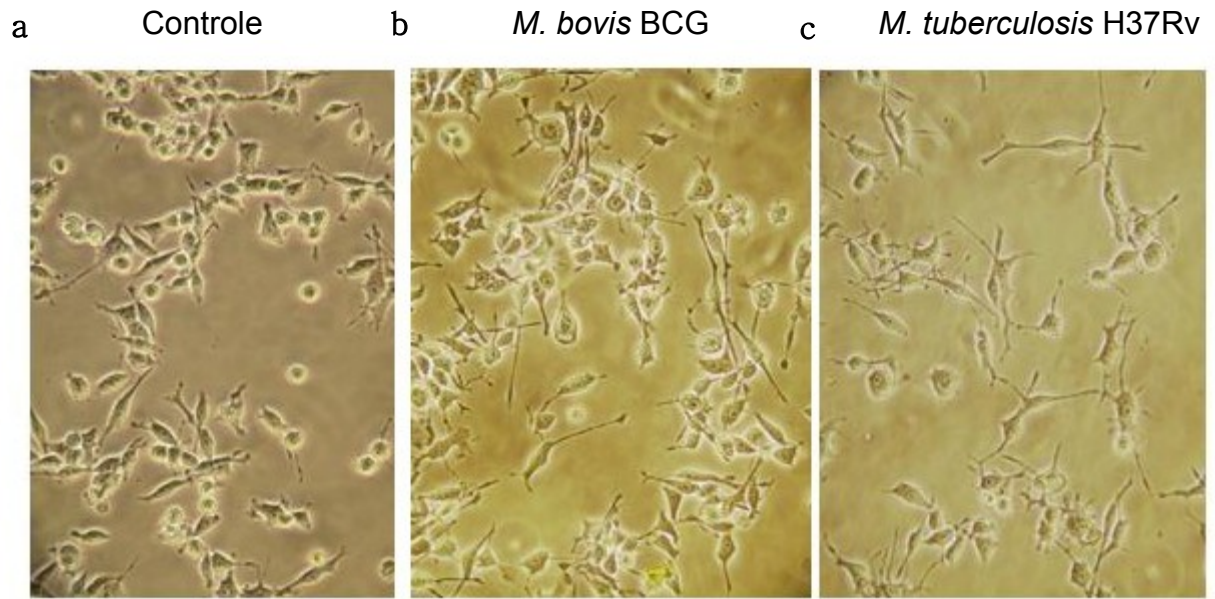


Figura 43 – Comparação das mudanças morfológicas induzidas pelas micobactérias *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis*

Os macrófagos Raw 264.7 (a) foram infectados com *M. bovis* BCG (b) ou *M. tuberculosis* (c), MOI 10:1, por 24 horas. As células foram analisadas por microscopia de campo claro (d). O tamanho dos macrófagos infectados foi avaliado e comparado com as células controle.

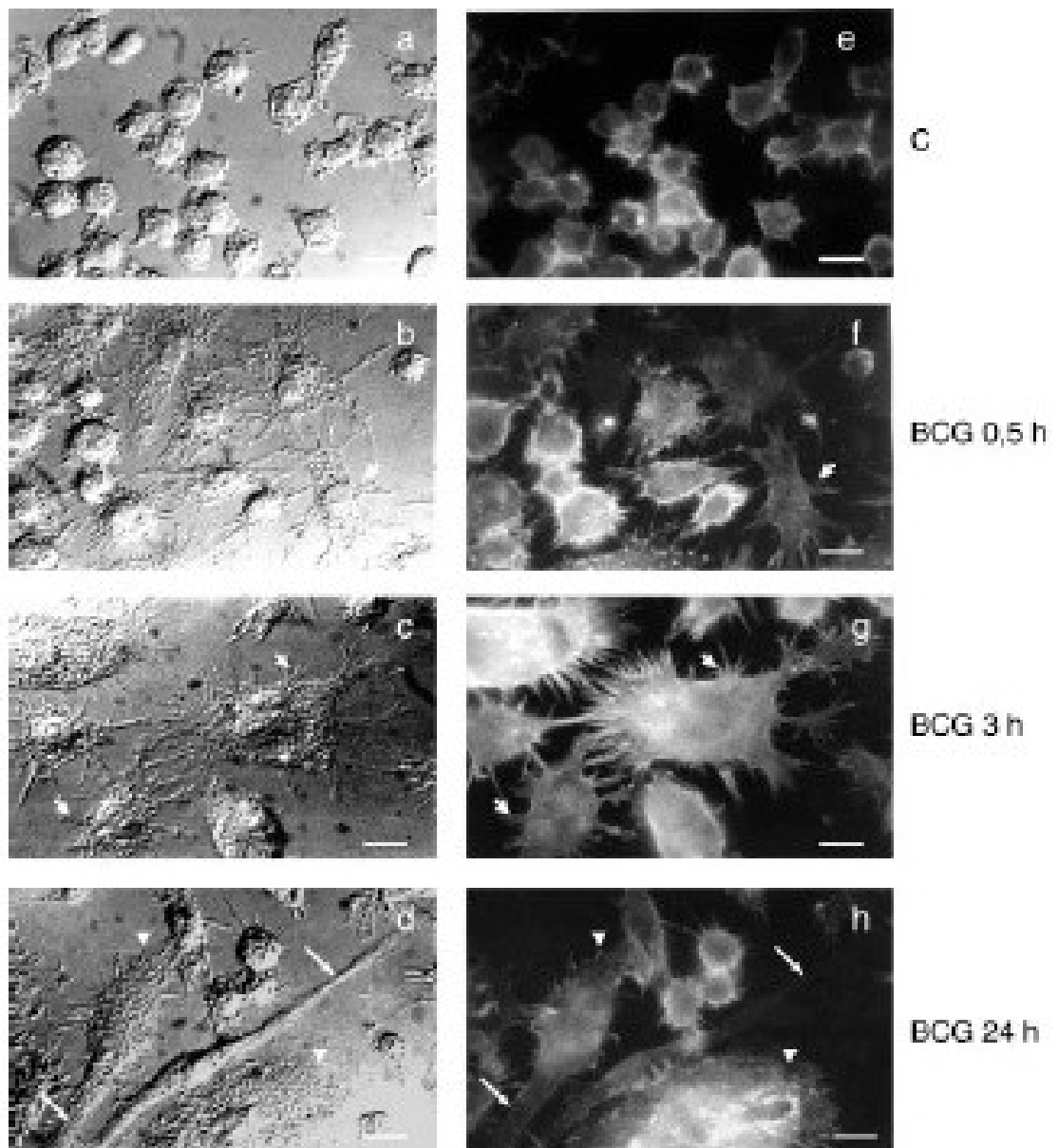


Figura 44 - Mudanças morfológicas e reorganização de actina induzidas por BCG nos macrófagos Raw264.7

As células Raw 264.7 foram plaqueadas em lamínulas e incubadas por 24 horas (a); o meio de cultura foi trocado para meio suplementado com 0,1% de soro fetal bovino e incubadas por mais 18 horas (b). As células foram então não-estimuladas (C) ou infectadas com micobactérias BCG viáveis na proporção MOI 10:1 nos períodos de tempo indicados. Após este período, foram marcadas com faloidina-TRITC para revelar F-actina. As imagens foram obtidas usando microscopia óptica de contraste interferencial diferencial (a-d) ou microscopia de fluorescência (e-h). As cabeças de setas indicam numerosos filopódios ricos em actina nas células espalhadas observados 0,5-3 horas após o tratamento (b,c,f,g) e *F-actina-positive leading edge* das células polarizadas 24 horas após o tratamento (d,h). As setas indicam uropódios das células sem F-actina polarizadas. Barra de escala = 10µm.

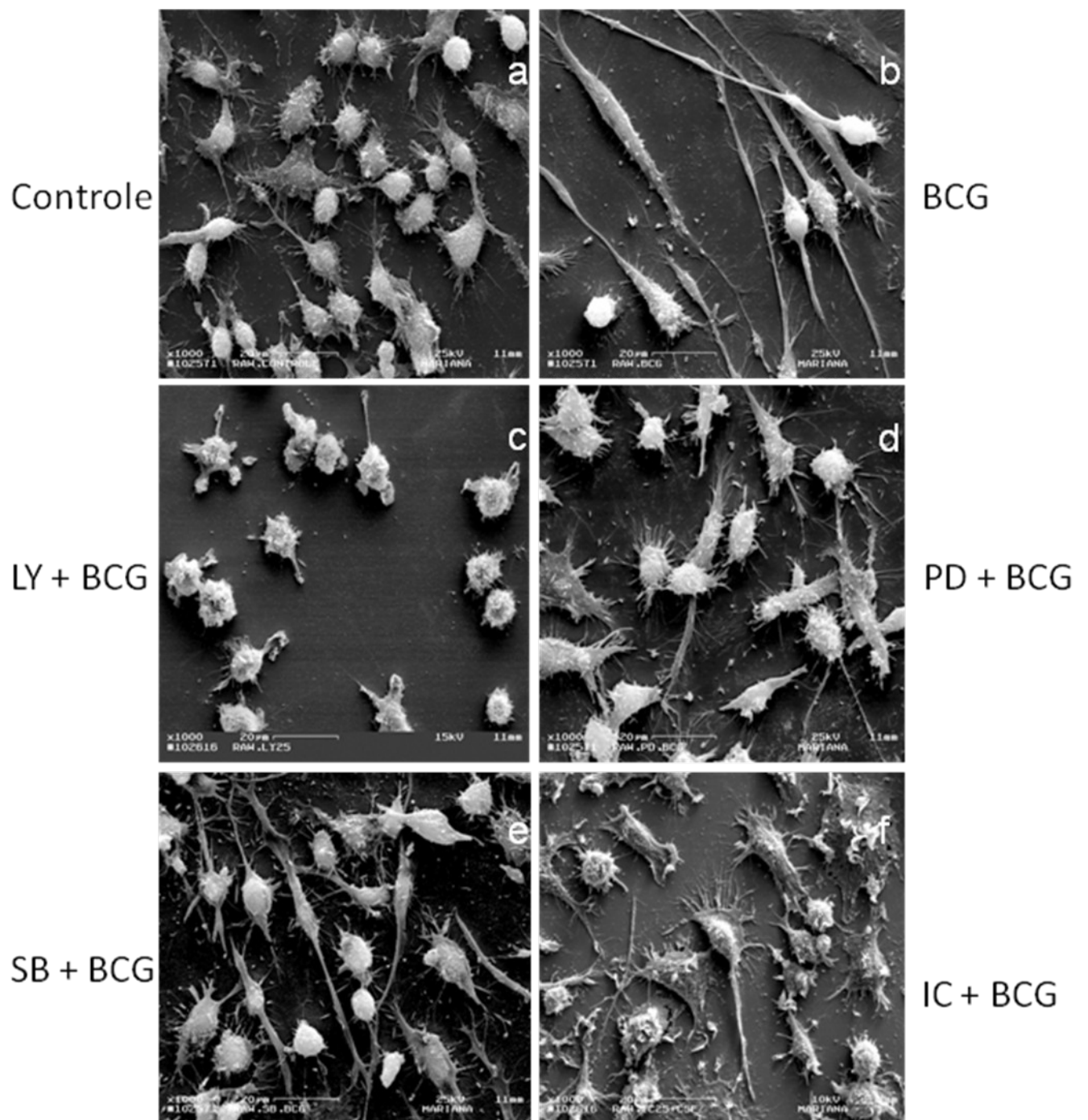


Figura 45 - Efeitos de inibidores de quinases específicos nas mudanças morfológicas dos macrófagos Raw264.7 estimulados com BCG

As células foram pré-tratadas com os inibidores específicos para as vias das quinases por 1 hora e então estimuladas com *M. bovis* BCG por 24 horas. As culturas foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de varredura. Barras de escala = 20 µm.

- a. Controle
- b. *M. bovis* BCG
- c. LY294002 + *M. bovis* BCG
- d. PD98059 + *M. bovis* BCG
- e. SB203580 + *M. bovis* BCG
- f. IC + *M. bovis* BCG



DISCUSSÃO →

5. DISCUSSÃO

A tuberculose permanece uma causa importante de morbidade e mortalidade por todo o mundo. Fatores do hospedeiro exercem um papel fundamental na proteção contra as micobactérias, entretanto, as micobactérias patogênicas desenvolveram mecanismos para escapar do controle do sistema imune. Um melhor conhecimento da resposta do hospedeiro para as micobactérias patogênicas e avirulentas pode contribuir para melhorias no tratamento e na prevenção da tuberculose.

Nesse trabalho, estudamos os mecanismos de modulação da morte celular programada e da atuação funcional dos macrófagos por micobactérias virulentas e avirulentas. Para isso, utilizamos como modelo macrófagos murinos da linhagem Raw 264.7 e macrófagos derivados de células de medula óssea de camundongos C57BL/c selvagens e C57BL *knockout* para TLR-2, infectados com as micobactérias *Mycobacterium bovis* BCG, cepas 27 opaca e translúcida e 104 opaca e translúcida de *M. avium*, e cepas H37Ra e H37Rv de *M. tuberculosis*. Foram usadas 7 cepas diferentes de micobactérias para avaliar se diferentes graus de virulência influenciariam o tipo de resposta dos macrófagos. Os Bacillus Calmette-Guérin são *M. bovis* atenuadas por mutação espontânea do locus RD-1 (Pyn *et al.*, 2002). A deficiência na secreção dos antígenos e fatores de virulência CFP-10 (*Culture Fitrated Protein-10*) e ESAT-6 (*Early Secretory Antigenic Target-6*), principalmente, significativamente diminuiu a virulência destas bactérias, o que possibilitou que fossem utilizadas como vacina (Lewis *et al.*, 2003; Guinn *et al.*, 2004; Hsu *et al.*, 2003). Foi demonstrado haver um grau de virulência entre as 4 cepas de *M. avium* utilizadas, sendo a cepa 104 mais virulenta que a 27 e as bactérias que formam colônias lisas (S) mais virulentas que as que formam colônias opacas (R). Sendo assim, seria esperado que houvesse um grau decrescente nas cepas: 104 translúcida (104TI) – 104 opaca (104Op) - 27 translúcida (27TI) – 27 opaca (27op). Com relação às cepas de *M. tuberculosis*, foram utilizadas duas cepas de referência sendo a cepa H37Ra um mutante avirulento da cepa H37Rv.

A apoptose das células hospedeiras tem sido associada com a infecção intracelular de muitos patógenos, e é considerada como um mecanismo estratégico do organismo para livrar-se de invasores.

Macrófagos alveolares murinos infectados com cepas avirulentas ou atenuadas de *M. tuberculosis* sofrem apoptose de maneira TNF- α -dependente,

diferente da infecção com cepas virulentas, que induzem pouca ou nenhuma apoptose (Balcewicz-Sablinska *et al.*, 1998; Keane *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 2000). Foi postulado que a resposta apoptótica representaria um mecanismo de defesa inato contra infecções intracelulares.

Na infecção micobacteriana, foi demonstrado que a apoptose promove a morte de micobactérias intracelulares (Fratazzi *et al.*, 1997; Molloy *et al.*, 1994), diferentemente da necrose, que favorece a liberação e disseminação das micobactérias após sua replicação (Chen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). O efeito das micobactérias na viabilidade celular é complexo. Foi demonstrado que as micobactérias virulentas e avirulentas induzem (Plácido *et al.*, 1997; Keane *et al.*, 1997; Rojas *et al.*, 1998; Manfredi *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 1999; Santucci *et al.*, 2000) ou inibem (Kremer L *et al.*, 1997) a apoptose dos macrófagos hospedeiros. Foi demonstrado também que as mesmas bactérias podem induzir necrose das células infectadas (Chen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). Uma análise da literatura sugere que há discordância nos dados obtidos por diferentes autores e é resultado de diferentes condições experimentais como variação da dose de infecção, período de tempo de avaliação da morte celular após a infecção, virulência das micobactérias e metodologia da avaliação da morte celular. Em nossos experimentos, verificamos a importância de todos estes fatores na indução da morte celular pelas micobactérias.

Os dados por nós obtidos demonstraram que as micobactérias atenuadas *M. bovis* BCG induzem apoptose nos macrófagos infectados a partir do 4º dia de maneira dose-dependente, mediada pela produção de TNF- α . O aumento da dose de infecção de 1:1 para 10:1 levou a um aumento da secreção de TNF- α assim como na quantidade de células que desenvolveram apoptose. Já a infecção com MOI 50:1 promoveu apoptose com aumento considerável das células necróticas na população de células mortas, demonstrando que o aumento na quantidade das bactérias intracelulares favorece o desenvolvimento da morte necrótica primária ou secundária, apesar de o tipo de morte celular preferencial induzido pela BCG ser a apoptose. O papel do TNF- α produzido pelos macrófagos na indução de apoptose de maneira autócrina foi mostrado (Xaus *et al.*, 2000), e nossos experimentos de neutralização do TNF- α por anticorpos, que reduzem significativamente a quantidade de células apoptóticas nas culturas infectadas, está em concordância com estas observações. Entretanto, é importante ressaltar que a apoptose dos macrófagos infectados por BCG pode ser observada nas culturas somente após 3-4

dias de infecção, apesar dos altos níveis de produção de TNF- α , já a partir de 3 horas após a infecção. Estes dados permitem sugerir que os macrófagos encontram-se protegidos para o desenvolvimento da apoptose na etapa inicial da infecção. Para verificar esta hipótese, estudamos a suscetibilidade destas células à indução de apoptose por indutores padrão (ATP, cisplatina). Os dados obtidos demonstram uma maior resistência das células à indução da apoptose por cisplatina e ATP no período de pelo menos 48 horas após a infecção por BCG.

Para verificar se existe diferença na modulação da viabilidade dos macrófagos pelas micobactérias virulentas e avirulentas, nós monitoramos a perda de viabilidade e o tipo de morte celular nas culturas Raw264.7 infectadas por *M. tuberculosis* H37Rv e H37Ra, e pelas cepas de *M. avium* com graus de virulência diferentes.

No caso dos macrófagos infectados com *M. avium*, foi demonstrado que houve perda acentuada de viabilidade já nos primeiros dias de infecção. Diferente do esperado, não houve variação na resposta dos macrófagos infectados pelas 4 cepas de *M. avium*. Todas as cepas causaram perda de viabilidade de maneira similar, e, portanto não conseguimos correlacionar os diferentes graus de virulência das cepas 27 e 104 translúcidas e opacas com a viabilidade celular dos macrófagos da linhagem Raw 264.7, o que nos levou a não prosseguir com este modelo de infecção.

A infecção dos macrófagos com as cepas de *M. tuberculosis* virulenta H37Rv e avirulenta H37Ra induziu perda acentuada na viabilidade celular, a partir do 3º dia de infecção, mostrando tendência dose-dependente, sendo que a cepa virulenta H37Rv provocou significativamente mais morte nas culturas dos macrófagos que a cepa avirulenta H37Ra.

Importante ressaltar que a cepa avirulenta em menor dose de infecção (MOI 10:1) induziu predominantemente apoptose nos macrófagos, enquanto que o aumento da dose (MOI 50:1) levou os macrófagos à necrose. O tipo de morte predominante induzido pelas micobactérias patogênicas foi a necrose em ambas as doses de infecção. Dados recentes confirmam nossas observações de que *M. tuberculosis* virulentas, H37Rv (Chen *et al.*, 2006) ou isolados clínicos (Park *et al.*, 2006), diferentemente das micobactérias avirulentas, induzem nos macrófagos humanos e murinos a necrose, que é mais acentuada nas doses de infecção maiores do que MOI 25:1. O TNF- α produzido pelos macrófagos na resposta para as

micobactérias pode induzir apoptose (Lastek *et al.*, 1998; nossos dados) nas células, incluindo os próprios macrófagos, ou em alguns casos necrose.

Para verificar se a produção do TNF- α pode contribuir para a necrose dos macrófagos, nós quantificamos o TNF- α secretado pelos macrófagos infectados por *M. tuberculosis* H37Ra e H37Rv. A *M. tuberculosis* induziu TNF- α de maneira dose-dependente, mas o nível de produção induzido pela cepa H37Ra foi 6 vezes menor e pela cepa H37Rv 15 vezes menor em comparação com o que foi induzido por BCG, o que dificilmente pode explicar a necrose observada. Chen e colaboradores demonstraram que a morte provocada pela cepa H37Rv está associada com uma significativa ruptura das membranas mitocondriais interna e externa, o que leva a necrose do macrófago (Chen *et al.*, 2006). Vários autores sugerem que as proteínas ESAT-6 e CFP-10 secretadas pelas *M. bovis* e *M. tuberculosis*, mas não pela BCG que sofreu a deleção dos genes que codificam o sistema secretor para estas proteínas, podem acumular-se nos macrófagos infectados provocando alterações mitocondriais direta ou indiretamente. Outro fator de virulência de *M. tuberculosis* que foi sugerido contribuir para a indução de necrose por alguns isolados clínicos é o PGL (*phenolic glycolipid*) (Riley, 2006). Este glicolípido é expresso nas cepas da família Beijing, mas não foi demonstrado na cepa H37Rv, e não pode explicar a morte celular no nosso modelo. Os fatores que levam os macrófagos infectados pelas micobactérias patogênicas à necrose devem ainda ser determinados. Estes fatores, sem dúvida, contribuem fortemente para a virulência da bactéria e o desenvolvimento da doença, pois favorecem a liberação do patógeno do seu nicho de reprodução, o que leva à disseminação da infecção.

A inibição da apoptose na etapa inicial após a infecção dos macrófagos por BCG observada no nosso estudo foi detectada na infecção pela *M. tuberculosis* patogênica também (Chen *et al.*, 2006). Os autores observaram que após 6 horas de infecção, uma pequena parte das células entra em apoptose e/ou necrose, o que corresponde com as mudanças na permeabilidade da membrana mitocondrial (externa e interna), mas este processo é inibido e nas 24-48 horas seguintes e a quantidade de células apoptóticas e necróticas não é maior do que nas culturas não infectadas. O efeito de proteção é transitório, e depende da virulência da bactéria (provavelmente devido à velocidade de proliferação intracelular), da MOI de infecção e do tipo dos macrófagos. Nos macrófagos humanos, a indução da necrose por H37Rv foi observada 48-72 horas após a infecção e no nosso modelo de infecção com macrófagos murinos Raw264.7, após 72 horas de infecção. A inibição da morte

celular (apoptose ou necrose) dos macrófagos hospedeiros na etapa inicial após a infecção é um importante fator que permite a reprodução das micobactérias, patógenos intracelulares facultativos.

Para entender quais mecanismos podem contribuir para a prevenção da morte do macrófago infectado, estudamos as vias de sinalização acionadas nestas células pelas micobactérias. A via principal que leva os macrófagos a ativação pelas micobactérias é mediada pelos receptores Toll-like, principalmente TLR2 e TLR4: TLR2/MyD88/ fatores adaptadores/ quinases, ativação do fator nuclear κ B, genes dependentes, citocinas inflamatórias e genes anti-apoptóticos. Verificamos a ativação do NF- κ B pelas micobactérias BCG e *M. tuberculosis*. Nossos experimentos preliminares demonstram que as bactérias vivas e lisadas (WCL) apresentam capacidades de ligação com o TLR2 semelhantes e ativação das vias dependentes deste receptor. Por motivos de biosegurança, a maioria dos experimentos de sinalização foi realizada com as micobactérias lisadas.

Ambas as cepas de micobactérias, BCG e *M. tuberculosis*, induziram a ativação do NF- κ B já após 1 hora de tratamento, que foi mantida nas 48 horas seguintes. A inibição da ativação do NF- κ B por inibidores específicos, PDTC e peptídeo SC-50, reduziu completamente o efeito protetor anti-apoptótico contra ATP, observado no início da infecção com BCG, demonstrando a importância da ativação deste fator e da transativação de genes dependentes para proteção celular contra a apoptose. Entre os genes dependentes de NF- κ B que podem regular a apoptose negativamente estão os genes *Bcl-X1* e *Bcl-2* da família Bcl-2. A indução da expressão destes genes nos macrófagos infectados pela *M. tuberculosis* foi demonstrado recentemente (Sly *et al.*, 2003). Além da via do NF- κ B, a estimulação de TLR2 e MyD88 leva à ativação de outros fatores de transcrição como AP-1, CREB, ERK de maneira dependente da ativação das MAP quinases.

Entre os genes regulados por estes fatores de transcrição encontram-se os genes das citocinas pró-inflamatórias (incluindo TNF- α) e vários genes envolvidos na regulação da sobrevivência celular (proteínas que controlam o ciclo celular, utilização de glicose, etc). Foi demonstrado em diferentes modelos celulares que as vias das MAP quinases estão envolvidas na regulação da apoptose: negativa, através da ativação de ERK e p38 (Milella *et al.*, 2002), ou positiva, através da ativação de JNK e p38 (Nelson & Fry, 2001;). Outra via de sobrevivência importante é a via PI3K/Akt, que quando acionada inibe a apoptose através da fosforilação de Bad. Neste trabalho, nós estudamos a ativação das MAP quinases e PI3K/Akt pelas

micobactérias BCG e *M. tuberculosis* e sua importância na regulação da apoptose dos macrófagos. A importância de cada uma das quinases no efeito protetor da infecção por BCG contra a apoptose induzida por ATP e cisplatina foi verificada através da sua inibição por inibidores farmacológicos específicos. Foi demonstrado que a supressão de PI3K (pelo LY294002) e de p38MAPK (pelo SB203580) reduziu o efeito protetor de BCG contra a apoptose, aumentando a suscetibilidade dos macrófagos à indução da apoptose por ATP e cisplatina. Os resultados obtidos permitem concluir que a ativação de NF- κ B e das vias PI3K/Akt e p38MAPK pelas micobactérias é o fator que previne o desenvolvimento da apoptose e necrose nos macrófagos infectados com altas doses de infecção nas primeiras 48 horas após a infecção, favorecendo a replicação intracelular das bactérias.

A produção de TNF- α é um fator que induz apoptose nos macrófagos infectados pelas micobactérias BCG atenuadas. As micobactérias *M. tuberculosis* patogênicas induzem muito menos TNF- α em comparação com as avirulentas, diminuindo a possibilidade da indução de apoptose. A redução da produção de TNF- α nestes macrófagos está associada com a inibição da ativação das MAP quinases (ERK e JNK) observada nas células tratadas com *M. tuberculosis* em comparação com o respectivo nível de ativação induzidas por BCG. Em condições de falta de sinais para a indução da apoptose, o crescimento intracelular da *M. tuberculosis* e o acúmulo de fatores de virulência ainda pouco caracterizados leva os macrófagos à necrose liberando as micobactérias.

A diferença na ativação das principais vias de sinalização celular pelas micobactérias virulentas (*M. tuberculosis* cepa H37Rv) e atenuadas (BCG) observada nos nossos experimentos levou-nos a estudar outras funções dos macrófagos que podem ser diferentemente reguladas por estas micobactérias. A migração dos macrófagos em resposta às micobactérias é uma função indispensável para a formação do granuloma e proteção contra a tuberculose. A migração das células exige as mudanças morfológicas do citoesqueleto celular (formação de filopódios, lamelipódios, polarização) adequadas para a locomoção. Neste trabalho, nós avaliamos as mudanças morfológicas e o rearranjo do citoesqueleto das células Raw 264.7 tratadas com as micobactérias *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* cepa H37Rv por microscopia óptica e de varredura. Avaliamos também o papel das vias MAPK, PI3K/Akt e NF- κ B nestes rearranjos. O tratamento dos macrófagos pelas micobactérias vivas ou lisadas, *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* cepa H37Rv, induz um padrão semelhante de mudanças morfológicas: protrusão de numerosos

filopódios em 30 minutos, espalhamento celular após 3 horas e polarização celular após 24 horas de tratamento, o que corresponde ao fenômeno migratório dos macrófagos. As mudanças morfológicas foram acompanhadas pela polimerização de actina nas protrusões formadas pelas células, observada através da marcação por faloidina-TRITC. Não foi observada diferença significativa entre o efeito da *M. bovis* BCG e da *M. tuberculosis* cepa H37Rv nos rearranjos do citoesqueleto dos macrófagos. A análise inibitória do papel das quinases no rearranjo demonstrou que a ativação de PI3K foi essencial para a formação inicial dos pseudópodes e polarização celular induzidas pelas micobactérias, enquanto a inibição de ERK, p38 e JNK não teve nenhum efeito.

Estes dados demonstram a importância da ativação da via PI3K para a migração dos macrófagos. Dados recentes permitem sugerir que a PI3K atua na fosforilação de pequenas GTPases, Rac-1, que por sua vez regulam a polimerização da actina na formação dos filopódios pelos macrófagos (Raftopoulou & Hall, 2004). A inibição de PI3K pelo inibidor específico LY294002 previne a formação dos filopódios, o que leva ao arredondamento das células com a liberação de membrana citoplasmática, que forma “cristas” na superfície celular, observadas através da microscopia de varredura.

A comparação da ativação da via PI3K/Akt pelas *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* cepa H37Rv não demonstra diferença na fosforilação de Akt, dependente da ativação de PI3K, ou seja, a ativação desta via não é alterada pelas *M. tuberculosis* patogênicas. As vias MAPK e NF- κ B, apesar de sua importância essencial para a produção de mediadores inflamatórios e reguladores da apoptose, são dispensáveis para os rearranjos citoesqueléticos dos macrófagos, importante para a migração. Estes dados explicam porque alterações na ativação das MAPK pelas micobactérias patogênicas não tem efeito nas mudanças morfológicas dos macrófagos, que se apresentaram semelhantes quando infectados com *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* cepa H37Rv. Estes dados não excluem que a migração dos macrófagos pode ser inibida pelas *M. tuberculosis* através da supressão das quimiocinas MAPK-dependentes. Esta hipótese será verificada em experimentos futuros.

Devido à importância da ativação da via PI3K/Akt pelas micobactérias para a realização das funções do macrófago, nós verificamos o mecanismo de ativação da PI3K pelas micobactérias, desconhecido ainda. Levando em consideração que as

principais vias de sinalização para a ativação dos macrófagos são mediadas pelo TLR2, nós verificamos o papel deste receptor na ativação de PI3K.

Para verificar o envolvimento de TLR-2 na ativação de PI-3K induzida pelas micobactérias, foi estudada a interação física da subunidade p85 de PI-3K e TLR2 nos macrófagos infectados com *M. bovis* BCG. Nossos dados apresentam a interação física entre PI-3K e TLR2, sugerindo que a *M. bovis* BCG ativa PI-3K através da ligação com o receptor TLR-2. Estes dados estão em concordância com as observações feitas por Arbibe e colaboradores, que demonstraram o mesmo caso na infecção com *Staphylococcus aureus* mortas por calor (Arbibe *et al.*, 2000). Sabendo da importância do receptor TLR-2 durante a infecção dos macrófagos pelas micobactérias, utilizamos camundongos *knockout* para este receptor e observamos que o receptor TLR-2 é de fundamental importância na morte dos macrófagos induzida pelas micobactérias.

Micobactérias são conhecidas como indutores potentes da migração de leucócitos no local da infecção, resultando na formação do granuloma. Para migrar, as células tem que se tornar polarizadas morfologicamente na direção da migração. Os rearranjos morfológicos, como as protrusões de filopódios, espalhamento celular e polarização são essenciais para a motilidade dos macrófagos (Ridley *et al.*, 2003). Para estudar a atividade funcional dos macrófagos durante a infecção micobacteriana, foram analisadas as mudanças morfológicas ocorridas durante a infecção bem como os mecanismos que levam os macrófagos infectados com micobactérias a obter as características para sua motilidade.

Nossos dados demonstram que as micobactérias *M. bovis* BCG induziram numerosos filopódios ricos em F-actina já após 15 a 30 minutos de infecção, levando ao espalhamento celular intenso e, subseqüentemente, ao alongamento e polarização celular. O alongamento celular foi acompanhado da redução do número de filopódios e do conteúdo de F-actina. A polimerização da actina foi mantida predominantemente na região das extremidades dos lamelipódios nas células bipolares. As mudanças morfológicas observadas são típicas da migração de macrófagos sugerindo que alguns componentes micobacterianos poderiam induzir a motilidade dos macrófagos. Para estudar a transdução de sinal induzida pelas micobactérias que estariam levando à resposta dos macrófagos, foi realizada uma análise da inibição das vias de quinases possivelmente envolvidas na regulação dos rearranjos do citoesqueleto usando inibidores farmacológicos específicos.

A supressão da PI-3K por LY294002 significativamente inibiu as protrusões celulares induzidas por *M. bovis* BCG levando à redução do número de filopódios e lamelipódios, o que causou uma diminuição no espalhamento e polarização dos macrófagos. Muito provavelmente, o efeito foi mediado pela inibição da polimerização da actina, já que o conteúdo de F-actina foi significativamente reduzido nas células pré-tratadas com este inibidor. Outro fator que poderia limitar a extensão de pseudópodes e o espalhamento celular é a disponibilidade de membrana plasmática (Cox *et al.*, 1999). A análise por microscopia de varredura da superfície celular confirmou que a inibição de PI-3K leva à supressão das protrusões dos macrófagos, ao arredondamento celular e ao intenso “ruffling” da membrana plasmática dorsal. As mudanças morfológicas observadas sugerem não apenas que a extensão de novos filopódios foi anulada. A redução da aderência celular na presença de LY294002 levou à contração dos filopódios existentes, à disponibilização de membrana celular e à formação de numerosos microvilos dorsais na superfície celular. Então, a limitação da extensão de pseudópodes na presença do inibidor de PI-3K ocorreu apesar da alta disponibilidade de membrana plasmática destas células.

Outros inibidores de quinases utilizados neste estudo não tiveram efeito pronunciado, quando apresentaram, nos rearranjos do citoesqueleto dos macrófagos. A supressão de MEK1/ERK com PD98059 levou à moderada redução da polarização induzida por *M. bovis* BCG. Este efeito pode ser explicado pela conhecida importância da ativação de ERK na geração de pseudópodes via regulação e fosforilação da quinase da cadeia leve da miosina, o que leva a combinação actina-miosina durante a migração celular (Cheresh *et al.*, 1999). No entanto, os inibidores de ERK e p38MAPK não tiveram efeito significativo no espalhamento inicial dos macrófagos infectados com micobactérias.

A inibição de NF- κ B por IC não teve efeito no espalhamento radial embora tenha reduzido o alongamento das células. Os macrófagos apresentaram-se mais espalhados e menos polarizados em comparação àqueles somente infectados. Esses dados demonstram que a ativação de NF- κ B pelas micobactérias não é importante para os rearranjos do citoesqueleto dos macrófagos, apesar de contribuir para a polarização celular essencial para a migração, mais provavelmente através da produção de quimiocinas estimuladoras de macrófagos.

Nossos dados sugerem fortemente que as micobactérias ativam a via PI-3K através da ligação com os receptores TLR-2 e que esta via é essencial para o rearranjo da actina essencial para a migração dos macrófagos.

Os dados deste trabalho contribuem para o conhecimento de como as micobactérias, geralmente potentes ativadoras dos macrófagos e por isso utilizadas como bons adjuvantes para a resposta imunológica, desenvolveram os mecanismos da supressão das atividades dos macrófagos, no caso das micobactérias patogênicas. A redução na ativação das MAPK, que leva a inibição da produção de TNF- α , e a indução da ativação das vias de sobrevivência, que inibem a morte dos macrófagos na etapa inicial da infecção permitindo a proliferação intracelular das micobactérias, contribuem para a inibição da apoptose e favorecem o acúmulo de fatores de virulência tóxicos, que provocam a necrose das células hospedeiras.

Quem se beneficiaria da morte dos macrófagos: as micobactérias ou o hospedeiro? No caso da apoptose, o seqüestro das micobactérias em corpos apoptóticos favorece a internalização destes pelos macrófagos frescos, ativados por IFN- γ , e pelas células dendríticas, que apresentam os antígenos micobacterianos para os linfócitos. Entretanto, no caso de imunodeficiência e redução no organismo da produção de IFN- γ , IL-12 e outras citocinas importantes, a apoptose dos macrófagos favorece a disseminação micobacteriana. Já a necrose dos macrófagos claramente é favorável às micobactérias, pois propiciam seu espalhamento rápido no hospedeiro. A apoptose tem sido sugerida como um pré-requisito para o *priming* de macrófagos e células dendríticas (Schaible *et al.*, 2003), mas Park e colaboradores argumentam que a morte celular por necrose poderia ser eficiente da mesma maneira para esse propósito (Park *et al.*, 2006). Além disso, a necrose das células por micobactérias virulentas de *M. tuberculosis* é um fator fundamental para a patogênese do processo da doença.



CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O tipo de morte dos macrófagos (MF) induzida por micobactérias depende da dose de infecção: baixa dose (MOI=1:1 a 10:1) de infecção induz apoptose, uma dose maior (MOI> 50:1) induz necrose dos macrófagos.
2. As micobactérias patogênicas (*M. tuberculosis* H37Rv) induzem a necrose dos MF em menor dose de infecção em comparação com micobactérias avirulentas (*M. tuberculosis* H37Ra e *M. bovis* BCG).
3. Não foi demonstrada diferença na indução da morte dos MF pelas diferentes cepas de *M. avium*.
4. A produção do TNF- α pelos MF infectados contribui na indução da morte dos MF de maneira autócrina.
5. As micobactérias virulentas induzem a morte necrótica dos MF.
6. A morte necrótica correlaciona-se com uma maior velocidade de proliferação (crescimento) intracelular das micobactérias virulentas em comparação com as avirulentas.
7. Na etapa inicial da infecção (até 24h), os MF são resistentes a indução da apoptose (por micobactéria e indutores padrão da apoptose), devido a ativação das vias de sobrevivência celular (via NF- κ B, e PI3K/Akt quinases). Posteriormente, o efeito protetor torna-se reduzido e a susceptibilidade à indução da morte aumenta.
8. Observou-se que uma menor produção de TNF- α pelas micobactérias virulentas está relacionada com a inibição da ativação das vias PI3K quinases, sem alteração da ativação e translocação do NF- κ B ao núcleo nos MF infectados.

9. A ativação de PI3K nos MF pelas micobactérias é mediada pelos receptores TLR2.

10. A ativação da via TLR2/PI3K é importante para a ativação funcional dos MF pelas micobactérias (produção do TNF- α e rearranjos citoesqueléticos pró-migratórios). A supressão da PI3K pelo inibidor farmacológico inibe estas funções nos MF.

11. Distintas vias de sinalização regulam a produção de TNF- α (via TLR2/ PI3K, MAPK/ NF- κ B) e rearranjos citoesqueléticos pró-migratórios (TLR2/ PI3K/ pequenas GTPases). As micobactérias patogênicas são capazes de alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias NF- κ B-dependentes, mas não alteram a sinalização para rearranjos citoesqueléticos.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adam DO & Hamilton TA (1984) The cell biology of macrophage activation. *Annual Review of Immunology*. 2: 283-318

Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, Suggett S, Devaux B, Radolf JD, Klimpel GR, Godowski P, Zychlinsky A (1999) Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. 285: 736-739

Arasteh KN, Cordes C, Ewers M, Simon V, Dietz E, Futh UM, Brockmeyer NH, L'Age P (2000) Human immunodeficiency virus-related nontuberculous mycobacterial infection: incidence, survival analysis and associated risk factors. *Eur. J. Med. Res.* 5: 424–430

Arbibe L, Mira JP, Teusch N, Kline L, Guha M, Mackma N, Godowski PJ, Ulevitch RJ, Knaus UG (2000) Toll-like receptor 2-mediated NF-kappa B activation requires a Rac1-dependent pathway. *Nat. Immunol.* 1: 533–540

Aronson T, Holtzman A, Glover N, Boian M, Froman S, Berlin OG, Hill H, Stelma Jr G (1999) Comparison of large restriction fragments of *Mycobacterium avium* isolates recovered from AIDS and non-AIDS patients with those of isolates from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 37: 1008–1012

Auger MJ & Ross JA (1992) The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JO, eds. *The Macrophage*. Oxford: Oxford University Press; 1992:1-57

Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Heimberg A, Karin M (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science*. 270: 286-90

Baeuerle PA and Henkel T (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 141-179

Balcewicz-Sablinska MK, Gan H, Remold HG (1999) Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *M. avium* attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. *J. Infect. Dis.* 180: 1230-7

Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG (1998) Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J. Immunol.* 161: 2636-2641

Barker LP, George KM, Falkow S, Small PL (1997) Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. *Infect Immun.* 65: 1497–1504

Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL (1993) Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect. Immun.* 61: 3482-89

Basu S & Kolesnick R (1998) Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene.* 17: 3277-3285

Beg AA & Baltimore D (1996) An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science.* 274: 782-784

Beltan E, Horgen L, Rastogi N (2000) Secretion of cytokines by human macrophages upon infection by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Microb Pathog.* 28: 313–318

Bermudez LE & Sangari FJ (2000) Mycobacterial invasion of epithelial cells. *Subcell. Biochem.* 33: 231–249

Blom WM (2000) Cell death in rat hepatocytes. Apoptosis-inducing and -protective mechanisms. *Artiklar Fran Eurotox Newsletter.* 23-1

Bloom BR, Mazzacaro RJ, Flynn J, Chan J, Sousa A, Salgame P, Stenger S, Modlin RL, Krensky A, Demant P, Kramni I (1999) Immunology of an infectious disease: pathogenesis and protection in tuberculosis. *The Immunologist.* 7: 54-59

Bodmer T, Miltner E, Bermudez LE (2000) *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. *FEMS Microbiol. Lett.* 182: 45–49

Boletim Informativo TB 2005 RJ - PCT/RJ/2005

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 2^a. ed., Rio de Janeiro, 1994, 115p

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema nacional de vigilância em saúde : relatório de situação : Rio de Janeiro / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde.– 2. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 24 p. : il. color. – (Série C. Projetos, Programas e Relatórios)

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248-254

Brooks RW, George KL, Parker BC, Falkinham 3rd JO, Gruff H (1984) Recovery and survival of nontuberculous mycobacteria under various growth and decontamination conditions. *Can. J. Microbiol.* 30: 1112–1117

Brown A, Linhoff M, Stein B, Wright K, Baldwin A, Basta P, Ting J (1994) Function of NF- κ B/Rel binding sites in the major histocompatibility complex class II invariant chain promoter is dependent on cell-specific binding of different NF- κ B/Rel subunits. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2926-2935

Buckley S, Driscoll B, Barsky L, Weinberg K, Anderson K, Warburton D (1999) ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am.J.Physiol.* 277: 159-166

Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL (1998) Heat shock protein 72 modulates pathways of stress- induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 27: 17147-17153

Cangelosi GA, Palermo CO, Laurent JP, Hamlin AM, Brabant WH (1999) Colony morphotypes on Congo red agar segregate along species and drug susceptibility lines in the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Microbiology* 145: 1317–1324

Caron E (2003) Rac signalling: a radical view. *Nat. Cell Biol.* 5: 185 - 187

Castonguay A, Rioux N, Duperron C, Jalbert G (1998) Inhibition of lung tumorigenesis by NSAIDs: a working hypothesis. *Exp.Lung Res.* 24: 605-615

Chang CT, Wang LY, Liao CY, Huang SP (2002) Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3159–3161

Chen M, Gan H, Remold HG (2006) A Mechanism of Virulence: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. *J. Immunol.* 176: 3707–3716

Cheresh DA, Leng J, Klemke RL (1999) Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* 146: 1107–1116

Chuang TH, Ulevitch RJ (2000) Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur. Cytokine Netw.* 11: 372-378

Clemens DL & Horwitz MA (1996) The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferring. *Journal of Experimental Medicine.* 184: 1349-1355

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 26: 1-16

Cohen JJ (1993) Overview: mechanisms of apoptosis. *Immunology Today.* 14: 126-130

Cooper AM, Appelberg R, Orme IM (1998) Immunopathogenesis of *Mycobacterium avium* infection. *Front. Biosci.* 3: 141–148

Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma Jr GN (1999) Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2492–2496

Cox D, Tseng CC, Bjekic G, Greenberg S (1999) A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. *J. Biol. Chem.* 274: 1240–1247

Crocker PR & Milon G (1992) Macrophages in the control of hematopoiesis. In: Lewis CE, McGee JOD, eds. *The natural immune system. The macrophage.* Oxford: IRL Press; 115-156

Dale JW (1995) Mobile genetic elements in mycobacteria. *Eur Respir J. Suppl.* 20: 633s–648s

Darieva ZA, Lassunskaja EB, Kipnis TL, Silva WD (2000) Two BCG vaccine formulations prepared from the same strain with different J774 macrophage activation capacities and patterns of NF- κ B activation. *Int. J.Molec.Med.* 6: 575-580

Darieva ZA, Lasunskaja EB, Kipnis TL, Silva WD (2001) BCG-infected macrophage activation depends on MEK1/ERK and PI3-K signaling cascades. *Abstr. XI Int. Congr. Immunol* p1926

de Villiers WJ, Smith JD, Miyata M, Dansky HM, Darley E, Gordon S (1998) Macrophage phenotype in mice deficient in both macrophage-colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18: 631-640

Doherty TM & Arditi M (2004) TB, or not TB: that is the question — does TLR signaling hold the answer? *J. Clin. Invest.* 114: 1699–1703

Du X, Poltorak A, Wei Y, Beutler B (2000) Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.* 11: 362-371

Duan L, Gan H, Golan DE, Remold HG (2002) Critical role of mitochondrial damage in determining outcome of macrophage infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 169: 5181–5187

Dubnau E, Chan J, Raynaud C, Mohan VP, Laneelle MA, Yu K, Quemard A, Smith I, Daffe M (2000) Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Mol. Microbiol.* 36, 630–637

Dunn PL & North RJ (1995) Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect. Immun.* 63: 3428–3437

Eaton T, Falkinham 3rd JO, von Reyn CF (1995) Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J. Clin. Microbiol.* 33: 2757–2758

Euzeby JP (2002) List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 590-592

Falcone V, Bassey EB, Toniolo A, Conaldi PG, Collins FM (1994) Differential release of tumor necrosis factor-alpha from murine peritoneal macrophages stimulated with virulent and avirulent species of mycobacteria. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 8: 225–232

Falkinham 3rd JO, Norton CD, LeChevallier MW (2001) Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1225–1231

Fan T, Lu H, Hu H, Shi L, McClarty GA, Nance DM, *et al.* (1998) Inhibition of apoptosis in Chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. *J Exp Med.* 187: 487-496

Fang FC & Vazquez-Torres A (2002) Nitric oxide production by human macrophages: there's NO doubt about it. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 282: L941-943

Fine PEM, Carneiro IAM, Milstien JB, Clements CJ (1999) Issues relating to the use of BCG in immunization programmes - A discussion document. WHO, Geneva - *WHO/V&B/99.23*

Flynn JAL & Chan J (2001) Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 19: 93-129

Fratuzzi C, Arbeit RD, Carini C, Remold HG (1997) Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. *J. Immunol.* 158: 4320–4327

Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V (2001) Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J. Cell Biol.* 154: 631–644

Gao LY & Kwai YA (2000a) Hijacking of apoptotic pathways by bacterial pathogens. *Microbes and Infection*. 2: 1705-1719

Gao LY & Kwai YA (2000b) The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trend.Microb.* 8: 306-313

Gay NJ & Keith FJ (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature*. 30:355-6

George KL & Falkinham 3rd JO (1986) Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium-intracellulare* and *M. scrofulaceum*. *Can. J. Microbiol.* 32: 10–14

Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF- κ B and rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 225-260

Glickman MS, Cox JS, Jacobs Jr. WR (2000) A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell* 5: 717–727

Goodfellow M & Magee JG (1998) Taxonomy Of Mycobacteria. In: Gangadharam, P.R.J. & Jenkins P.A. – Mycobacteria: I Basic aspects. USA. Chapman & Hall,. p. 1-71

Goslee S & Wolinsky E (1976) Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. *Am. Rev. Respir. Dis.* 113: 287–292

Green DR & Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305: 626–629

Grilli M, Chiu JJS, Lenardo M (1993) NF- κ B and rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int. Rev. Cytol.* 143: 1-62

Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR (2004) Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 51: 359–370

Hall-Stoodley L & Lappin-Scott H (1998) Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species. *Mycobacterium fortuitum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 77–84

Hansen SK, Bacuerle PA, Blasi F (1994) Purification, reconstitution and I κ B association of the c-Rel-p64 (RelA) complex, a strong activator of transcription. *Mol. Cell. Biol.* 14: 2593-2603

Henson PM, Bratton DL, Fadok VA (2001) Apoptotic cell removal. *Curr Biol.* 11: 795-805

Hestvik ALK, Hmama Z, Av-Gay Y (2005) Mycobacterial manipulation of the host cell. *FEMS Microbiology Reviews.* 29: 1041- 1050

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willins ST (1994) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 5 ed. U.S.A., Williams & Wilkins. p. 597-603

Hopkinson-Woolley J, Hughes D, Gordon S, Martin P (1994) Macrophage recruitment during limb development and wound healing in the embryonic and fetal mouse. *J Cell Sci.* 107: 1159-1167

Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, Morin PM, Marks CB, Padiyar J, Goulding C, Gingery M, Eisenberg D, Russell RG, Derrick SC, Collins FM, Morris

SL, King CH, Jacobs Jr. WR (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 12420–12425

http://kugi.kribb.re.kr/KUGI/Pathways/BioCarta/h_cdc42racPathway/ - Acesso: 12/06/07

http://icb.usp.br/~bmm/materiais/bmm250_diurno2003.doc - Acesso: 10/03/05

[Iimuro Y, Nishiura T, Hellerbrand C, Behrns KE, Schoonhoven R, Grisham JW, Brenner DA](#) (1998) NFkappaB prevents apoptosis and liver dysfunction during liver regeneration. *J Clin Invest.* 101(4): 802–811

Karakousis PC, Bishai WR, Dorman SE (2004) *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the host immune response. *Cellular Microbiology.* 6: 105–116

Karin M (1999) The beginning of the end: IκB kinase (IKK) and NF-κB activation. *J. Bio. Chem.* 274: 27339-27342

Kaufmann SHE & Andersen P (1998) Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. *Chem Immunol. Basel, Karger.* 70: 21-59

Kaufmann SHE (2006) Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nature Reviews Immunology,* 6: 699 -704

Kaufmann SHE & Earnshaw WC (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp. Cell Res.* 256: 42-49

Kaufmann SHE (1999) Killing vs suicide in antibacterial defense. *Trends in Microbiology.* 7: 59-61

Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, Kornfeld H (1997) Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect. Immun.* 65: 298-304

- Keane J, Remold HG, Kornfeld H (2000) Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J. Immunol.* 164: 2016–2020
- Khelef N, Zychlinsky A, Guiso N (1995) *Bordetella pertussis* induces apoptosis in macrophages: role of adenylate cyclase-hemolysin. *Infect. Immun.* 61: 4064–4070
- Kirby C, Waring A, Griffin TJ, Falkinham 3rd JO, Grindley ND, Derbyshire KM (2002) Cryptic plasmids of *Mycobacterium avium*: Tn552 to the rescue. *Mol. Microbiol.* 43: 173–186
- Kirschner RA, Parker BC, Falkinham 3rd JO (1999) Humic and fulvic acids stimulate the growth of *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 327–332
- Kirschner RA Jr, Parker BC, Falkinham 3rd JO (1992) Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown-water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:271–275
- Kopp E & Ghosh S (1995) NF- κ B and rel proteins in innate immunity. *Adv. Immunol.* 58: 1-27
- Koul A, Herget T, Klebl B, Ullrich A (2004) Interplay between *Mycobacteria* and host signalling pathways. *Nature Reviews Microbiology.* 2: 189-202
- Kremer L, Estaquier J, Brandt E, Ameisen JC, Locht C (1997) *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur. J. Immunol.* 27: 2450-2456
- Kubalek I & Mysak J (1996) The prevalence of environmental mycobacteria in drinking water supply systems in a demarcated region in Czech Republic, in the period 1984–1989. *Eur. J. Epidemiol.* 12: 471–474

Kumar S (1999) Regulation of caspases activation in apoptosis: implications in pathogenesis and treatment of disease. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology*. 26: 295-303

Kummer JL, Rao PK, Heidenreich KA (1997) Apoptosis induced by withdrawal of trophic factors is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 272: 20490-20494

Laemmli UK (1970) Cleavage of proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685

Laochumroonvorapong P, Paul S, Elkon KB, Kaplan G (1996) H₂O₂ induces monocyte apoptosis and reduces viability of *Mycobacterium avium- M.intracellulare* within cultured human monocytes. *Infect. Immun.* 64: 452-459

Laukkanen H, Soini H, Kontunen-Soppela S, Hohtola A, Viljanen M (2000) A mycobacterium isolated from tissue cultures of mature *Pinus sylvestris* interferes with growth of Scots pine seedlings. *Tree Physiol.* 20: 915–920

Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V (2002a) Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1025–1032

Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V (2002b) Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5318–5325

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 86: 973-983

Leppa S. & Bohmann D (1999) Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response to apoptosis. *Oncogene*. 18: 6158-6162

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR (2003) Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J. Infect. Dis.* 187: 117–123

Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74: 49-139

Lichanska AM & Hume DA (2000) Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol.* 28: 601-611

Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LAJ (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 446-458

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD (2007) MAPK phosphatases – regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 202-212

MacFarlane M & Williams AC (2004) Apoptosis and disease: a life or death decision *Conference and Workshop on Apoptosis and Disease EMBO reports.* 5: 674–678

Manfredi AA, Heltai S, Rovere P, Sciorati C, Paolucci C, Gelati G, Rugarli C, Vaiani R, Clementi E, Ferrarini M (1998) *Mycobacterium tuberculosis* exploits the CD95/CD95 ligand system of gamma delta T cells to cause apoptosis. *Eur. J. Immunol.* 28: 1798-1806

Mantovani A (2006) Macrophage diversity and polarization: in vivo veritas. *Blood.* 108: 408-409

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *TRENDS in Immunology.* 25: 677-86

Martín C (2005) The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur Respir J.* 26: 162–167

Manual Merck – Disponível em: <http://www.manualmerck.net> – Seção 17/ Capítulo 181 – Acesso: 7 de fevereiro de 2006

McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs Jr WR, Russell DG (2000) Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* 406: 735–738

Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway Jr CA (1997) A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 388: 394-397

Milella M, Estrov Z, Kornblau SM, Carter BZ, Konopleva M, Tari A, Schober WD, Harris D, Leysath CE, Lopez-Berestein G, Huang Z, Andreeff M (2002) Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 99: 3461 - 3464

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

Moore KJ & Matlashewski G (1994) Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J. Immunol.* 152: 2930–2937

Moore WEC, Cato EP, Moore LVH (1985) Index of the bacterial and yeast nomenclatural changes published in the International Journal of Systematic Bacteriology since the 1980 approved lists of bacterial names (1 January 1980 to 1 January 1985). *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: 382-405

Morrisette N, Gold E, Aderem A (1999) The macrophage--a cell for all seasons. *Trends Cell Biol.* 9:199-201

Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B (1997) Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 17: 5317-27

Nyka W (1974) Studies on the effect of starvation on mycobacteria. *Infect.Immun.* 9: 843–850

Opdenakker G & Van Damme J (1992) Cytokines and proteases in invasive processes: molecular similarities between inflammation and cancer. *Cytokine.* 4: 251-258

Park JS, Tamayo MH, Gonzalez-Juarrero M, Orme IM, Ordway DJ (2006) Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 79: 80–86

Picardeau M, Vincent V (1998) Mycobacterial linear plasmids have an invertron-like structure related to other linear replicons in actinomycetes. *Microbiology* 144: 1981–1988

Placido R, Mancino G, Amendola A, Mariani F, Vendetti S, Piacentini M, Sanduzzi A, Bocchino ML, Zembala M, Colizzi V (1997) Apoptosis of human monocytes/macrophages in *M. tuberculosis* infection. *J. Path.* 181: 31-38

Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology* 46: 709–717

Rathmell JC & Thompson CB (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 781-828

Raftopoulou M & Hall A (2004) Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Developmental Biology.* 265: 23– 32

Ray A & Prefontaine KE (1994) Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcription factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 752-56

Reddy VM (1998) Mechanism of *Mycobacterium avium* complex pathogenesis. *Front. Biosci.* 3: 525–531

Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 302: 1704-1709

Riley LW (2006) Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 116:1475–1478

Riendeau CJ & Kornfeld H (2003) THP-1 Cell Apoptosis in Response to Mycobacterial Infection. *Infect. Immun.* 71: 254–259

Riley LW (2006) Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis *J. Clin. Invest.* 116: 1475–1478

Rojas M, Barrera LF, Garcia LF (1998) Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent. *Biochem. Bioph. Res Comm.* 247: 436-442

Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF (1999) TNF and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol.* 162: 6122-6131

Romashkova JA & Makarov SS (1999) NF-kappa B is a target for AKT in anti-apoptotic PDGF signaling. *Nature.* 401: 86-90

Rommel C, Camps M, Ji H (2007) PI3K δ and PI3K γ : partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat. Rev. Immunol.* 7: 191-201

Russell DG (2001) *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 569–577

Sadahira Y & Mori M (1999) Role of the macrophage in erythropoiesis. *Pathol Int.* 49: 841-848

Sangari FJ, Goodman J, Bermudez LE (2000) *Mycobacterium avium* enters intestinal epithelial cells through the apical membrane, but not by the basolateral surface, activates small GTPase Rho and, once within epithelial cells, expresses an invasive phenotype. *Cell. Microbiol.* 2: 561–568

Sangari FJ, Goodman J, Petrofsky M, Kolonoski P, Bermudez LE (2001) *Mycobacterium avium* invades the intestinal mucosa primarily by interacting with enterocytes. *Infect. Immun.* 69: 1515–1520

Santucci MB, Amicosante M, Cicconi R, Montesano C, Casarini M, Giosuè S, Bisetti A, Colizzi V, Fraziano M (2000) *Mycobacterium tuberculosis*–induced apoptosis in monocytes/ macrophages: early modifications and intracellular mycobacterial viability. *J Infect Dis* 181: 1506-1509

Savill J (1996) Phagocyte recognition of apoptosis cells. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 1065-1069

Schaible UE, Strugill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG (1998) Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium* containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol.* 160: 1290–1296

Schaible UE, Winau F, Sieling PA, Fischer K, Collins HL, Hagens K, Modlin RL, Brinkmann V, Kaufmann SHE (2003) Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. *Nat. Med.* 9: 1039–1046

Scheinman RI, Cogswell PC, Lofuist AK, Baldwin AS (1994) Role of transcriptional activation of I κ B in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 270: 283-86

Schulze-Robbecke R & Buchholtz K (1992) Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1869–1873

Sen R, Baltimore D (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell.* 46: 705-16

Shapiro S, Campbell E, Senior R, Welgus H (1991) Proteinases secreted by human mononuclear phagocytes. *J.Rheumatol. Suppl.* 27: 95-98

Silver RF, Li Q, Ellner JJ (1998) Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor α but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun.* 66: 1190–1199

Sirakova TD, Fitzmaurice AM, Kolattukudy P (2002) Regulation of expression of *mas* and *fadD28*, two genes involved in production of dimycocerosyl phthiocerol, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 184: 6796–6802

Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, McMaster WR (2003) Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J. Immunol.*, 170: 430-437

Smeulders MJ, Keer J, Speight RA, Williams HD (1999) Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.* 181: 270–283

Smith I (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 463–496

SOM 208 Microbiology Syllabus The Mycobacteria (http://www.ratsteachmicro.com/Mycobacteria_notes/HCOE_CAI_Review_Notes_Mycobacteria.htm) Acesso: 20 de janeiro de 2007

Stein RC & Waterfield MD (2000) PI3-kinase inhibition: a target for drug development? *Molecular Medicine Today.* 6: 347-357

Stokes RW & Doxsee D (1999) The receptor mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. *Cell Immunol.* 197: 1–9

Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG (1996) *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 15: 6960–6968

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG (1994) Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263: 678–681

Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J *et al.* (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A* 101: 3516-3521

Tauber AI & Chernyak L (1991) Metchnikoff and the origins of immunology: from metaphor to theory. Monographs on the history and philosophy of biology. New York: Oxford University Press

Taylor RH, Falkinham 3rd JO, Norton CD, LeChevallier MW (2000) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1702–1705

Thorel MF, Huchzermeyer HF, Michel AL (2001) *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Rev. Sci. Tech.* 20: 204–218

Tortoli E, Bartoloni A, Bottger EC, Emler S, Garzelli C, Magliano E, Mantella A, Rastogi N, Rindi L, Scarparo C, Urbano P (2001) Burden of unidentifiable mycobacteria in a reference laboratory. *J. Clin. Microbiol.* 39: 4058–4065

Tripp CS, Beckerman KP, Unanue EP (1995) Immune complexes inhibits antimicrobial responses through IL-10 production. *J. Clin. Invest.* 95: 1628–1634

Unanue ER & Allen PM (1986) Biochemistry and biology of antigen presentation by macrophages. *Cell Immunol.* 99: 3-6

Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A (1999) Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med.* 190: 1909-1914

van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM (2002) Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 294–309

van Furth R, Cohn Z, Hirsh J, Humprey J, Spector W, Langevoort H (1972) The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursors. *Bull. WHO* 46: 845-852

Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995) Rel/ NF- κ B/ I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes.* 9: 2723-2735

Via LE, Fratti RA, McFalone M, Paga'n-Ramos E, Deretic D, Deretic V (1998) Effects of cytokines in mycobacterial phagosome maturation. *J. Cell Sci.* 111: 897–905

von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR, Ristola MA, Waddell RD, Tvaroha SM, Samore M, Hirschhorn LR, Lumio J, Lein D, Grove MR (2002) Sources of disseminated *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *J. Infect.* 44: 166–170

von Reyn CF, Maslow JN, Barber TW, Falkinham 3rd JO, Arbeit RD (1994) Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343: 1137–1141

Wang CY, Cusack JC Jr, Liu R, Baldwin AS Jr (1999) Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med.* 5(4):412-417

Wang CY, Mayo MW, Baldwin Jr AS (1996) TNF- α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science.* 274: 784-7

WHO Report 2007 - Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2007.376)

Wilson K (1997) Wound healing: the role of macrophages. *Nurs Crit Care.* 2: 291-296

Wren BW, Stabler RA, Das SS, Butcher PD, Mangan JA, Clarke JD, Casali N, Parish T, Stoker NG (1998) Characterization of a haemolysin from *Mycobacterium tuberculosis* with homology to a virulence factor of *Serpulina hyodysenteriae*. *Microbiology*. 144: 1205–1211

Wright EL, Zywno-van Ginkel S, Rastogi N, Barrow WW (1996) Monoclonal infection involving *Mycobacterium avium* presenting with three distinct colony morphotypes. *J. Clin. Microbiol.* 34:2475–2478

Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, López-Soriano F, Argilés JM, Bogdan C, Celada A (2000) LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF- α . *Blood*. 95: 3823-3831

Xia ZG, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of Erk and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 27: 1326-1331

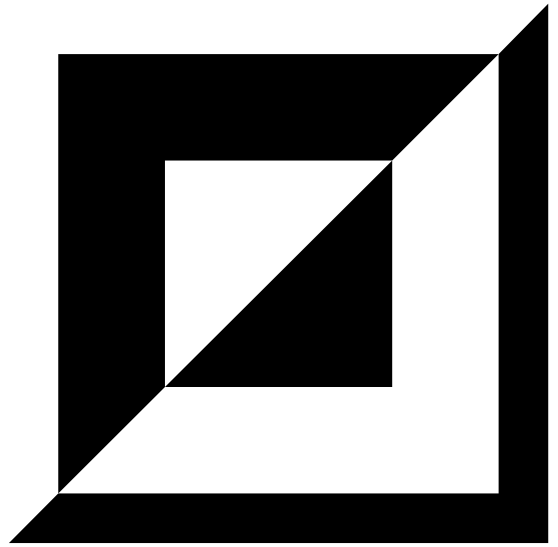
Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K *et al* (2003) Role of adapter TRIF in the MyD88-independent Toll-like receptor signaling pathway. *Science*. 301: 640-643

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T *et al.* (2002) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*. 420: 324-329

Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2003) TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 4: 1144-1150

Yoder S, Argueta C, Holtzman A, Aronson T, Berlin OG, Tomasek P, Glover N, Froman S, Stelma Jr G (1999) PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2650–2653

Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ (1992) *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature*. 358:167–169



ANEXOS →



A pedidos.... :)

Uma lembrança de quando eu tinha 4 anos...
Minha mãe guardou este desenho, feito em papel de pão...
Quem sabe prevendo o futuro de sua filha....

Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling

Elena B. Lasunskaja,^{*,1} Mariana N. N. Campos,^{*} Marcelle R. M. de Andrade,^{*} Renato A. DaMatta,[†] Thereza L. Kipnis,^{*} Marcelo Einicker-Lamas,[‡] and Wilmar D. Da Silva^{*}

^{*}Laboratório de Biologia do Reconhecer, [†]Laboratório de Biologia Celular e Tecidual, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil; and [‡]Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Laboratório de Físico-Química Biológica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract: Macrophage migration and adhesion are important for the control of mycobacterial infection and are critically dependent on the reorganization of the cytoskeleton. Mycobacteria elicit rapid morphological changes, such as cell spreading, a process relevant to in vivo changes of macrophage shape during extravasation and migration. In this study, we investigated the BCG mycobacteria-induced signaling events leading to macrophage cytoskeletal rearrangements employing specific pharmacological inhibitors to suppress distinct kinase pathways known to be elicited by infection. Viable or lysed mycobacteria, as well as purified cell wall lipoprotein p19, TLR2 agonist, induced RAW264.7 cells to extend actin-rich pseudopods, which impart radial spreading within 3 h, leading later to persistent cell polarization. BCG induced rapid activation of phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K, activation that was recruited to the activated TLR2 receptor. TLR2-neutralizing antibody inhibited macrophage spreading and PI3K activation induced by p19. Additionally, BCG induced spreading and polarization of bone marrow-derived macrophages from TLR2-expressing mice in contrast to their TLR2-knockout counterparts. Neither MEK1/ERK, p38 MAPK, nor NF- κ B activation were important for the early cytoskeletal rearrangements observed, although suppression of these pathways is known to inhibit chemokine secretion by activated macrophages. B2-integrins blockade with a corresponding antibody inhibited macrophage spreading and polarization but had no effect on pseudopodia protrusions demonstrating the downstream position of integrin-mediated adhesion in PI3K-dependent signaling pathway leading to the motility phenotype. The obtained data demonstrate that the direct effect of mycobacteria on macrophage shape might be mediated through TLR2-dependent PI3K activation. *J. Leukoc. Biol.* 80: 1480–1490; 2006.

Key words: BCG · RAW264.7 macrophages · signal transduction

INTRODUCTION

Viable mycobacteria and mycobacterial components are potent activators of macrophages (MF), able to provoke production of proinflammatory mediators that are indispensable for innate defense and induction of acquired immune response against mycobacteria. Besides inducing proinflammatory gene transcription, mycobacteria also elicit rapid morphological changes, such as cell spreading [1], the process relevant to in vivo morphologic changes of MF during extravasation, migration, and differentiation. Signaling events leading to proinflammatory gene transcription induced by mycobacteria were well elucidated [2, 3], establishing the fundamental role of NF- κ B, MAPK, and class I PI3K pathways rapidly activated after binding of mycobacterial agonists with macrophage Toll-like receptors, mainly TLR2. Locomotor morphological changes in response to mycobacteria have not been characterized in detail nor have the signaling events leading to MF spreading and adhesion. The actin cytoskeleton is a primary determinant of cell shape and motility. Reorganization of the actin cytoskeleton is an early cellular response to a variety of extracellular signals. Dissection of pathways leading to actin rearrangement induced by a variety of extracellular factors has focused largely on those initiated by tyrosine kinase receptors for growth factors, integrins, and G protein-coupled receptors for chemokines [4], whereas the role of TLRs is only beginning to be noticed. Recently, TLR-mediated actin remodeling was demonstrated to enhance antigen capture by dendritic cells [5]. Additionally, CD14-dependent TLR2 activation by mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) was proven to promote phagocytosis of bacillus Calmette-Guérin (BCG) mycobacteria by MF [6]. Whether TLRs are involved in mycobacteria-induced MF spreading and motility has not been well elucidated. To study morphological changes induced in MF with mycobacteria, we treated RAW 264.7 MF with either viable BCG, BCG whole cell lysate (BCG-WCL), or with purified mycobacterial cell wall lipoprotein p19, a known TLR2 agonist [7], and demon-

¹ Correspondence: LBR, CBB, UENF, Av. Alberto Lamego, 2000 Campos/RJ, Rio de Janeiro 28013-600, Brazil. E-mail: elena@uenf.br

Received January 27, 2006; revised August 20, 2006; accepted August 22, 2006

doi: 10.1189/jlb.0106066

Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and c-Jun-N-terminal kinase cascades enhances NF- κ B-dependent gene transcription in BCG-stimulated macrophages through promotion of p65/p300 binding

Zoulfia Darieva, Elena B. Lasunskaja,¹ Mariana N. N. Campos, Thereza L. Kipnis, and Wilmar D. da Silva

Laboratório de Biologia do Reconhecer, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract: The proinflammatory response of infected macrophages is an important early host defense mechanism against mycobacterial infection. Mycobacteria have been demonstrated to induce proinflammatory gene transcription through the Toll-like receptors, (TLR)2 and TLR 4, which initiate signaling cascades leading to nuclear factor (NF)- κ B activation. The main transduction pathway responsible for NF- κ B activation has been established and involves the MyD88, interleukin-1 receptor-associated kinase, tumor necrosis factor receptor-associated factor-6, NF- κ B-inducing kinase, and inhibitor of κ B kinase complex. The role of other kinase cascades triggered by mycobacteria in the NF- κ B activation is less clear. We herein examine the role of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI-3K) cascades in the expression of the bacillus Calmette-Guérin (BCG) mycobacteria-induced NF- κ B-dependent genes, macrophage-inflammatory protein-2 (MIP-2) and inducible nitric oxide (NO) synthase. Specific pharmacological inhibition of the PI-3K, c-jun-N-terminal kinase (JNK), and to a smaller extent, p38 MAPK but not extracellular-regulated kinase (ERK), suppressed NF- κ B-dependent reporter gene transcription and MIP-2 and NO secretion in BCG-induced RAW264.7 macrophages. A similar effect was obtained following molecular inhibition of JNK via JNK-interacting protein-1 overexpression. In addition, a kinase-dead mutant of MEK kinase-1, the up-stream regulator of JNK, also proved to be a potent inhibitor of NF- κ B-reporter activity. The effect of inhibitors was mediated by the down-regulation of NF- κ B transcription activity and without effecting its nuclear translocation. These data suggest an indirect mechanism of the NF- κ B regulation by these kinases, probably through p65 phosphorylation and improved binding to the p300 transcription coactivator. The data obtained demonstrate that PI-3K, JNK, and p38 MAPK activation by mycobacteria enhance NF- κ B-driven gene expression con-

tributing to the proinflammatory macrophage response. *J. Leukoc. Biol.* 75: 689–697; 2004.

Key Words: RAW264.7 cells · MIP-2 · iNOS · signal transduction

INTRODUCTION

Mycobacteria cause intensive inflammation in infected organisms, mediated by rapid macrophage activation, proinflammatory gene transcription, and subsequent production of a variety of cytokines, chemokines, adhesion molecules, and short-lived, free radicals, including nitric oxide (NO). Transcription of most of proinflammatory genes, including macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2)/CXC chemokine ligand (CXCL)2, and inducible NO synthase (iNOS), is nuclear factor- κ B (NF- κ B)-dependent. The MIP-2 promoter contains two κ B sequence motifs and one NF-interleukin (IL)-6-binding site [1]. The iNOS murine promoter enhancer region, in addition to two NF- κ B consensus sites, contains NF-IL-6 and interferon regulator factor-1 response elements [2], and a crucial role of the NF- κ B in MIP-2 [3] and NO [4] production by murine macrophages is well documented.

The main signaling pathway leading to NF- κ B activation by mycobacteria has been established. The mycobacterial lipoproteins, lipoarabinomannan and peptidoglycan, trigger signal transduction through mammalian Toll-like receptor (TLR)2, cytosolic adaptor protein MyD88, kinases of the IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) family, tumor necrosis factor receptor-associated factor-6 (TRAF6), and NF- κ B-inducing kinase (NIK). Activation of the inhibitor of κ B (I κ B) kinase (IKK) complex (IKK α and IKK β) by NIK causes phosphorylation of the I κ Bs, targeting them for ubiquitylation and degradation by the proteasome that liberates NF- κ B/Rel (p65/p50) dimers for

¹ Correspondence: Laboratório de Biologia do Reconhecer, CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, Campos/RJ, 28013-600 Brazil. E-mail: elena@uenf.br

Received June 18, 2003; revised December 2, 2003; accepted December 12, 2003; doi: 10.1189/jlb.0603280.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)