

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

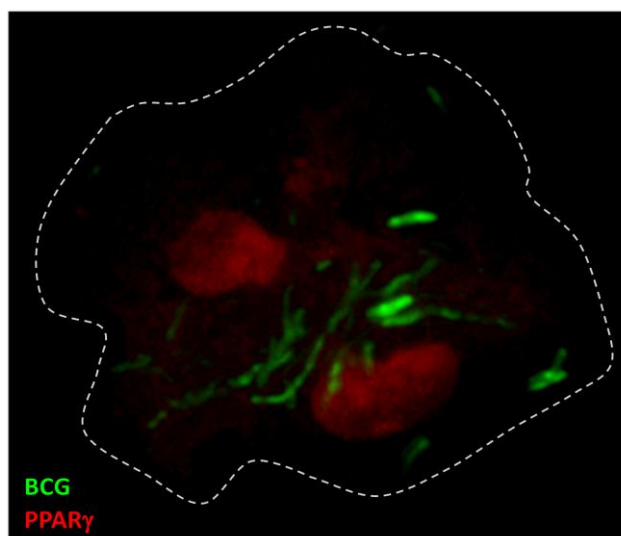
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Estudo da participação do receptor nuclear PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG.

Patrícia Elaine de Almeida



**Orientador (es): Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva**

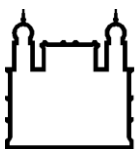
RIO DE JANEIRO

Março, 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

PATRÍCIA ELAINE DE ALMEIDA

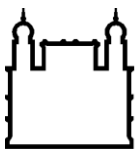
Estudo da participação do receptor nuclear PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG.

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

Orientador (es): Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva

RIO DE JANEIRO

Março, 2009



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Patrícia Elaine de Almeida

Estudo da participação do receptor nuclear PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG.

ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza
Prof. Dra. Adriana Ribeiro Silva

Aprovada em: 31/03/2009

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Ozório Moraes (Presidente)
Prof. Dra. Jacqueline Alvarez Leite
Prof. Dr. José Roberto Lapa e Silva
Prof. Dra. Christianne Bandeira-Melo (revisor e suplente)
Prof. Dra. Cecília J. G. Almeida (suplente)

Rio de Janeiro, 31 de março de 2009

Ao Leonardo, obrigada por seu amor, sua compreensão, pelas palavras de incentivo e por estar sempre ao meu lado compartilhando os sonhos e desafios.

Agradecimentos

À Dra. Patrícia Bozza, pelo exemplo de ética e dedicação, pelo apoio incondicional proporcionando meu crescimento pessoal e profissional e por todo o incentivo no desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Adriana Ribeiro e a Dra. Clarissa Maya-Monteiro pelas discussões, idéias e palavras de motivação na difícil caminhada.

Ao Dr. Hugo Caire Castro-Faria-Neto, por ter me recebido no seu laboratório com carinho e pela disposição para ajudar sempre.

Ao Leonardo, pelo carinho, companheirismo por sua paciência nos momentos de desânimo, principalmente nas segundas-feiras que era difícil levantar de madrugada para viajar pro Rio, e por seu amor.

Aos meus pais, minha irmã e meu irmão, pelo exemplo de respeito, e a toda a minha família por me ajudarem a alcançar mais esta conquista.

Aos meus queridos avós, Maria (*saudade*) e Luis (*saudade*), que acompanharam o início desta jornada, pelo exemplo de vida, companheirismo e dedicação a família.

Às amigas que o trabalho me proporcionou Helô, Rachel, Dri, Kelly, Surrage, Zanon e Dani pelo incentivo, conselhos, conversas, principalmente na hora do almoço, às vezes rápido, mas um momento que tornava os dias mais alegres.

A todos do Laboratório de Imunofarmacologia, felizmente são muitos os nomes, para escrever neste pequeno espaço. Meus amigos, obrigada pela agradável convivência pelos momentos de descontração e amizade. Pela companhia e histórias dos congressos, sempre uma aventura.

A secretária e amiga Rose, por sua dedicação e por estar sempre pronta a ajudar tanto nos assuntos profissionais quanto pessoais, pelos momentos do cafezinho, um alívio nos dias de correria.

Ao pessoal do biotério do departamento de fisiologia e farmacodinâmica, pelo cuidado e dedicação no manejo com os animais.

A todos do departamento de fisiologia e farmacodinâmica, pelo suporte técnico na preparação e disponibilização de materiais. Por proporcionar meu crescimento científico nas discussões de seminários e reuniões, e pelo agradável convívio diário.

A Dani pela amizade, e por entender o que é viver com a mochila nas costas,

pela hospedagem e pela inesquecível companhia na viagem pela Alemanha e pela República Tcheca, e a gente continua com a mochila nas costas...

À Vivi e Sara pela companhia, pelas conversas até pegarmos no sono, embaladas pela “música da Gaúcha”, pelo incentivo, e claro, pelos “brigadeiros” um companheiro nas horas de ansiedade.

A Deus pela vida, pela família e pelos amigos.

Às agências de fomento CNPq, FAPERJ, PAPES-FIOCRZ.

SUMÁRIO

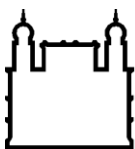
Resumo	xi
Abstract	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
1) Introdução	1
1.1) Tuberculose.....	2
1.1.1) Características e considerações gerais	2
1.1.2) Mecanismos fisiopatológicos da infecção.....	4
1.2) Receptores envolvidos no reconhecimento de micobactérias e componentes da parede celular micobacteriana.....	7
1.2.1) Receptores “Toll Like” (TLR), seus co-receptores e as associações heterotípicas	7
1.2.2) Papel do CD14 no reconhecimento micobacteriano	12
1.2.3) CD36: um receptor “scavenger” envolvido na fagocitose, inflamação e metabolismo lipídico.....	13
1.2.4) Dectina-1, um receptor para micobactérias.....	16
1.3) Mecanismos de sobrevivência de micobactérias em fagócitos mononucleares.....	19
1.4) Corpúsculos Lipídicos.....	22
1.4.1) Características gerais.....	22
1.4.2) Composição e funções dos corpúsculos lipídicos.....	24
1.4.3) Biogênese dos corpúsculos lipídicos.....	26
1.4.3.1) Biogênese organelar dos corpúsculos lipídicos.....	26
1.4.3.2) Biogênese de corpúsculos lipídicos por agonistas Lipídicos.....	28
1.4.3.2) Biogênese de corpúsculos lipídicos por agonistas proteicos.....	29
1.4.3.3) Receptores da imunidade inata envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos por estímulos infecciosos.....	30
1.5) Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PPARs).....	34
1.5.1) PPARs características gerais e sinalização intracelular.....	34
1.5.2) PPAR γ e metabolismo lipídico.....	39
1.5.3) Participação do PPAR γ na resposta inflamatória e infecção.....	40

2) Objetivo e Metas	44
2.1) Objetivo Geral.....	45
2.2) Objetivos Específicos.....	45
3) Material e Métodos	46
3.1) Animais.....	47
3.2) Estímulos micobacterianos.....	47
3.3) Pleurisia induzida por BCG.....	47
3.4) Contagem de leucócitos totais.....	48
3.5) Análise de eosinófilos.....	48
3.6) Cultura de macrófagos e infecção <i>in vitro</i>	48
3.7) Tratamentos com agonistas ou antagonistas de PPAR γ e anticorpos neutralizantes.....	49
3.8) Contagem de corpúsculos lipídicos.....	50
3.9) Lise celular e dosagem de proteínas.....	50
3.10) Western Blotting.....	51
3.11) Dosagem de PGE $_2$ (EIA).....	51
3.12) Dosagem de citocinas (LUMINEX).....	52
3.13) Ensaio de imunolocalização.....	53
3.13.1) Imunolocalização de PPAR γ , NF- κ B e TIRAP em macrófagos peritoneais.....	53
3.13.2) Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos humanos.....	54
3.14) Análises de citometria de fluxo.....	55
3.15) Análises estatísticas.....	56
4) Resultados	57
4.1) <i>M. bovis</i> , BCG induz a formação de corpúsculos lipídicos em paralelo com o aumento da síntese de PGE $_2$ em macrófagos peritoneais de camundongos em diferentes tempos analisados <i>in vitro</i>	58
4.2) Avaliação da expressão de PPAR γ em macrófagos durante a infecção por BCG <i>in vitro</i>	62

4.2.1) Imunolocalização de PPAR- γ em macrófagos humanos infectados por BCG após 24h.....	64
4.2.2) Análise da participação de PPAR γ na ativação celular desencadeada pela ação de agonistas durante a infecção por BCG <i>in vitro</i>	69
4.2.3) Inibição da formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE ₂ por GW9662 antagonista seletivo de PPAR γ em macrófagos infectados por BCG <i>in vitro</i>	71
4.2.4) Avaliação da produção de citocinas durante a infecção pelo BCG 24 horas <i>in vitro</i> , nos macrófagos tratados com GW9662.....	74
4.3) Análise da participação do receptor TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE ₂ , durante a infecção.....	76
4.3.1) Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos de animais TLR2 ^{-/-} e TLR4 ^{-/-} infectados por BCG.....	79
4.3.2) TLR2 está envolvido na produção de IL-5 e eotaxina endógena, mediada por CCR3 durante a infecção por BCG.....	80
4.3.3) Avaliação da produção de citocinas durante a infecção pelo BCG 24 horas, em macrófagos normais e deficientes para TLR2.....	82
4.3.4) Imunolocalização de NF- κ B em macrófagos normais ou deficientes para o receptor TLR2 estimulados ou não por LAM 24h....	84
4.3.5) Imunolocalização de TIRAP em macrófagos peritoneais infectados por <i>M. bovis</i> , BCG.....	86
4.3.6) Análise da participação do receptor TLR2 na expressão de PPAR γ durante a infecção por BCG <i>in vitro</i>	87
4.3.7) Envolvimento do TLR2 na ativação e translocação de PPAR γ por componente da parede celular micobacteriana.....	88
4.3.8) Ligantes TLR2 induzem diferentes respostas de macrófagos <i>in vitro</i>	90
4.3.9) Avaliação da expressão de PPAR γ por ligantes de TLR2.....	92
4.4) Estudo do papel de TLR6 durante a infecção por <i>M. bovis</i> , BCG em macrófagos peritoneais, <i>in vitro</i>	94

4.5) Análise da participação de CD14 e das integrinas CD11b/CD18 no processo de formação de corpúsculos lipídios, produção de PGE ₂ e TNF- α durante a infecção.....	96
4.6) Envolvimento de <i>lipid rafts</i> na sinalização celular durante a infecção por BCG.....	98
4.7) Estudo da participação de CD36 na infecção de macrófagos peritoneais durante a infecção a infecção por BCG.....	100
4.7.1) Avaliação do papel do CD36 na ativação dos macrófagos peritoneais após a infecção por BCG 24 horas <i>in vitro</i>	102
4.8) Envolvimento da dectina-1 no reconhecimento micobacteriano e ativação de macrófagos peritoneais.....	106
5) Discussão.....	108
6) Conclusões.....	128
7) Referências Bibliográficas.....	131
8) Anexos.....	154

<p>CAPA: Macrófago peritoneal infectado com <i>Mycobacterium bovis</i>, BCG (verde) <i>in vitro</i>, em vermelho marcação nuclear do receptor PPARγ.</p>



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo da participação do receptor PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG.

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Patrícia Elaine de Almeida

Os macrófagos são os principais agentes de defesa contra patógenos intracelulares e têm importante papel no metabolismo de lipídios e processos inflamatórios. Vários estudos demonstraram a participação de macrófagos “espumosos” durante a infecção intracelular por micobactérias, mas seu significado funcional é pouco entendido. Nosso laboratório tem mostrado que os corpúsculos lipídicos são organelas dinâmicas e funcionalmente ativas, que funcionam como sítios de sinalização em leucócitos para regulação do metabolismo lipídico e síntese de mediadores inflamatórios. Os mecanismos que regulam o acúmulo intracelular de lipídios, bem como a ativação de fatores transcricionais envolvidos no metabolismo lipídico de macrófagos, durante processos infecciosos, o seu significado na patofisiologia e no curso de doenças desencadeadas por patógenos intracelulares não são completamente entendidos. Os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos (PPARs) atuam em vários processos inflamatórios e imunoregulatórios devido à propriedade de regular a expressão de vários genes, estando desta maneira implicados na patofisiologia da aterosclerose, inflamação, diabetes e resposta imune. O papel do PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à patógenos ainda não se encontra esclarecido. Assim nosso objetivo foi caracterizar o envolvimento do receptor nuclear PPAR γ na resposta do hospedeiro frente a infecções pelo patógeno intracelular *Mycobacterium bovis*, BCG. Em paralelo, investigamos o papel do receptor Toll-like 2 (TLR2) e outras moléculas sinalizadoras como CD14, CD11b/CD18, CD36, dectina-1 além de *lipid rafts* na resposta inflamatória durante a infecção por BCG. Nossos resultados demonstram que a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *M. bovis*, BCG *in vitro* induziu aumento da expressão de PPAR γ , o qual foi acompanhado pela indução da formação de corpúsculos lipídicos, bem como aumento da produção de mediadores inflamatórios como PGE₂ e citocinas. A expressão de PPAR γ e a produção de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios foram drasticamente inibidas em camundongos deficientes para o receptor TLR2, sugerindo um papel importante do TLR2 neste fenômeno. Demonstramos também que ativação de macrófagos *in vitro* por agonistas de TLR2 (*M.smegmatis*, Pam₃cys e zimosan) não foi capaz de induzir formação de corpúsculos lipídicos, sugerindo que ativação de TLR2, embora essencial para induzir expressão de PPAR γ ou formação de corpúsculos lipídicos na infecção, não é suficiente para desencadear vias de formação de corpúsculos lipídicos, indicando que outros co-fatores podem estar envolvidos. Nós verificamos de maneira significativa

o envolvimento de CD14, CD11b/CD18, CD36, *lipid rafts* e dectina-1, na formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, a neutralização do CD36 levou à inibição da expressão de PPAR γ induzida por BCG. Desta maneira sugerimos que a infecção por BCG altera significativamente os níveis de expressão de PPAR γ de maneira dependente de TLR2 e CD36 e que receptores nucleares ativados por lipídios podem modular a formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE₂, e a função de macrófagos durante infecções micobacterianas. O estudo da regulação e ativação de PPAR γ durante infecções por patógenos intracelulares poderá trazer contribuições sobre os mecanismos básicos de interação e escape na resposta patógeno-hospedeiro e poderá contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos para a tuberculose.

Abstract

TESE DE DOUTORADO

Patrícia Elaine de Almeida

Macrophages are the main agents of defense against intracellular pathogens and have important role in the lipid metabolism and inflammatory process. Recent studies have demonstrated the participation of foam macrophages during the intracellular infection by mycobacteria, but their significance is not completely understood. Although there are some studies concerning inflammatory response in tuberculosis, little is known about the cellular and molecular events involved in inflammation and the role of lipid mediators in the pathogen-host response. The mechanisms that control the intracellular lipid accumulation, as well as the activation of transcription factors involved in lipid metabolism of macrophages during infection process and the significance in the pathophysiology and the course of infection by intracellular pathogen is not completely understood. The activator receptors of the proliferated of peroxissomos (PPARs) act in some inflammatory and immunoregulatory processes due their ability to regulate the expression of some genes, in this manner, they are implied in the pathophysiology of atherosclerosis, inflammation, obesity, diabetes and immune response. The role of the PPAR γ in the response of the host to the pathogen is not yet completely understood. Thus, our aim was to characterize the involvement of PPAR γ in the host response to infection by the intracellular pathogen *Mycobacterium bovis*, BCG. In parallel we investigated the role of Toll-like receptor 2 (TLR2) and other co-factors as CD14, CD11b/CD18, CD36, dectin-1, as well as lipid rafts in the inflammatory process during the infection by BCG. Our results demonstrated that the *in vitro* infection of peritoneal mouse macrophages by *M. bovis*, BCG induced increase of the PPAR γ expression, wich was followed by the induction of the lipid body formation, as well as the increase of inflammatory mediators, as PGE₂ and cytokine production. Lipid body formation and PPAR γ expression were drastically inhibited in deficient mice for TLR2 receptor, suggesting an important role of the TLR2 in this phenomenon. We also demonstrated that *in vitro* activation of macrophages by TLR2 agonists (*M.smegmatis*, Pam₃cys and zymosan) has not been capable to induce lipid body formation, suggesting that TLR2 activation is essential to induce lipid body formation during the infection but it is not enough to activate pathways of lipid body formation, indicating that other co-factors are involved. We observed a significant involvement of CD14, CD11b/CD18, CD36, lipid

rafts and dectin-1, in lipid body formation and inflammatory mediator production. Moreover, the CD36 neutralization inhibited PPAR γ expression during BCG infection. We suggest that the infection by BCG significantly alters the levels of PPAR γ expression in TLR2 and CD36 dependent pathway and that nuclear receptors activated by lipids can modulate the lipid body formation, PGE₂ production, and the macrophage function during mycobacterium infection. The study of the regulation and activation during infections by intracellular pathogens may contribute for the understanding of basic mechanisms of interaction and escape in the response of host to pathogens and for the identification of new therapeutical targets for the tuberculosis.

Lista de Abreviações

AA	Ácido araquidônico
ABCA	Cassete de ligação e transporte de ATP
ADRP	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AP-1	Proteína ativadora 1
ATP	Trifosfato de adenosina
azPC	Hexadecil azeloil fosfatidilcolina
BCG	Bacilo Calmett e Guérin
CC	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupo de diferenciação
COX	Cicloxygenase
CR	Receptor do complemento
DGAT	Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FAS	Ácido graxo sintase
G-CSF	Fator de crescimento de colônias para granulócitos
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias para granulócitos/monócitos
GTP	Trifosfato de guanosina
HETE	Ácido -(S)-hidroxi-eicosatetraenóico
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida

HODE	Ácido hidroxi-octadecadeinóico
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IFN- γ	Interferon – gama
IRF	Fator regulatório de interferons
ITAM	Motivo ativador nos imunorreceptores de tirosina
JNK	Quinase N-terminal
KDa	Quilodaltons
LAM	Lipoarabinomanana
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO	Lipoxigenase
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPC	Lisofosfatidilcolina
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucotrieno
LTA	Ácido lipoteicóico
LXR	Receptor X do fígado
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
M β CD	Methyl- β -ciclodextrina
MCP	Proteína quimioatraente de monócitos/macrófagos
MD	Diferenciador mielóide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade

MOI	Multiplicidade de infecção
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
MIP	Proteína inibitória de monócitos
MMRC	Receptores de manose de macrófagos
MR	Receptores de manose
mTOR	Proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos
NADPH	Nicotidamina adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OxLDL	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMP	Padrão molecular associado à patógeno
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIM	Fosfatidil mioinositol manosídeo
PG	Prostaglandina
PK	Proteína quinase
PL	Fosfolipase
PPAR	Receptor ativado por proliferadores de peroxissomos
PPER	Elemento de resposta dos proliferadores de peroxissomos
PRR	Receptor de reconhecimento padrão

RANTES	Reguladas sob ativação normalmente expressa e secretada por células T
RXR	Receptor X retinóico
S-MALP	Lipopeptídeo de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
SR	Receptor “scavenger”
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
Syk	Tirosina quinase do baço
TB	Tuberculose
TGF- β	Fator de crescimento tumoral – beta
TIP47	Proteína de interação da porção terminal de 47 quilodaltons
TIRAP	Proteína adaptadora do receptor Toll/Interleucina-1
Th	Linfócitos T helper
TLR	Receptores semelhantes à Toll
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
TZDs	Tiazolidinediones
UFC	Unidade formadora de colônia
OMS	Organização Mundial da Saúde

1) INTRODUÇÃO

1.1) Tuberculose

1.1.1) Características e Considerações gerais

Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que o *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), o agente etiológico da tuberculose (TB), infecta aproximadamente dois bilhões de pessoas em todo o mundo, levando à morte aproximadamente dois milhões de pessoas por ano (Frieden e cols., 2003; OMS, 2008). Nos últimos anos, a tuberculose se tornou um dos mais graves problemas de saúde pública no mundo (Figura 1.1), sendo considerada a segunda causa de morte por doença infecciosa, depois da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS).

Esta nova reincidência da tuberculose vem sendo atribuída, principalmente, ao impacto da epidemia da AIDS, onde estudos recentes estimam que até o final de 2007 em torno de 11 milhões de pessoas foram co-infectadas com o *M. tuberculosis* e com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (UNAIDS, 2007). Além do impacto da AIDS, outros fatores contribuem por aumentar ainda mais os números de pessoas infectados com a TB. Estes fatores estão relacionados ao surgimento de cepas resistentes, à quimioterapia inadequada, e à combinação de fatores demográficos e sócio-econômicos. Estudos recentes constataram cerca de 9 milhões de novos casos em 2006 (em torno de 8% foram positivos para HIV) e cerca de 4 milhões dos casos foram positivos para o teste do escarro, que representa a forma mais infecciosa da doença (OMS, 2008). O Brasil ocupa a 18ª colocação na classificação dos 22 países com maiores índices de incidência de tuberculose no mundo, com 50 casos por 100.000 habitantes (OMS, 2008).

A literatura sobre tuberculose, tanto humana quanto experimental, demonstra ser esta uma doença de patogenia complexa, cujo aspectos de interações celulares e moleculares entre micobactérias e células hospedeiras não se encontram esclarecidos.

As micobactérias são pequenos bacilos, aeróbios obrigatórios, sem mobilidade, não formadores de esporos, que se multiplicam lentamente. Podem ser facilmente identificadas através da coloração pelo método de Ziehl-Nielsen ou pela auramina (Carter e cols., 1991). No gênero *Mycobacterium* incluem-se espécies patogênicas como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canettii*, não patogênicas e saprófitas como *M. smegmatis*, *M. microti*. Os patogênicos são

relacionados como causadores da tuberculose tanto humana quanto animal (Griffin e cols., 1995; Hines e cols., 1995).

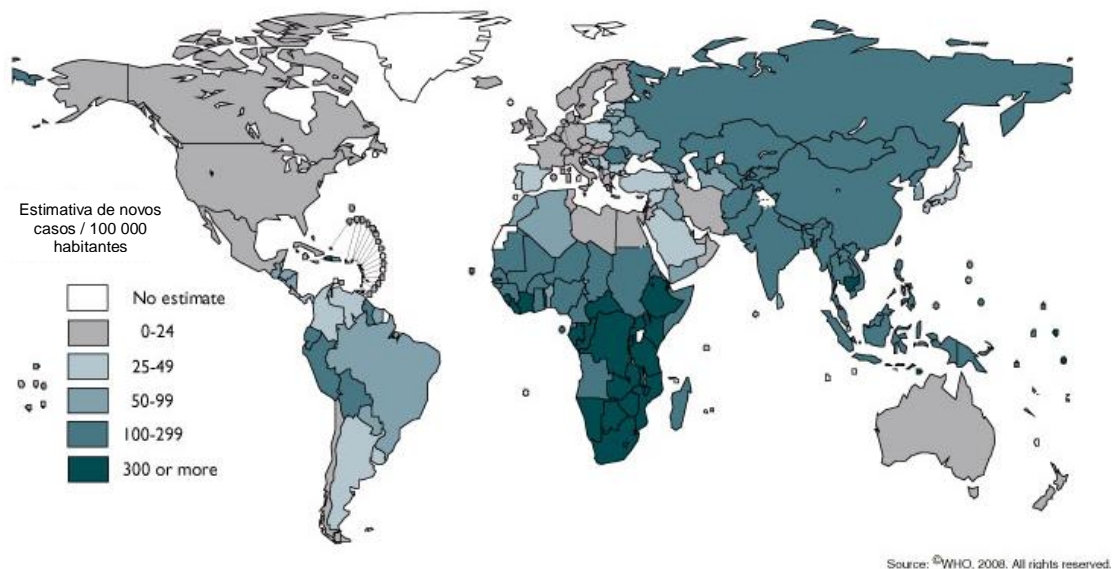


Figura 1.1 - Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2006. Figura adaptada da Organização Mundial de Saúde: Controle global da tuberculose, vigilância, planejamento e financiamento 2008 (World Health Organization WHO/HTM/TB/2008.393)

1.1.2) Mecanismos fisiopatológicos da infecção

A transmissão da doença se dá primariamente pela rota respiratória através da inalação de partículas suspensas no ar contendo o *M. tuberculosis*, que podem permanecer no ambiente por minutos ou horas após expectoração de pessoas com tuberculose pulmonar ou laringeal durante tosse, espirro, fala, etc. (Riley e cols., 1995). Apesar da doença acometer outros órgãos, a tuberculose pulmonar é a mais comum. O foco primário no pulmão localiza-se mais freqüentemente, em regiões periféricas às zonas médias e inferiores do pulmão, para onde a maioria do ar inalado a cada inspiração é direcionado e o foco secundário ocorre nos ápices (Moreno e cols., 1989). Em muitos casos a infecção é assintomática, e a latência clínica pode se estender por toda vida do indivíduo.

No pulmão, o microrganismo pode levar a quatro possíveis respostas: 1 - resposta inicial do hospedeiro pode ser efetiva e eliminar os bacilos, impedindo o estabelecimento da tuberculose; 2 – as micobactérias podem ser inativadas, permanecendo dormentes no interior dos fagócitos, não havendo o desenvolvimento da doença; 3 – a micobactéria pode iniciar a multiplicação imediatamente após a infecção ocasionando a tuberculose primária; ou 4 – ocorre reativação da infecção latente, (Flynn and Chan, 2001).

O curso da doença causada por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* em humanos é similar (Cosma e cols., 2003). As micobactérias patogênicas persistem em macrófagos dentro de granulomas nos órgãos do hospedeiro infectado, principalmente no pulmão. O granuloma consiste de macrófagos, células gigantes, células T, células B e fibroblastos (lesão primária).

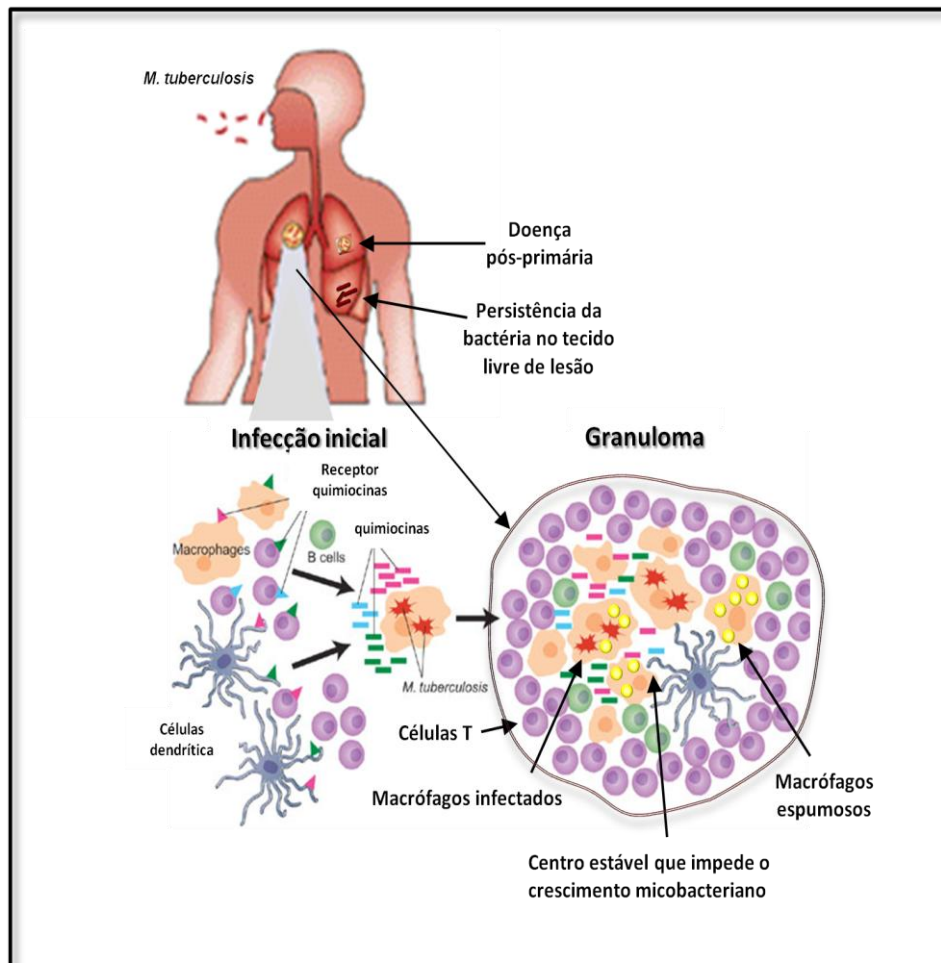
A formação de granuloma é uma característica da maioria das infecções micobacterianas (Esquema 1.1). O granuloma formado na tuberculose é uma estrutura altamente organizada e representa o balanço entre hospedeiro e patógeno (Russell e cols., 2002). Para o hospedeiro o granuloma fornece um ponto focal para a resposta imune, limitando a disseminação da bactéria. Para o patógeno, o ambiente pró-inflamatório do granuloma recruta células hospedeiras em potencial para sobrevivência e persistência do bacilo.

A distribuição limitada de linfócitos está relacionada às citocinas do microambiente do granuloma. Os lipídios bacterianos liberados pelo bacilo induzem liberação de citocinas, como interleucina-6 (IL-6) (VanHeyningen e cols., 1997), que

podem suprimir a proliferação de células T, e a exocitose destes lipídios a partir das células infectadas, pode estender a esfera de influência além da célula hospedeira confinada (Russell e cols., 2002). Tal estratégia pode favorecer a permanência bacteriana. Embora a estrutura e a composição celular dos granulomas serem bem conhecidas, o papel dos tipos celulares específicos dos granulomas permanece desconhecido.

Dentro dos granulomas, os macrófagos podem se diferenciar em células epitelióides e/ou se fundirem formando células multinucleadas, chamadas células gigantes. Os macrófagos que apresentam grandes quantidades de corpos de lipídios ou corpúsculos lipídicos são chamados de macrófagos espumosos. Vários trabalhos têm caracterizado a presença dos macrófagos espumosos durante infecções micobacterianas, aspecto este observado principalmente em granulomas formados durante a tuberculose tanto em condições clínicas quanto experimentais (Ridley and Ridley, 1987; Hernandez-Pando e cols., 1997; Cardona e cols., 2000). Entretanto, o significado funcional destas células nos processos infecciosos ainda é desconhecido.

Na infecção latente, o estado da micobactéria dentro do granuloma ou tubérculo, não é completamente conhecido. O microorganismo pode estar em um estado dormente não replicante, pode estar replicando ativamente, mas sendo eliminado pelo sistema imune, ou pode estar metabolicamente alterado com ciclos replicativos limitados ou infrequentes (Flynn and Chan, 2001).



Esquema 1.1 - Infecção e formação do granuloma durante a infecção por *M. tuberculosis*. No sítio de infecção, há participação principalmente de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. A ativação das células presentes no sítio inflamatório promove a produção de citocinas e quimiocinas que regulam a formação do processo granulomatoso. O IFN- γ e TNF- α participam de forma decisiva na ativação dos macrófagos, maturação fagossomal e produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, enquanto que as quimiocinas, são integrantes fundamentais na condução do estabelecimento da resposta imune adaptativa ao *M. tuberculosis*. Esquema adaptado a partir de Kaufmann, 2001.

1.2) Receptores envolvidos no reconhecimento de micobactérias e componentes da parede celular micobacteriana.

O reconhecimento do patógeno tem um papel crítico na imunidade inata, por facilitar a remoção e a conseqüente morte do microorganismo. Este mecanismo leva à ativação das células hospedeiras com a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, iniciando assim o desenvolvimento da resposta imune adaptativa.

Os macrófagos representam uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos invasores, cuja função envolve internalização destes microorganismos, levando à ativação da via endocítica com conseqüente acidificação e atividade hidrolítica do fagossomo, culminando na eliminação do patógeno. No entanto, o início deste fenômeno só é possível devido à presença de uma série de moléculas que estão envolvidas no reconhecimento, fagocitose e ativação intracelular direcionado pelo patógeno.

O processo de reconhecimento de micobactérias compreende várias etapas: a primeira é a adesão do bacilo à célula hospedeira. Para isto diversos receptores da superfície celular participam desta interação, destacando-se: o receptor de complemento 3 (CR3), considerado o principal receptor que medeia internalização de micobactérias; CR1; CR4; receptores de manose de macrófagos (MMRc), que participam da fagocitose não mediada por opsonina, reconhecendo resíduos de manose nas partículas alvo (Fenton and Vermeulen, 1996); o grupamento de diferenciação-14 (CD14) e receptores *scavenger* como o CD36. Outra via de internalização é a da proteína surfactante A, que serve como uma opsonina para microorganismos inalados, e também pode ser uma via alternativa para a micobactéria entrar na célula (Downing e cols., 1995; Gaynor e cols., 1995).

Além destes receptores descritos acima, vários estudos têm indicado a participação de receptores do tipo “Toll Like” ou semelhantes a “Toll” (TLR) no processo de ativação de macrófagos por antígenos micobacterianos (Reiling e cols., 2002; Takeuchi e cols., 2002; Heldwein e cols., 2003; Quesniaux e cols., 2004; D’Avila e cols., 2006).

1.2.1) Receptores “Toll like” (TLR), seus co-receptores e as associações heterotípicas

A resposta imune em vertebrados é caracterizada pela imunidade inata e adquirida. A imunidade inata é a primeira linha de defesa do organismo contra patógenos invasores. Um dos principais papéis da resposta imune inata é a fagocitose desencadeada por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas.

Dentre os receptores para o reconhecimento de componentes micobacterianos pelo sistema imune os mais bem descritos são os TLRs (Esquema 1.2) (Medzhitov and Janeway, 2000; Akira, 2003). A sinalização através dos TLRs é uma das principais armas da resposta imune inata durante infecções micobacterianas.

O primeiro receptor da família "Toll" foi identificado em *Drosophila melanogaster* como um componente da via de sinalização controlando polaridade dorso-ventral de embriões (Hashimoto e cols., 1988). Lemaitre e colaboradores, (1996 e 1997) demonstraram que os TLRs também conferiam imunidade às moscas contra infecções fúngicas. Os TLRs de mamíferos têm sido identificados como homólogos aos "Toll" de *Drosophilas* e referidos como "Toll Like Receptors (Rock e cols., 1998). Os TLRs são receptores transmembranares que possuem um domínio extracelular de repetições ricas em leucina e um domínio citoplasmático homólogo ao receptor de IL-1R (Gay and Keith, 1991). O primeiro receptor "Toll" humano descrito foi o TLR4 relacionado com vias de sinalização induzindo ativação do fator nuclear- κ B (NF- κ B) (Medzhitov and Janeway, 2000). Através desta via, a ativação de TLR4 leva à indução da expressão de uma variedade de citocinas e moléculas co-estimulatórias que são cruciais para a resposta adaptativa (Medzhitov and Janeway, 1997).

Estão descritos na literatura a presença de 13 membros da família TLR em mamíferos. Vários agonistas para estes receptores têm sido identificados, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), lipoproteínas, glicolipídios, lipoarabinomanana (LAM) e ácido lipoteicóico (LTA). Dentre os TLRs os mais bem descritos estão os TLR4, TLR1/2 e TLR2/6 que são encontrados na superfície celular, são capazes de reconhecer lipídios na membrana microbiana, e os TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9 que reconhecem ácidos nucléicos e são encontrados no ambiente intracelular (Akira e cols., 2006).

O reconhecimento micobacteriano, a sinalização celular e a modulação da resposta inflamatória desencadeada por TLR requer a presença de moléculas acessórias e/ou co-receptores. Akashi e colaboradores (2008) designaram 3 grupos classificatórios destas moléculas, seriam eles: 1) moléculas acessórias que são

necessárias e funcionam como moléculas regulatórias e estão presentes na superfície celular como o receptor de diferenciação mielóide 2 (MD2); 2) moléculas que residem no retículo endoplasmático (Unc93B, PRAT4A e gp96); e 3) moléculas que interagem diretamente com os ligantes de TLR e regulam sua resposta, como CD14, CD36 que interagem com TLR2 e TLR4.

Estudos de Means e colaboradores (2001) demonstraram que ambos TLR2 e TLR4 desencadeiam vias de sinalização intracelular induzidas pelo *M. tuberculosis in vitro*, e que *M. tuberculosis* viável contém distintos ligantes que ativam células via TLR2 e TLR4. O TLR2 exerce papel de destaque, uma vez que vários componentes deste patógeno apresentam atividade agonista sobre este receptor. Vários trabalhos têm descrito a ativação celular via TLR2 por lipoglicanas da parede celular micobacteriana, como por exemplo o LAM, ou por fosfatidil mio-inositol manosideo (PIM) (Means e cols., 1999a; Gilleron e cols., 2003), sugerindo que TLR2 tem participação crucial na resposta inata contra micobactérias.

A vasta literatura tem mostrado que TLR4 e TLR2 podem regular diferentes aspectos da resposta contra *M. bovis*, Bacillus Calmette e Guérin (BCG). Estudos de Heldwein e colaboradores, (2003) mostraram que BCG induz produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos deficientes de TLR4, mas não de TLR2. Diferente do observado para macrófagos deficientes de TLR4, macrófagos deficientes em TLR2 não expressam o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II quando infectados por *M. tuberculosis* (Reiling e cols., 2002).

Nosso grupo tem mostrado a participação de TLR2 e TLR4 na migração celular durante a infecção por BCG, onde a migração de macrófagos e eosinófilos em animais deficientes para o receptor TLR2 foi drasticamente inibida quando comparado com os animais deficientes para o receptor TLR4 (D'Avila e cols., 2006).

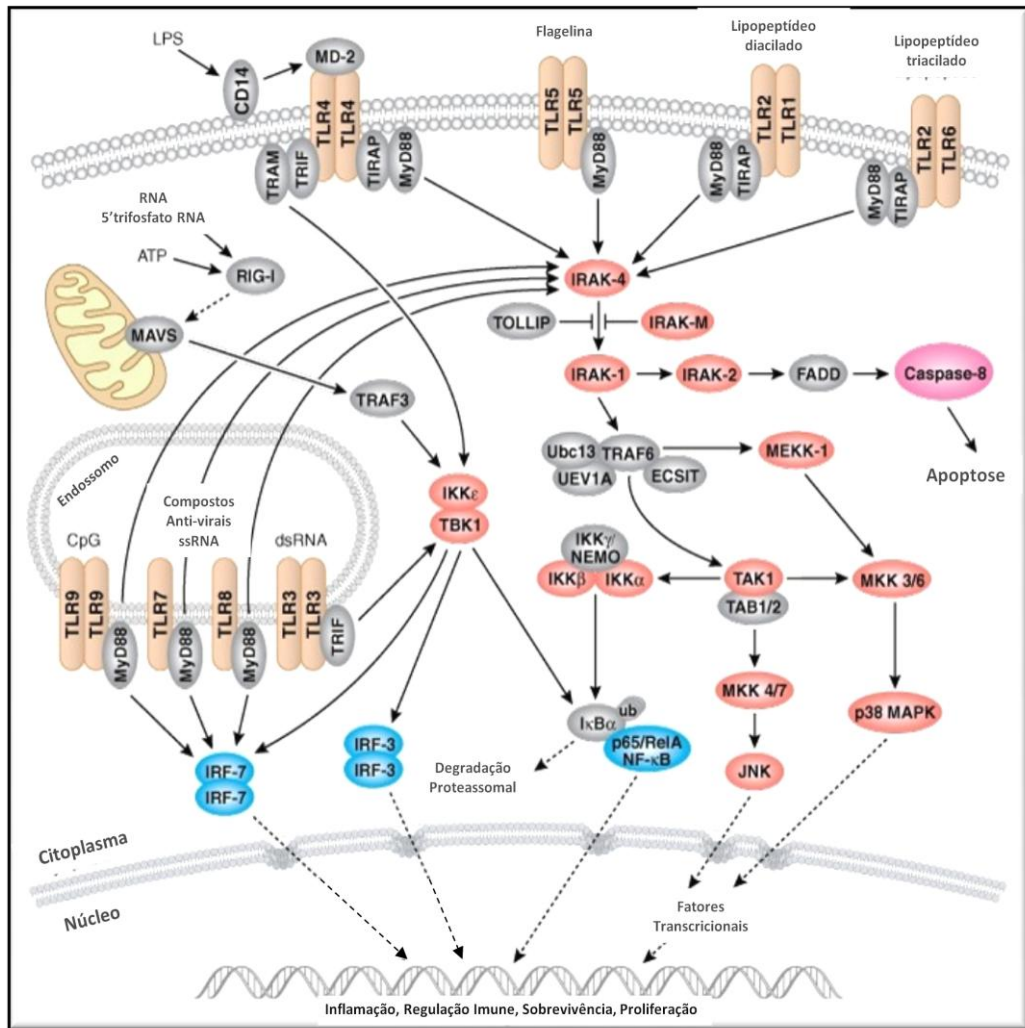
O TLR2 tem sido considerado o mais “promíscuo” de todos os receptores TLR descritos. Esta característica se deve à sua capacidade de reconhecimento de diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), incluindo componentes de bactérias Gram-positivas como as peptidoglicanas, LTA (Nilsen e cols., 2008), LAM (Means e cols., 1999a; Gilleron e cols., 2003), lipoproteínas (Takeuchi e cols., 2002), bem como o LPS de certas bactérias Gram-negativas (Triantafyllou e cols., 2007), leveduras (Underhill e cols., 1999), e fungos (Heine e cols., 2003). Esta característica se deve a uma habilidade única do receptor se heterodimerizar com TLR1 e TLR6 (Ozinsky e cols., 2000a). Estudos recentes têm demonstrado a associação de TLR2 com CD36 em resposta a lipoproteínas

diaciladas (Triantafilou e cols., 2006). Os estudos usando lipoproteínas diaciladas e triaciladas têm sugerido que lipoproteínas diaciladas requerem TLR2/6 para ativação, já as lipoproteínas triaciladas requerem TLR2/1 e não TLR6 (Alexopoulou e cols., 2002; Morr e cols., 2002; Takeuchi e cols., 2002). Corroborando estes achados, dois estudos, demonstraram que os heterodímeros formados entre TLR2/TLR1, ou TLR2/TLR6 pré-existem na célula e não são induzidos por ligantes (Ozinsky e cols., 2000a; Triantafilou e cols., 2006). Além disso, durante a estimulação por ligantes específicos, estes heterodímeros são recrutados para regiões específicas da membrana plasmática, chamadas *lipid rafts*.

As *lipid rafts* são microdomínios da membrana celular, ricos em colesterol e esfingolípídios, envolvidos em vários mecanismos de sinalização, no tráfego de membranas, mecanismos de adesão celular, na resposta imunológica e em doenças inflamatórias (Brown e London, 1998; Simons e Toomre, 2000). Sabe-se que estas estruturas são altamente dinâmicas, mas suas funções em cada um destes contextos ainda não estão completamente caracterizadas.

Ao contrário do observado nas associações de TLR2/6, associações entre TLR2 e CD36 não são pré-formadas, mas sim induzidas pelo ligante (Triantafilou e cols., 2007). Corroborando estes dados, estudos demonstraram que lipoproteínas diaciladas sinalizam através do heterodímero TLR2/6 e também requerem CD36, e não o heterodímero TLR2/1 (Hoebe e cols., 2005).

No entanto, algumas questões na sinalização desencadeada por TLR2 ainda permanecem para ser elucidadas, por exemplo, se diferentes ligantes de TLR2 podem desencadear uma sinalização de modo similar a partir da superfície celular ou intracelularmente?



Esquema 1.2 – Vias de sinalização celular mediadas por TLRs. A ativação dos diferentes TLRs por seus ligantes específicos desencadeia a ativação e fosforilação de uma série de proteínas e enzimas no ambiente intracelular, culminando com a ativação de fatores transcripcionais envolvidos na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória, regulação da resposta imune, podendo levar a sobrevivência e proliferação ou a morte do microrganismo. Esquema adaptado, www.cellsignal.com.

1.2.2) Papel do CD14 no reconhecimento micobacteriano

Trabalhos têm indicado um importante papel para co-receptores de TLR que participam da adesão de micobactérias às células hospedeiras, dentre eles podemos destacar o CD14, uma proteína ancorada a um glicosilfosfatidilinositol (GPI) expresso na superfície celular de monócitos e macrófagos (Hoheisel e cols., 1995; Schluger and Rom, 1998; Compton e cols., 2003; Pauligk e cols., 2004).

O início do processo de fagocitose se dá pela ligação dos receptores ao LAM, um dos principais moduladores da função de macrófagos e células dendríticas. O reconhecimento do LAM via CD14 é semelhante ao lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias Gram-negativas, com pontos comuns nas vias de sinalização desencadeadas por estes microorganismos (Hoheisel e cols., 1995; Schluger and Rom, 1998). Além disso, o CD14 pode interagir com vários TLRs induzindo a produção de citocinas após infecções bacterianas e virais (Compton e cols., 2003; Pauligk e cols., 2004).

Estudos têm documentado a presença do CD14 em *lipid rafts* de monócitos (Pfeiffer e cols., 2001; Triantafilou e cols., 2006). Na linha destes achados foi que CD14 interage diretamente com TLR2 e TLR4 e que esta interação é independente do ligante. Entretanto, somente quando o complexo CD14/TLR é ativado por um ligante é que ele é recrutado para *lipid rafts* (Schmitz and Orso, 2002). Além disso, o CD14 pode atuar como um transportador de ligantes microbianos entregando ativamente moléculas, como LPS e poly I:C para os TLRs tanto na superfície celular como intracelularmente e funciona como um sinal amplificador para movimentação de TLRs para os microdomínios *lipid rafts* (Schmitz and Orso, 2002).

O CD14 funciona como um receptor para ligação de lipopeptídeos e LTA (Schroder e cols., 2003). Na linha destes achados, estudos demonstraram que CD14 e CD36 funcionam como co-receptores de TLR2, e estes co-receptores são necessários para a ligação e internalização de LTA, bem como para induzir a produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) em monócitos. Estes fenômenos ocorrem preferencialmente na membrana plasmática e independe da internalização do ligante (Nilsen e cols., 2008).

1.2.3) CD36: um receptor *scavenger* envolvido na fagocitose, inflamação e metabolismo lipídico

O CD36 tem sido implicado em várias funções biológicas, tanto normais quanto patológicas, incluindo angiogênese, aterosclerose, fagocitose, inflamação, metabolismo lipídico e remoção de células apoptóticas (Febbraio e cols., 2001; Hirano e cols., 2003).

O CD36 foi identificado pela primeira vez por Talle e colaboradores, (1983) e isolado a partir de plaquetas como um receptor para trombospondina (Asch e cols., 1987; McGregor e cols., 1989). O CD36 é uma glicoproteína transmembranar e membro da família dos receptores *scavenger* classe B, encontrado no endotélio microvascular, adipócitos, células musculares lisas e esqueléticas, células dendríticas e células hematopoiéticas, incluindo precursores eritróides, plaquetas, monócitos/macrófagos e megacariócitos (Febbraio e cols., 2001).

Alguns trabalhos têm relacionado a localização de CD36 em *lipid rafts* (Zeng e cols., 2003; Pohl e cols., 2005). Outros estudos tem relacionado a associação do CD36 com cavéolas e com a própria proteína caveolina-1. No entanto, os estudos se mostram contraditórios no que diz respeito à associação de CD36 com caveolina-1. Alguns autores têm documentado que CD36 co-localiza com caveolina-1 e cavéolas em regiões de *lipid rafts* (Covey e cols., 2007) ao contrário do observado por (Zeng e cols., 2003) que demonstraram uma co-localização de CD36 em *lipid rafts* independente de caveolina-1 e cavéolas. As cavéolas são regiões ricas em esfingolipídios e colesterol e podem servir para concentrar moléculas de sinalização e facilitar a integração da cascata de sinalização intracelular. Além disso, muitas evidências indicam que as cavéolas têm um papel importante no tráfego de colesterol nas células (Uittenbogaard e cols., 2000; Lee e cols., 2001).

Estudos de Savill e colaboradores, (1991) identificaram o CD36 como um receptor para o reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos mononucleares. Outros autores demonstraram a função primária dos receptores *scavenger* na remoção de células apoptóticas durante desenvolvimento, homeostasia e processos infecciosos (Bird e cols., 1999; Chang e cols., 1999). Além disso, o CD36 pode ainda apresentar importante papel na sinalização celular, regulando a resposta apoptótica e inflamatória em células endoteliais e macrófagos (Moore e cols., 2002; Medeiros e cols., 2004; Hoebe e cols., 2005; Stuart e cols., 2005).

Achados recentes mostram que há evidências do papel de CD36 na resposta

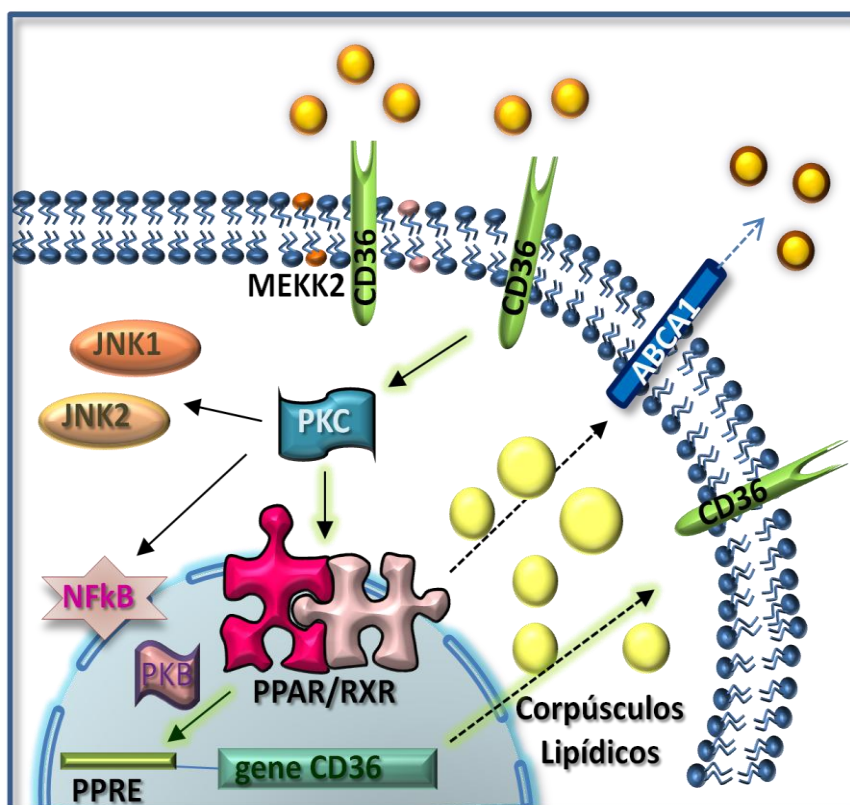
imune inata contra patógenos como bactérias e seus componentes inflamatórios. Hoebe e colaboradores, (2005) documentaram que CD36 de macrófagos é importante para o reconhecimento de lipopeptídeo-2 de *Mycoplasma pneumoniae* (S-MALP-2), PAM₂CSK4 e zimosan, mostrando que alguns, mas não todos, os ligantes de TLR2 são dependentes da sinalização de CD36.

O CD36 funciona como um receptor fagocítico para uma variedade de tipos bacterianos, incluindo *M. tuberculosis* em adipócitos (Neyrolles e cols., 2006). O envolvimento do CD36 na fagocitose e produção de citocinas em resposta ao *Staphylococcus aureus* e por componentes da parede celular - o LTA, e em menor extensão por *Escherichia coli* e seu componente da parede celular - o LPS tem sido documentado (Stuart e cols., 2005). Desta forma, tem sido reportado que o CD36 pode ter um papel na sinalização intracelular independente de TLR, ativando vias de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e JNK em macrófagos (Rahaman e cols., 2006; Baranova e cols., 2008).

Uma importante função patológica dos receptores *scavenger* está relacionada com a formação de macrófagos espumosos e com a aterosclerose. Isto se deve principalmente à capacidade do CD36 de monócitos e macrófagos se ligar e endocitar a LDL oxidada (oxLDL), mecanismos que têm um papel crítico para a formação de macrófagos espumosos, desencadeando o desenvolvimento da lesão aterosclerótica. A endocitose de oxLDL por CD36 ocorre através de vias mediadas por *lipid rafts* e parece ser independente de cavéola, caveolina-1 e mediada por clatrina (Zeng e cols., 2003). Este mecanismo induz importantes mudanças no complexo transcricional em macrófagos, incluindo um aumento da regulação da expressão de CD36 (Shiffman e cols., 2000), à ativação do receptor ativado por proliferadores de peroxissomos-gama (PPAR γ) por vias dependentes de proteína 38 (p38), MAPK, proteína quinase C (PKC) (Feng e cols., 2000) e PKB (Munteanu e cols., 2006). O PPAR γ por sua vez heterodimeriza com o receptor X retinóico (RXR) e o heterodímero PPAR γ :RXR se liga diretamente à região do elemento de resposta ao PPAR (PPER), na região promotora do gene que codifica o CD36 (Tontonoz, 1998). Além disso, oxLDL pode também induzir ativação de NF- κ B em macrófagos (Lipsky e cols., 1997) através de um mecanismo dependente de CD36 e PKC (Han e cols., 2000).

Pelo menos dois estudos utilizando macrófagos deficientes para o receptor CD36 mostraram que estas células são incapazes de internalizar oxLDL e formar

macrófagos espumosos (Silverstein and Febbraio, 2000; Febbraio e cols., 2001). De acordo com estes achados foi demonstrado que oxLDL era incapaz de ativar macrófagos de animais deficientes para CD36 e, em contrapartida, nos animais selvagens ocorria a ativação de MAPK, JNK-1 e 2 (Rahaman e cols., 2006). Além disso, o bloqueio farmacológico de JNK ou de quinases da família Src inibe a formação de macrófagos espumosos *in vitro* e *in vivo* de maneira dependente de CD36 (Esquema 1.3).



Esquema 1.3 - Representação esquemática das vias de ativação desencadeadas por CD36 durante a internalização de oxLDL em macrófagos.

A oxLDL se liga ao CD36 e desencadeia a ativação do fator transcrricional PPAR γ . Este mecanismo de ativação leva a um aumento da expressão do CD36 na superfície dos macrófagos. A via de NF- κ B também é alvo da ativação provocada por oxLDL e leva a indução da síntese de várias citocinas. A ativação de macrófagos por oxLDL desencadeia a fosforilação de quinases relacionadas à via de ativação intracelular do CD36, como MEKK2, JNK1 e JNK2. Esquema adaptado a partir de Collot-Teixeira e cols., 2007.

1.2.4) Dectina-1, um receptor para micobactérias

De maneira geral, o processo de fagocitose tanto para micobactérias quanto para outros patógenos é iniciado pela ligação de partículas alvo microbianas aos receptores de superfície celular, alguns deles capazes de reconhecer o alvo diretamente, sendo chamados neste caso de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) que se ligam a estruturas microbianas conservadas, os PAMPs. Dentre eles, destacam-se os já citados receptores de manose (MR), receptores *scavenger* e os TLRs.

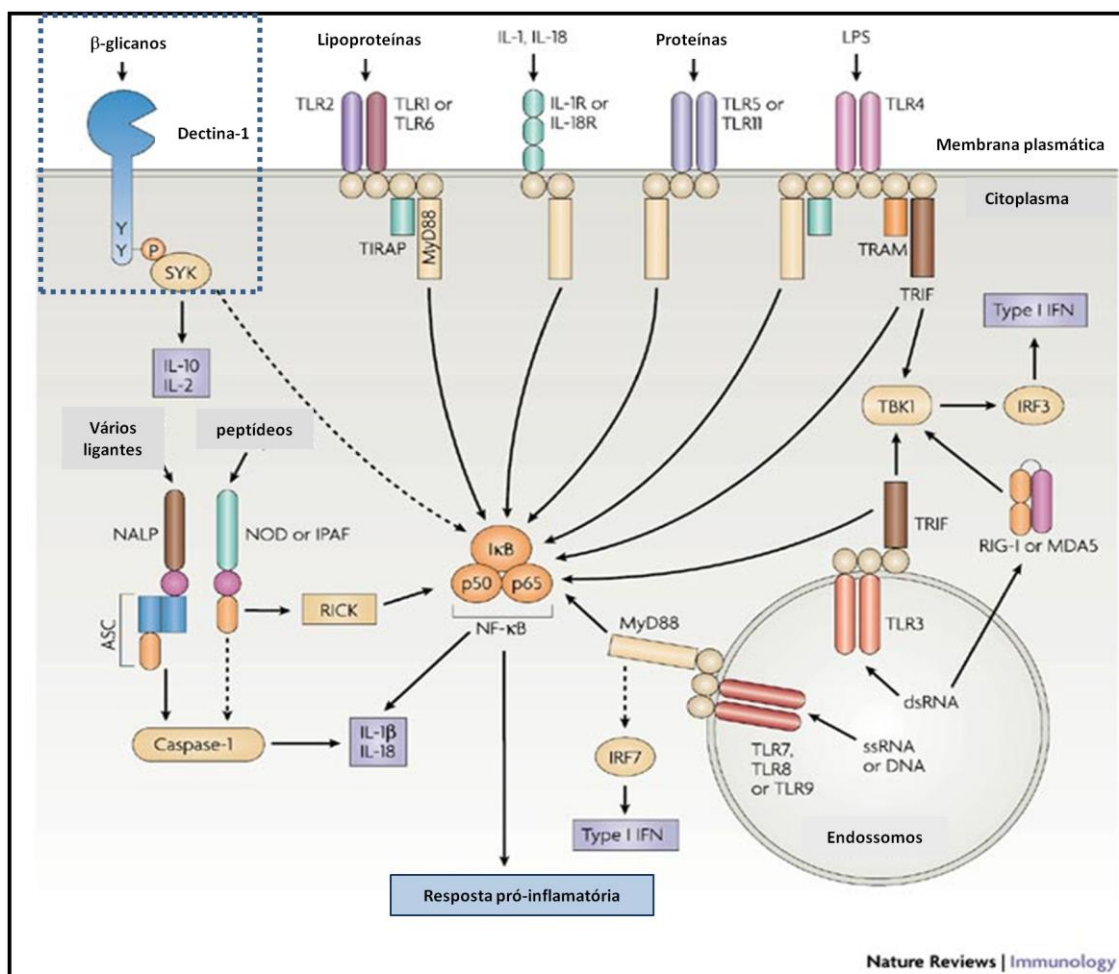
Os receptores de MR e CR3 têm sido historicamente considerados os maiores receptores de lectinas de macrófagos e estão envolvidos principalmente no reconhecimento de partículas derivadas de leveduras não opsonizadas. De acordo com estes estudos, Brown e colaboradores, (2002) usando inibidores de carboidratos específicos, demonstraram que o receptor de β -glicano dectina-1, mas não o MR, é o receptor predominante neste processo.

A dectina-1 é um receptor de lectina tipo C, o maior PRR de macrófagos para β -glicanos. Além dos macrófagos é também expressa em outras células do sistema imune como nos monócitos, neutrófilos e células dendríticas. Este receptor é caracterizado como um receptor fagocítico para partículas contendo β -glicanos, incluindo zimosan e *Candida albicans* (Brown and Gordon, 2001; Brown e cols., 2002).

A dectina-1 é um receptor transmembranar contendo um motivo ativador nos imunorreceptores de tirosina (ITAM) na sua cauda citoplasmática. O ITAM é uma estrutura encontrada em uma variedade de receptores capazes de desencadear uma sinalização pró-inflamatória, como os receptores Fc e receptores de célula T (Ravetch and Bolland, 2001), o que sugere que a dectina-1 pode ter um papel importante na resposta inflamatória de partículas contendo β -glicano. De fato estudos têm documentado que ITAM é necessário para indução da produção de citocinas pró-inflamatórias, em colaboração com TLR. Estes estudos demonstraram que a dectina-1 facilita a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos estimulados com zimosan (Taylor e cols., 2002; Brown e cols., 2003; Gantner e cols., 2003).

O trabalho de Ferwerda e colaboradores, (2008) reportaram que dectina-1 tem um efeito sinérgico com as vias de TLR2 e TLR4 para produção de TNF- α em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanos e em macrófagos. A dectina-1 é capaz de desencadear a produção de citocinas, por interagir com TLR2 ou ainda pela ativação direta de tirosina quinase do baço (Syk) (Rothfuchs e cols., 2007) (Esquema 1.4).

Dois trabalhos relacionaram a participação da dectina-1 em infecções micobacterianas, uma vez que a parede micobacteriana é composta por complexos lipídicos, açúcares e carboidratos. Rothfuchs e colaboradores, (2007), demonstraram o papel da dectina-1 em promover a indução de IL12-(p40) em células dendríticas infectadas por *M. tuberculosis*, onde o receptor foi capaz de aumentar a interação da célula hospedeira com a bactéria levando a um subsequente aumento da produção de citocinas, através da ativação de Syk. Shin e colaboradores, (2008) demonstraram uma interação física e funcional da dectina-1 e TLR2 após a infecção por *Mycobacterium abscessus*. Além disso, a cooperação da dectina-1 com TLR2 foi necessária para uma fagocitose eficiente do *M. abscessus*, induzindo a ativação de quinase regulada extracelularmente 1 e 2 (ERK1/2) e a secreção de citocinas pró-inflamatórias através da ativação de Syk. No entanto, até o momento, pouco se sabe sobre como as vias de sinalização intracelular dependentes de dectina-1 são reguladas durante infecções micobacterianas.



Esquema 1.4 – Representação esquemática das principais vias de sinalização intracelular desencadeada por ligantes PRRs. As vias que são ativadas por diferentes receptores são múltiplas, neste esquema estão demonstradas as principais vias que diferenciam as diferentes classes dos receptores de reconhecimento padrão. Em destaque a dectina-1, o receptor da família das lectinas que reconhecem β -glicanos, a ativação destes receptores podem afetar as vias de sinalização de TLRs, como também de proteínas associadas à apoptose, como a caspase-1. Esquema adaptado de Trinchieri e Sher, 2007.

1.3) Mecanismos de sobrevivência de micobactérias em fagócitos mononucleares.

Na resposta à infecção micobacteriana, os macrófagos são uns dos principais agentes de defesa do hospedeiro, capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e nitrogênio favorecendo a morte do bacilo, embora as espécies reativas de nitrogênio, aparentemente sejam mais eficazes nesta função (Fenton and Vermeulen, 1996; Schluger and Rom, 1998; Bonecini-Almeida e cols., 2004). O estudo de MacMicking e colaboradores, (1997) observaram que a ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) é essencial para conter a replicação do *M. tuberculosis* no interior do macrófago hospedeiro. A sobrevivência de micobactérias patogênicas como *M. tuberculosis* no interior dos macrófagos está ligada às propriedades físico-químicas da superfície micobacteriana e à formação de fagossomos. Sabe-se que componentes da parede celular podem induzir alterações na sinalização intracelular do hospedeiro.

Análises ultra-estruturais de macrófagos infectados têm mostrado a dinâmica da fusão do fagolisossomo e seu efeito na replicação bacteriana (Armstrong and Hart, 1975; McDonough e cols., 1993). A adesão e a internalização das bactérias em fagossomos está relacionada com a sua capacidade de sobrevivência, dificultando sua eliminação por enzimas lisossomais, espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (Hart and Young, 1991).

As micobactérias exercem influência sobre as células hospedeiras, limitando a apresentação de antígenos (Gercken e cols., 1994; Ullrich e cols., 2000), induzindo supressão da resposta de linfócitos (Prasad e cols., 1987) e induzindo mediadores pró-inflamatórios e imunossupressivos (Wallis and Ellner, 1994; Rhoades e cols., 1995). Russel, (2001), demonstraram que a progressão de vacúolos contendo micobactérias é limitada pela capacidade de acidificação do compartimento, facilitando o acesso a nutrientes internalizados pela célula hospedeira e restringindo a interface entre o patógeno e a maquinaria de processamento e apresentação de antígenos por macrófagos.

A resposta protetora do organismo contra micobactérias patogênicas está diretamente relacionada com eventos iniciais da interação patógeno-hospedeiro. Uma vez fagocitado, o patógeno pode desencadear eventos intracelulares que proporcionam maturação e acidificação fagossomal, devido à fusão com lisossomos,

organelas que apresentam uma carga de enzimas capazes de eliminar o microorganismo (Russell, 2003). Estes processos muitas vezes são regulados pelo patógeno que tem a capacidade de desencadear vários mecanismos de ação, conseguindo subverter as vias de ativação intracelular que promovem a acidificação fagossomal e assim conseguem sobreviver e replicar dentro de suas células hospedeiras (Armstrong and Hart, 1975; Xu e cols., 1994; Beatty e cols., 2002; Anes e cols., 2003; Walburger e cols., 2004). Esta capacidade é um atributo que pode estar ligado a propriedades da superfície micobacteriana (Beatty e cols., 2000; Fischer e cols., 2001; Pieters, 2001). A liberação de componentes da parede micobacteriana e seu tráfego a partir do fagossomo representam um possível mecanismo pelo qual micobactérias influenciam o ambiente dentro do foco de infecção.

Uma das principais características das diferentes espécies de micobactérias é a presença de um complexo lipídico diverso, que constitui 60% da parede celular (Kolattukudy e cols., 1997), sendo caracterizada pela baixa permeabilidade da matriz contribuindo para a sobrevivência e replicação do microorganismo. Lipídios provenientes de frações da parede micobacteriana têm sido caracterizados por possuírem atividade biológica, levando a uma supressão da proliferação de células mononucleares do sangue periférico (Barrow e cols., 1993), indução de citocinas (Moreno e cols., 1989; Barnes e cols., 1992) e exacerbação da resposta granulomatosa (Reggiardo and Shamsuddin, 1976). Lipídios da superfície micobacteriana são os primeiros componentes a interagir com a célula hospedeira, afetando a ativação de macrófagos e possivelmente direcionando eventos iniciais na modulação da maturação fagossomal (Goren e cols., 1976).

O principal componente da parede celular micobacteriana denominado lipoarabinomanana (LAM) pode apresentar, tanto uma atividade imunomodulatória quanto antiinflamatória, que pode inibir a produção de IFN- γ por macrófagos ativados (Sibley e cols., 1988), suprimir a ativação de linfócitos T (Ellner and Daniel, 1979), bem como inibir vias que levam à apresentação de antígenos (Moreno e cols., 1988). Trabalhos de Fratti e cols., (2000), demonstraram que microesferas cobertas com LAM foram internalizadas em fagossomos que mostraram reduzida capacidade de fusão com lisossomos, mostrando que o LAM pode modular fagossomos bacterianos.

O estudo de Moura e colaboradores, (1999) demonstraram que lipídios da superfície celular de *M. leprae* e *M. bovis*, BCG induzem diferentes respostas

celulares. O *M. leprae* inibe macrófagos tanto *in vivo* quanto *in vitro* e, por outro lado, o BCG induz inflamação e proporciona uma ativação e diferenciação de macrófagos em células epitelióides.

O colesterol das células hospedeiras pode funcionar como uma importante fonte de carbono para as micobactérias (Hunter e cols., 2007; Pandey and Sasseti, 2008). Gatfield e Pieters, (2000), demonstraram que vacúolos contendo micobactérias apresentam um alto conteúdo de colesterol e que a depleção de colesterol em macrófagos antes da incubação com bactérias torna as células refratárias à infecção. Desta maneira, alguns autores sugerem que a restrição de nutrientes pode ser um mecanismo de defesa e é mediado por IFN- γ , indicando que a utilização do colesterol como fonte de carbono é uma das estratégias de escape usadas por *M. tuberculosis* (MacMicking e cols., 2003; Pandey and Sasseti, 2008).

Lipídios como ácido araquidônico e ceramidas internalizados pelo hospedeiro têm sido relacionados com a sinalização intracelular em macrófagos infectados, por modular a resposta imune do hospedeiro, através da indução da produção de citocinas (Akaki e cols., 2000; Flynn and Chan, 2001), ou interferindo com os níveis de ATP intracelular, desencadeando a associação de actina e culminando com a maturação fagossomal e conseqüente morte do patógeno (Anes e cols., 2003). Baseados nestes dados os autores comentam que o curso da infecção pode ser influenciado pela inclusão de determinados ácidos graxos na dieta. É importante ressaltar que durante um processo infeccioso, o que é alimento para o hospedeiro pode representar também uma fonte acessível de nutrientes para o patógeno (Russell, 2003).

O sucesso da sobrevivência de espécies micobacterianas em seus macrófagos hospedeiros se dá também devido à capacidade destes organismos induzir a produção de mediadores inflamatórios que apresentam a capacidade de desativar macrófagos, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias. Um importante mediador desta resposta é a prostaglandina (PG) E₂. Dados da literatura mostram que o aumento da síntese de PGE₂ relaciona-se com a diminuição na produção de radicais reativos de nitrogênio por macrófagos, diminuindo assim sua atividade citotóxica contra micobactérias (Betz and Fox, 1991).

1.4) Corpúsculos Lipídicos

1.4.1) Características gerais

Os corpúsculos lipídicos também chamados de gotas lipídicas, ou adipossomos, são inclusões citoplasmáticas, esféricas, não delimitadas por membrana, associadas a elementos do citoesqueleto que em estudos ultra-estruturais apresentam elétron-densidade variável (Franke e cols., 1987; Dvorak and Monahan-Early, 1992; Dvorak e cols., 1992).

Em pequeno número (1 a 5), os corpúsculos lipídicos são constituintes citoplasmáticos normais de leucócitos não ativados para revisão ver (Bozza e Bandeira-Melo, 2005; Walther and Farese, 2008). Além de células de mamíferos, estudos relatam a ocorrência de corpúsculos lipídicos em plantas e microorganismos (Galli e cols., 1985; Murphy, 2001; Bozza and Bandeira-Melo, 2005; Walther and Farese, 2008). Avanços recentes mostram que corpúsculos lipídicos de leucócitos são domínios intracelulares induzíveis e especializados que participam em processos de regulação e tráfego do metabolismo lipídico, na síntese de mediadores inflamatórios, na resposta frente à infecções patogênicas e na inflamação alérgica (Bozza e cols., 2007). Os corpúsculos lipídicos aumentam em número e tamanho participando como sítios na condução de processos inflamatórios em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Dvorak e cols., 1983; Weller e cols., 1994, 1999; Bozza e cols., 2005).

Em análise ultra-estrutural, corpúsculos lipídicos freqüentemente apresentam uma camada periférica, elétron-densa e osmiofílica, composta por uma monocamada de fosfolípidios anfipáticos, alguns apresentam uma área elétron-lúcida ao centro, outros, no entanto, são totalmente elétron-densos (Galli e cols., 1985; Weller, 1991; Dvorak e Monahan-Early, 1992; Dvorak e cols., 1992; Dvorak e cols., 1993; Melo e cols., 2003) (Figura 1.2).

Um intrigante aspecto da diferença de osmiofilia dos corpúsculos lipídicos está associado com o tipo celular, estímulo e o tempo de estudo. Estas mudanças morfológicas geralmente refletem diferenças na composição lipídica e indicam que estas estruturas são organelas dinâmicas capazes de mudar sua estrutura de acordo com a atividade celular (Bozza e cols., 2007). Com coloração e fixação apropriadas os corpúsculos lipídicos podem ser visualizados, pois colorações

rotineiras constituídas por alcoóis, como May-Grunwald-Gimesa provocam a dissolução destas estruturas.

Embora há poucos anos alguns autores acreditassem que os corpúsculos lipídicos representassem apenas sítios de estoque e transporte de lipídios, hoje sabe-se que estas organelas são estruturas altamente dinâmicas e funcionalmente ativas. Avanços mais recentes têm atribuído aos corpúsculos lipídicos de leucócitos funções de organelas especializadas, com importante papel na regulação do metabolismo e tráfego lipídico, no controle da síntese e secreção de mediadores inflamatórios envolvidos na resposta a infecções bem como em processos alérgicos, para revisão ver (Bozza e cols., 2007).

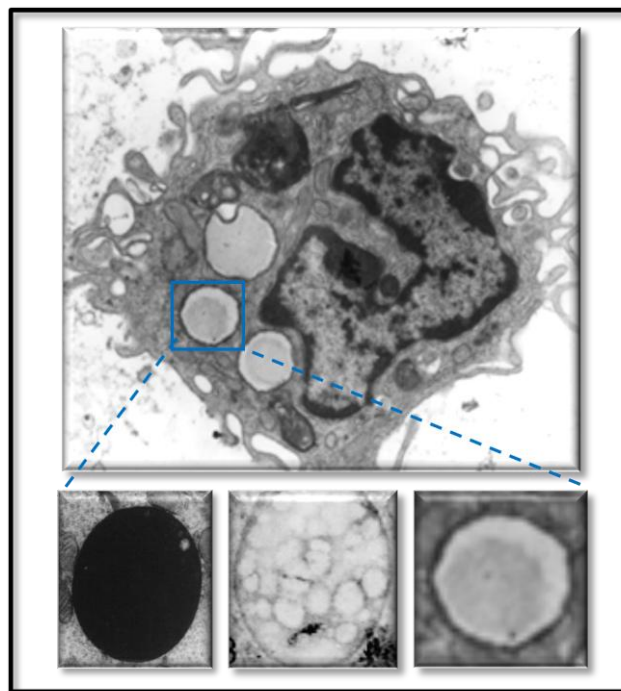


Figura 1.2 – Ultra-estrutura de corpúsculos lipídicos de leucócitos. O detalhe mostra as diferenças de elétron-densidade dos corpúsculos lipídicos, onde eles se apresentam totalmente elétrons-densos ou elétrons-lúcidos, característica derivada do conteúdo lipídico da organela. Esta característica dependente de estímulo, dose, tempo e tipo celular analisado. Figura adaptada de D'Avila e cols., 2006.

1.4.2) Composição e funções dos corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos são constituídos basicamente por lipídios neutros, como triacilglicerol, colesterol-éster, associados a uma variada composição lipoprotéica, envolvidos por uma monocamada de fosfolipídios (Murphy, 2001; van Meer, 2001; Tauchi-Sato e cols., 2002; Bozza and Bandeira-Melo, 2005; Ohsaki e cols., 2006; Bozza e cols., 2007; Bozza e cols., 2009). A monocamada lipídica que envolve os corpúsculos lipídicos apresenta uma constituição abundante em fosfatidilcolina e ácidos graxos insaturados (Tauchi-Sato e cols., 2002), o que difere dos fosfolipídios encontrados nas membranas do retículo endoplasmático e de microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios.

Os corpúsculos lipídicos apresentam um importante conteúdo protéico caracterizado principalmente por proteínas da família PAT. As principais proteínas PAT descritas relacionadas aos corpúsculos lipídicos compreendem as perilipinas, as adipofilinas ou proteínas relacionadas com a diferenciação de adipócitos (ADRP ou ADFP), a proteína de interação de porção terminal de 47 kilodaltons (TIP47) e S3-12, consideradas essenciais para o estoque e metabolismo de lipídios (Londos e cols., 2005). Além do envolvimento na biogênese dos corpúsculos lipídicos, estas proteínas parecem estar diretamente envolvidas na organização estrutural destas organelas. Vários estudos de microscopia de imunofluorescência (Londos e cols., 1999; Fukumoto and Fujimoto, 2002; Miura e cols., 2002; Wolins e cols., 2006a), microscopia eletrônica de crio-fratura em combinação com marcações com ouro (Robenek e cols., 2003; Robenek e cols., 2004; Robenek e cols., 2008) têm demonstrado a localização de membros das proteínas PAT associadas a corpúsculos lipídicos.

Em particular, a ADRP tem sido associada a corpúsculos lipídicos de diferentes tipos celulares, incluindo os leucócitos; apesar de não ter função completamente entendida, parece atuar como proteína estrutural (Heid e cols., 1998; Wolins e cols., 2001; Nakamura, 2003; Brasaemle e cols., 2004; Londos e cols., 2005; Ohsaki e cols., 2006; Maya-Monteiro e cols., 2008). A ADRP está associada com lipídios neutros em todos os tipos celulares e de fato tem sido descrita como uma proteína específica e considerada um importante marcador para os corpúsculos lipídicos (Brasaemle e cols., 1997a; Heid e cols., 1998).

A regulação da expressão de ADRP e perilipina e a compartimentalização nos

corpúsculos lipídicos tem sido descrita em macrófagos com implicações importantes para formação de macrófagos espumosos em lesões de aterosclerose (Larigauderie e cols., 2004; Zhao e cols., 2005; Larigauderie e cols., 2006).

Estudos de proteômica identificaram pequenas GTPases, além de dezoito tipos de proteínas de família das Rab, em corpúsculos lipídicos (Brasaemle e cols., 2004; Liu e cols., 2004; Ozeki e cols., 2005). As proteínas Rab são reguladoras do tráfego vesicular e interação de organelas. Dentre elas a Rab5, a Rab7 (Yu e cols., 2000; Brasaemle e cols., 2004; Umlauf e cols., 2004; Ozeki e cols., 2005; Liu e cols., 2007), a Rab11 (Holtta-Vuori e cols., 2002), e a Rab18, a mais bem estudada, está envolvida na interação dos corpúsculos lipídicos com o retículo endoplasmático (RE) (Ozeki e cols., 2005). Estes autores demonstraram que a Rab18 localiza-se em subpopulações distintas de corpúsculos lipídicos e não co-localizam com as proteínas PAT. Isto sugere que os corpúsculos lipídicos apresentam componentes protéicos diferentes. Esta característica deve refletir o estado funcional de ativação diferente para cada corpúsculo lipídico.

As enzimas também conhecidas por regular sinais extracelulares como MAPK, ERK, p38, bem como PKC e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), que estão implicadas na sinalização intracelular, também foram encontradas em corpúsculos lipídicos de leucócitos (Yu e cols., 1998; Yu e cols., 2000; Fujimoto e cols., 2001; Pol e cols., 2001; Chen e cols., 2002; Liu e cols., 2004; Martin and Parton, 2005; Ozeki e cols., 2005; Wan e cols., 2007). Além destas enzimas, citocinas como o TNF- α (Beil e cols., 1995; Pacheco e cols., 2002), quimiocinas como as reguladas sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T (RANTES) e IL-6 (Lim e cols., 1996; Bandeira-Melo e cols., 2002a) e fatores de crescimento (Dvorak e cols., 2001) em corpúsculos lipídicos de leucócitos ativados. De modo geral, podemos sugerir que de acordo com o estímulo e o tipo celular os corpúsculos lipídicos podem compartimentalizar citocinas, bem como outros mediadores inflamatórios, levando a uma amplificação da resposta pró-inflamatória e a uma desativação de leucócitos. Entretanto ainda não é sabido como estas citocinas são liberadas dos corpúsculos lipídicos e/ou se elas possuem capacidade de sinalização nestas estruturas.

Muitos estudos têm indicado que o aumento do número de corpúsculos lipídicos em leucócitos pode resultar num aumento da produção de eicosanóides por estas células (Bozza and Bandeira-Melo, 2005). Através de estudos ultra-estruturais e de cromatografia de camada fina, alguns trabalhos mostraram a localização de ácido araquidônico em corpúsculos lipídicos, sugerindo que estas estruturas são

sítios intracelulares ricos em substrato para síntese de eicosanóides (Weller and Dvorak, 1985; Yu e cols., 1998). Além de serem sítios de localização de ácido araquidônico esterificado, as principais enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides, como fosfolipases A₂, 5-lipoxigenase (5-LO), leucotrieno sintase (LTC₄) e ciclooxigenase (COX) estão co-localizadas em corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1997 a, Bozza e cols., 1998; Yu e cols., 1998, Pacheco e cols., 2002).

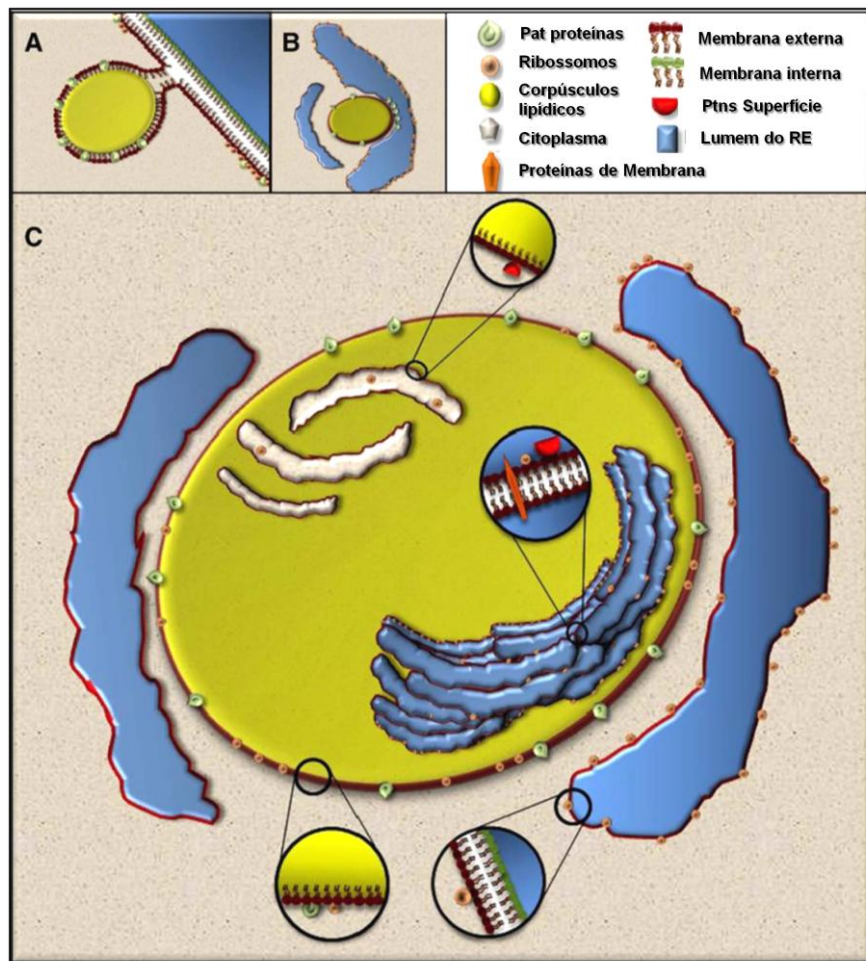
1.4.3) Biogênese do corpúsculos lipídicos

1.4.3.1) Biogênese organelar dos corpúsculos lipídicos

Várias hipóteses têm sido sugeridas para explicar o processo de formação de corpúsculos lipídicos. A mais aceita é que os corpúsculos lipídicos se originam a partir da deposição de ésteres-lipídicos entre a bicamada lipídica da membrana do RE, devido ao acúmulo gradual e globular dos lipídios (Murphy e Vance, 1999). O acúmulo de lipídeos neutros, resultantes da atividade enzimática do retículo endoplasmático, ocorre entre as duas folhas da membrana do RE até alcançar determinado volume sendo, a seguir, liberados no citoplasma carregando uma hemimembrana proveniente da face citosólica da membrana do RE. Esta observação é compatível com a organização dos corpúsculos lipídicos (Brown, 2001; Murphy, 2001; Tauchi-Sato e cols., 2002;). Vários estudos têm contribuído para esta hipótese mostrando a presença de proteínas específicas do RE nos corpúsculos lipídicos (Yu e cols., 2000; Brasaemle e cols., 2004; Liu e cols., 2004; Umlauf e cols., 2004). Por exemplo, já foi demonstrada a presença das enzimas como a acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) e a acil-CoA:diacilglicerol aciltransferase (DGAT2) tanto no RE quanto nos corpúsculos lipídicos (Smith e cols., 2000; Chang e cols., 2001; Kuerschner e cols., 2008). Esta enzima está localizada em áreas do RE que promovem a formação dos corpúsculos lipídicos (Kuerschner e cols., 2008) (Esquema 1.5).

Estes dados levam ao entendimento que os corpúsculos lipídicos são originados no RE e direcionados através do citoesqueleto celular, possibilitando a movimentação destas estruturas e interação com outras organelas de forma dinâmica e regulada. Entretanto alguns autores não excluem a possibilidade de que outras regiões e organelas celulares contribuam para o processo de formação de corpúsculos lipídicos. Estas teorias ainda não podem ser comprovadas devido ao

limite de resolução das técnicas utilizadas, onde só é possível individualizar os corpúsculos lipídicos no citoplasma (Ohsaki e cols., 2008).



Esquema 1.5 – Modelo hipotético da biogênese de corpúsculos lipídicos a partir do RE. A biogênese dos corpúsculos lipídicos envolve mecanismos dependentes da transferência de lipídios e proteínas do RE para os corpúsculos lipídicos nascentes. (A) As enzimas responsáveis pela síntese de ésteres lipídicos como (DGAT e ACAT) distribuídas na membrana do RE, e os ésteres lipídicos produzidos se depositam entre a bicamada lipídica da membrana do RE. A monocamada voltada para o citoplasma pode envolver os ésteres lipídicos globulares, de onde, posteriormente, ocorre o brotamento nesta região. Assim esta monocamada de membrana se tornaria a camada de fosfolipídios dos corpúsculos lipídicos. Outra alternativa, é que os ésteres lipídicos globulares formados no RE se desprendem junto a regiões específicas da membrana do RE, carregando tanto as monocamadas lipídicas voltada para o retículo quanto as voltadas para o citoplasma. (B) Formação dos corpúsculos lipídicos ricos em ADRP a partir da monocamada lipídica da membrana do RE voltada para o citoplasma com transferência de lipídios a partir do RE, para os corpúsculos lipídicos nascentes. (C) Formação dos corpúsculos lipídicos envolvendo a incorporação de domínios membranosos do RE e lipídios neutros entre estes domínios. Esquema adaptado de Bozza e cols., 2009.

1.4.3.1) Biogênese de corpúsculos lipídicos por agonistas lipídicos

A formação de corpúsculos lipídicos pode ser rapidamente evidenciada (15 – 60 minutos) em leucócitos após a estimulação pelo fator de ativação plaquetária (PAF) e por agonistas de PAF (Weller e cols., 1989; Bozza e cols., 1996a; Bozza e cols., 1996b; Pacheco e cols., 2002; Gomes e cols., 2006a).

Nosso laboratório tem documentado a formação de corpúsculos lipídicos induzida por lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada. A LDL oxidada (oxLDL) contém uma série de componentes inflamatórios, entre eles fragmentos fosfolipídicos oxidados capazes de ativar o receptor de PAF. Estes constituintes são capazes de induzir a migração e acúmulo de neutrófilos, monócitos e eosinófilos, bem como a formação de corpúsculos lipídicos (Silva e cols., 2002). Além disso, antagonistas de PAF foram capazes de inibir a formação destas organelas induzida por LPS e oxLDL, mostrando a participação de PAF e lipídios relacionados ao PAF nos processos de biogênese de corpúsculos lipídicos (Pacheco e cols., 2002; Silva e cols., 2002). Os autores mostraram também que a indução da formação de corpúsculos lipídicos via PAF é mediada por receptores, uma vez que o liso-PAF, um análogo que não se liga ao receptor de PAF não induz formação de corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1996 a; Bozza e cols., 1997; de Assis e cols., 2003).

As vias de sinalização desencadeadas por PAF ativam uma proteína G acoplada ao receptor, que ativam vias de sinalização induzindo a formação de corpúsculos lipídicos. Esta interação (PAF-receptor) leva à ativação da enzima 5-LO, que por sua vez gera o ácido 5-(S)-hidroxi-eicosatetraenóico (5-HETE) (Bozza e cols., 1996a). Tanto a 5-LO como o seu sub-produto o 5-HETE são indispensáveis na formação de corpúsculos lipídicos induzidos por PAF, como demonstrado por Bozza e colaboradores, (1996a) onde a toxina pertussis foi capaz de inibir a formação de corpúsculos induzida tanto por PAF, quanto por 5-HETE. Os autores também demonstraram que PAF e 5-HETE exigem nova síntese protéica, uma vez que a formação de corpúsculos lipídicos foi inibida por inibidores de síntese de RNA. Entretanto, os fatores transcricionais envolvidos neste fenômeno ainda não são conhecidos.

Trabalhos de Bozza e cols (1996b e 2002) mostraram a participação do ácido araquidônico (AA) e ácido oléico (AO) na biogênese dos corpúsculos lipídicos. Onde a aspirina e outros antiinflamatórios não esteroidais foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzida por AA e AO. Contudo o salicilato de

sódio, que não inibe a enzima COX, apresentou a mesma propriedade de inibição que a aspirina na formação dos corpúsculos lipídicos, sugerindo que este fenômeno é um evento independente da ativação de COX. Nas análises das isoformas de COX durante a formação dos corpúsculos lipídicos, foram utilizados camundongos deficientes de COX-1 e COX-2 e os resultados obtidos mostraram que a indução de corpúsculos lipídicos por AA ou AO não foi diferente daquela observada em animais selvagens, demonstrando que a formação destas estruturas é independente da ativação tanto de COX-1 quanto de COX-2 (Bozza e cols., 1996b; Bozza e cols., 2002).

Estudos recentes têm investigado o papel da ativação de receptores nucleares ativados por lipídios, como os PPARs, durante o fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos. Os PPARs são membros da família de receptores nucleares com importante função na transcrição de genes, após a ativação por ligantes. Eles estão envolvidos na diferenciação de macrófagos e acúmulo de lipídios intracelulares (Nagy e cols., 1998; Tontonoz, 1998). Dados de nosso laboratório mostraram que de fato, ligantes específicos de PPAR γ , o BRL 49653 ou rosiglitazona, são capazes de potencializar a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por oxLDL, agonistas de PAF e pelo fator de crescimento de colônias para granulócitos (G-CSF) (de Assis e cols., 2003; Inazawa e cols., 2003), sugerindo o envolvimento de genes alvo de PPAR γ no fenômeno de biogênese de corpúsculos lipídicos.

As vias de sinalização intracelular que induzem a biogênese dos corpúsculos lipídicos em macrófagos revelam que distintas vias podem desencadear sua formação de maneira dependente de estímulo-dose e tempo. No entanto, os mecanismos envolvidos na ativação e sinalização intracelular, os quais culminam com a formação dos corpúsculos lipídicos em leucócitos, ainda não estão completamente entendidos.

1.4.3.2) Biogênese de corpúsculos lipídicos por agonistas proteicos

Vários estudos demonstraram que citocinas e quimiocinas ativam vias de sinalização intracelular levando à formação de corpúsculos lipídicos.

Trabalhos documentaram a participação de quimiocinas como agonistas da formação de corpúsculos lipídicos, entre elas a proteína quimioatraente de

macrófagos 1 (MCP-1), através do receptor de quimiocina (CCR2), e a eotaxina via o receptor CCR3 (Silva e cols., 2002; Vieira-de-Abreu e cols., 2005; D'Avila e cols., 2007). O MCP-1 está envolvido como mediador endógeno na patogênese de processos inflamatórios de caráter macrófágico, incluindo aterosclerose e sepse, bem como, na regulação da biogênese de corpúsculos lipídicos em resposta à oxLDL e ao LPS (Pacheco e cols., 2002; Silva e cols., submetido). Além disso, os autores também demonstraram que MCP-1 foi capaz de induzir o acúmulo de corpúsculos lipídicos e a compartimentalização da ADRP por um fenômeno dependente do receptor CCR2, desencadeado pela ativação de MAPK e PI3K quinases. Já a eotaxina induz a formação de corpúsculos lipídicos mediada pelo receptor CCR3 e dependente da ativação de quinases como PI3K, p38 e ERK (Bandeira-Melo e cols., 2001b; Vieira-de-Abreu e cols., 2005; D'Avila e cols., 2007).

A leptina é conhecida como hormônio/citocina derivada de adipócitos, e relacionada com o estado nutricional e com funções neuroendócrinas e imunológicas. Este hormônio/citocina foi recentemente descrito com importante papel na ativação de macrófagos e na biogênese de corpúsculos lipídicos de macrófagos (Maya-Monteiro e cols., 2008). Os autores mostraram que a sinalização desencadeada pela leptina, através da ativação da proteína quinase alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR), foi capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos e a expressão da proteína ADRP, bem como a produção de LTB₄ em macrófagos, efeitos dependentes da via de ativação de PI3K/mTOR. Mais ainda, dois estudos documentaram a deficiência da leptina associada com uma deficiência da imunidade mediada por células e o aumento da susceptibilidade a infecções (Busso e cols., 2002; Matarese e cols., 2002).

A gênese e a função dos corpúsculos lipídicos ainda não são completamente entendidas. Sabe-se que a formação destas estruturas é um fenômeno específico e bem regulado, que depende da ativação de enzimas como a fosfolipase C (PLC) e PKC (Bozza e cols., 1996a; Bozza e cols., 1996b; Bozza e cols., 1997a; Bozza e cols., 1998).

1.4.3.3) Receptores da imunidade inata envolvidos na biogênese de corpúsculos lipídicos por estímulos infecciosos.

A participação dos receptores de membranas celulares envolvidos no reconhecimento de patógenos que desencadeiam a biogênese de corpúsculos lipídicos tem sido documentada. O receptor mais amplamente estudado neste fenômeno são os receptores TLRs (Pacheco e cols., 2002; D'Avila e cols., 2006; Cao e cols., 2007; Cocchiaro e cols., 2008; D'Avila e cols., 2008a; Almeida e cols., submetido; Mattos e cols., em preparação).

O envolvimento de TLR4 na biogênese dos corpúsculos lipídicos foi demonstrado em macrófagos estimulados por LPS de bactérias Gram-negativas (Pacheco e cols., 2002). O TLR4 atua como uma molécula de reconhecimento primário para LPS de bactérias Gram-negativas. Para induzir uma eficiente ativação, o LPS necessita que o receptor TLR4 se heterodimerize com o receptor (MD2), formando um complexo de sinalização. Estudos têm demonstrado que o complexo formado TLR4/MD2 pode interagir ainda com outras proteínas, como o CD14 e dímero CD11b/CD18 (Strapagiel e cols., 2008).

Nosso laboratório tem documentado que patógenos intracelulares como *T. cruzi* são capazes de induzir formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos por uma via dependente de TLR2. Foi postulado que corpúsculos lipídicos recém-formados são sítios intracelulares para a síntese de PGE₂ com funções parácrinas e/ou intrácrinas durante a infecção por *T. cruzi* (Melo e col., 2003). Outros estudos têm documentado o envolvimento de TLR2 na modulação da formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂ e PGD₂ induzidos por lipídios de *Schistosoma mansoni* (Magalhães e cols., em preparação).

TLR2, TLR4, TLR6 e TLR1 que dimerizam com TLR2 têm sido caracterizado no reconhecimento de antígenos micobacterianos (Takeuchi e cols., 2002; Sugawara e cols., 2003; Wieland e cols., 2004). Os lipídios de *M. bovis*, BCG, induzem formação de corpúsculos lipídicos *in vivo* e *in vitro*, mas esta capacidade foi drasticamente inibida nos macrófagos de camundongos deficientes para o receptor TLR2, sugerindo um papel essencial para o receptor neste fenômeno (D'Avila e cols., 2006; Almeida e cols., submetido). Além disso, antígenos purificados da parede celular micobacteriana, incluindo LAM e PIMs, sinalizam através de vias dependentes de TLR2 (Lien e cols., 1999; Means e cols., 1999a; Means e cols., 1999b). De fato, a formação de corpúsculos lipídicos pode também ser desencadeada por ligantes de TLR2 como, por exemplo o LAM, embora em menor extensão que o observado após infecção com BCG vivo (D'Avila e cols., 2006). De modo similar, *Chlamydia pneumoniae* tem sido implicada na formação de células

espumosas em humanos e camundongos. Este patógeno foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em camundongos deficientes para o receptor TLR4, mas não em camundongos deficientes para o receptor TLR2 na presença de LDL (Cao e cols., 2007).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a infecção por *M. leprae* ou *M. bovis*, BCG, não só correlaciona com a formação de corpúsculos lipídicos, mas também com o aumento de expressão da ADRP por vias de sinalização independentes e dependentes de TLR2 (Tanigawa e cols., 2008; Almeida e cols em preparação; Matos e cols., em preparação). Além de TLR2, outros receptores como CCR3 de eosinófilos, têm sido envolvido na formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG (D'Avila e cols., 2007).

Apesar de TLR2 ter um papel fundamental na formação dos corpúsculos lipídicos de leucócitos, outros co-fatores para TLR2 como o CD36 podem atuar como facilitadores associando e apresentando o ligante para TLR2, mostrando deste modo um papel chave na sinalização intracelular por estarem diretamente relacionados à biogênese dos corpúsculos lipídicos, durante infecções desencadeadas por patógenos intracelulares.

A relação entre formação de corpúsculos lipídicos e infecções por parasitas intracelulares tanto em modelos de infecções clínicas quanto experimentais tem sido documentada. Os corpúsculos lipídicos parecem estar co-relacionados aos mecanismos de patogênese, sobrevivência e multiplicação do microorganismo invasor. Mas os mecanismos que desencadeiam o fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos intracelulares não são completamente entendidos (Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2008b).

Dentre os estudos que investigam esta questão, destacam-se modelos relacionados à infecção por bactérias, protozoários e vírus. Em infecções bacterianas podemos citar a formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos no modelo de sepse experimental (Pacheco e cols., 2002; Gomes e cols., 2006b), na infecção por *Mycobacterium bovis* e *M. tuberculosis*, (D'Avila e cols., 2006; D'Avila e cols., 2007; Peyron e cols., 2008; Almeida e cols., submetido), *Mycobacterium leprae* (Tanigawa e cols., 2008; Matos e cols, em preparação) *Chlamydia pneumonia* (Cao e cols., 2007) e *Chlamydia Trachomatis* (Cocchiari e cols., 2008). Alguns destes trabalhos mostraram que os componentes da parede celular destes parasitas são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de modo dependente de dose e tempo (D'Avila e cols., 2006b; Cao e cols., 2007; D'Avila e cols., 2007;

Cocchiaro e cols., 2008; Almeida e cols., submetido).

Já foi demonstrado à presença de corpúsculos lipídicos em células infectadas por protozoários como *Trypanosoma cruzi* (Melo e cols, 2003; Melo e cols., 2006; Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2008b), *Toxoplasma gondii* (Charron and Sibley, 2002; Nishikawa e cols., 2005), *Plasmodium falciparum* (Jackson e cols., 2004) e *Plasmodium berghei* (Rodriguez-Acosta e cols., 1998).

Dados recentes mostram que os corpúsculos podem estar envolvidos no ciclo de vida de vírus, como o da hepatite C (HCV) (Miyanari e cols., 2007). Estudos de Boulant e cols., (2008) demonstraram que a proteína do cerne viral causa uma redistribuição dos corpúsculos lipídicos para uma região perinuclear em células infectadas, sugerindo o envolvimento dos corpúsculos lipídicos com o sistema de transporte celular, importante no ciclo de vida de vírus.

Independente do agente infeccioso, muitas evidências indicam que a formação de corpúsculos lipídicos durante processos infecciosos é um fenômeno bem regulado que pode ter implicação na patogênese microbiana. A infecção desencadeia a biogênese dos corpúsculos lipídicos de leucócitos de forma rápida após a estimulação, e este evento pode depender da interação direta entre o patógeno e a célula hospedeira. A fagocitose de partículas de látex, partículas de zimosan e bactérias não patogênicas como *Mycobacterium smegmatis* ou *Bacillus subtilis* não foram capazes de desencadear a formação de corpúsculos lipídicos *in vivo* e *in vitro*, bem como a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos (D'Avila e cols., 2006; Almeida e cols., submetido). Estes resultados indicam que a fagocitose não é essencial nem suficiente para induzir a formação de corpúsculos lipídicos e podem sugerir que a sinalização desencadeada através de componentes microbianos, citocinas e outros mediadores inflamatórios gerados no foco da infecção possam contribuir para a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos.

Além disso, alguns trabalhos têm evidenciado uma íntima relação de fagossomas contendo micobactérias e corpúsculos lipídicos (D'Avila e cols., 2006; Peyron e cols., 2008; Tanigawa e cols., 2008). Nestes estudos, os autores co-localizaram fagossomos micobacterianos dentro dos corpúsculos lipídicos. Os corpúsculos lipídicos parecem envolver e internalizar o fagossoma micobacteriano, favorecendo desta maneira o acesso aos nutrientes pelo patógeno. Estudos de Tanigawa e cols., (2008) mostraram que além da localização da ADRP e perilipina nos corpúsculos lipídicos, estas proteínas estavam presentes também na membrana

de fagossomos de histiócitos contendo numerosos bacilos vivos. De forma similar a estes estudos, Plotkowski e cols., (2008) observou a mobilização de ácido araquidônico dos corpúsculos lipídicos em células epiteliais respiratórias durante a infecção por *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com estes relatos, foi descrito que a persistência micobacteriana requer utilização de fontes de ácidos graxos e colesterol do hospedeiro (Russell, 2003; Pandey and Sasseti, 2008), sugerindo que os corpúsculos lipídicos poderiam participar como fonte de nutrientes para estes patógenos. Deste modo, pode-se inferir o papel dos corpúsculos lipídicos como possíveis moduladores da resposta imune em leucócitos representando um balanço entre a relação patógeno-hospedeiro.

1.5) Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs)

1.5.1) PPARs características gerais e sinalização intracelular

Os PPARs foram inicialmente descritos em 1990, com papel chave na resposta de proliferação de peroxissomos (Issemann and Green, 1990). Trabalhos recentes têm identificado os PPARs como reguladores do metabolismo de lipídios e lipoproteínas, homeostasia da glicose, diferenciação celular e hematopoiese (Chinetti e cols., 2000; Welch e cols., 2003; Prost e cols., 2008). Além disso, os PPARs atuam em processos inflamatórios e imunoregulatórios devido à propriedade de regular a expressão de vários genes implicados na patofisiologia da aterosclerose, inflamação, obesidade, diabetes e resposta imune (Nagy e cols., 1998; Jiang, 1998; Ricote e cols., 1998; Tontonoz, 1998; von Knethen e cols., 2007a).

Os PPARs pertencem à superfamília de fatores transcricionais que, após ativação pelos seus ligantes, regulam diversos aspectos da reprodução, desenvolvimento, homeostasia e funções imunes (Francis e cols., 2003). A superfamília de receptores nucleares inclui três classes: a primeira classe de receptores para hormônios esteroidais, tal como estrogênio e glicocorticóides. A segunda classe, receptores para ligantes não esteroidais, como hormônios da tireóide e ácido retinóico, e receptores que se ligam a diversos produtos do metabolismo lipídico, como os PPARs que obrigatoriamente se heterodimerizam

com o RXR (Valledor and Ricote, 2004). A terceira classe da superfamília dos receptores nucleares inclui um grande número de receptores os quais ainda não têm ligantes endógenos identificados (Chawla e cols., 2001a; Francis e cols., 2003). Vários membros da superfamília dos receptores nucleares têm mostrado um importante papel fisiológico em macrófagos (Chinetti e cols., 2000; Chawla e cols., 2001b; Ricote and Glass, 2001).

Os receptores para hormônios da tireóide, retinóico, vitamina D, PPAR, receptor X do fígado (LXR), são exemplos de receptores nucleares, que se ligam a uma região específica do DNA após se heterodimerizar com RXR. Os PPARs, após se heterodimerizarem com RXR, reconhecem e ligam a regiões específicas no DNA denominada, elemento de resposta aos proliferadores de peroxissomos (PPRE) (Schoonjans e cols., 1997). A estrutura tridimensional do heterodímero formado produz diferentes afinidades de ligação ao DNA. Isto explica as mudanças conformacionais que ocorrem após a ativação desta classe de receptores, sugerindo que as alterações na forma do receptor após a interação com ligante são o passo chave na via de ativação transcricional (Khan and Vanden Heuvel, 2003). Estas mudanças estruturais que ocorrem durante a interação com o ligante são diferentes para ação de agonistas, agonistas parciais (trans-ativação) e antagonistas (trans-repressão). A maioria dos ligantes para os PPARs são lipofílicos e podem facilmente atravessar tanto a membrana plasmática quanto nuclear (Khan and Vanden Heuvel, 2003).

Em 1992 o grupo de Wahli e colaboradores, descreveu os três subtipos distintos de PPARs, denominados; PPAR α , PPAR δ (também chamado β ou NUC-1) e PPAR γ . Cada um destes receptores é codificado por um gene diferente (Wahli e cols., 1995; Auboeuf e cols., 1997). Embora todos os três PPARs sejam expressos amplamente, seus níveis relativos diferem amplamente entre os tecidos, apresentando distintos padrões de expressão e funções biológicas (Desvergne and Wahli, 1999).

Os PPARs são ativados por ligantes, e após se heterodimerizarem com (RXR), recrutam complexos de proteínas que constituem de co-ativadores ou co-repressores para ativação ou repressão transcricional, respectivamente. Uma vez formado, o heterodímero reconhece a região do elemento de resposta PPRE, localizado no promotor do gene alvo (Schoonjans e cols., 1996). Além disso, os PPARs podem inibir a ativação de certos genes da resposta inflamatória, agindo como trans-repressores (Chinetti e cols., 2000). Estas observações sugerem o papel

potencial dos PPARs não somente no metabolismo de lipídios como também no controle da inflamação. Apesar dos PPARs não terem um alvo principal (uma enzima ou uma via distinta) eles parecem atuar por atividades coordenadas em diferentes vias.

O PPAR α , o primeiro a ser descrito, é altamente expresso no fígado, coração, músculos e rim, onde regula o catabolismo de ácidos graxos. O PPAR β é expresso em vários tecidos envolvido em síndromes metabólicas e na fisiopatologia da pele. O PPAR γ apresenta uma complexidade a mais de transcritos em relação ao α e β e pode-se diferenciar em $\gamma 1$ e $\gamma 2$ com expressão e diferenciação específica nos tecidos. O PPAR $\gamma 2$ é encontrado quase exclusivamente em adipócitos, enquanto que o PPAR $\gamma 1$ é encontrado em vários tecidos (Ricote e cols., 1999) (Esquema 1.7).

O PPAR γ é predominantemente expresso em monócitos ativados e macrófagos de tecidos *in vivo*, incluindo células espumosas de lesões ateroscleróticas (Ricote e cols., 1998; Tontonoz, 1998), mas também é encontrado em outras células do sistema imune como células dendríticas (Szatmari e cols., 2007), células musculares do epitélio gastrointestinal, osteoblastos e osteoclastos (Heikkinen e cols., 2007). Múltiplas funções têm sido propostas para o PPAR γ em macrófagos, mas o verdadeiro papel deste fator de transcrição na fisiologia dos macrófagos permanece desconhecido (Chawla e cols., 2001c).

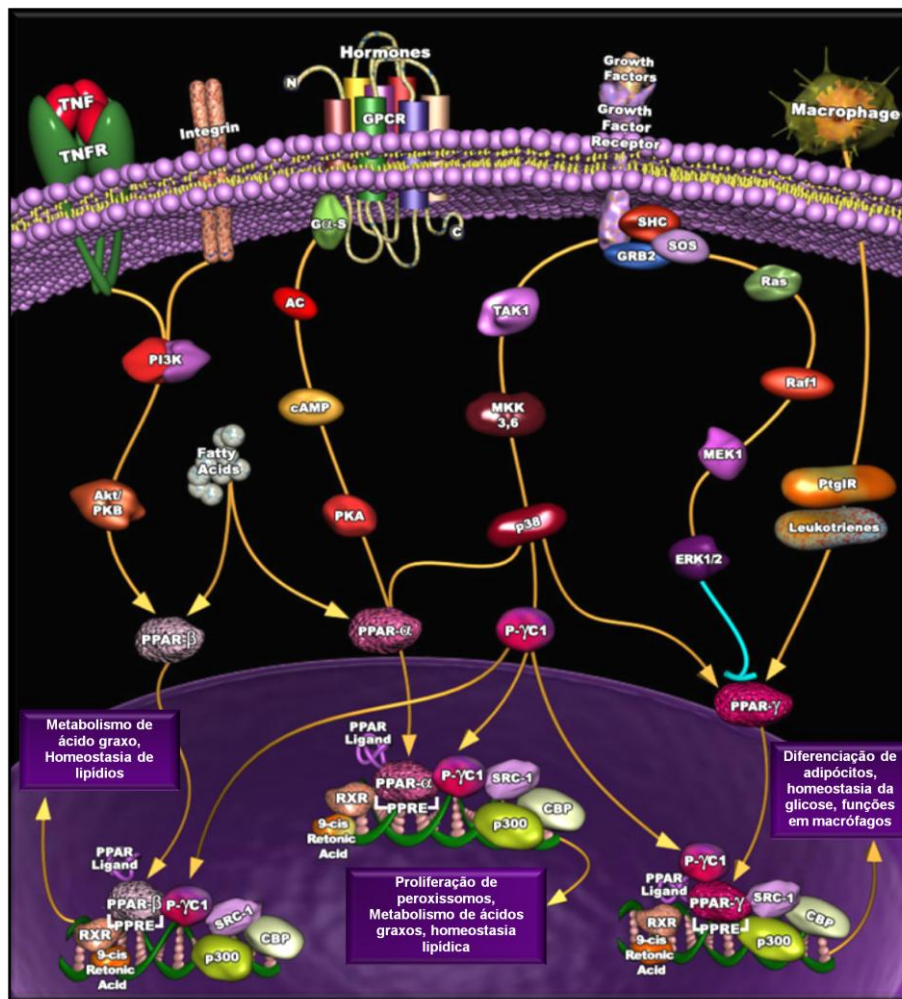
Estudos recentes têm documentado que o PPAR γ e seus ligantes apresentam um importante efeito imunomodulatório em linfócitos B e T, bem como em células dendríticas. O estudo de Szatmari e cols., (2007) documentaram que ligantes de PPAR γ regulam a expressão de proteínas CD1 envolvidas na apresentação de antígenos lipídicos para linfócitos. Outros trabalhos mostram que ligantes de TLR podem mediar diferentes vias de sinalização ativando células dendríticas humanas. Na linha destes achados, Appel e col., (2005) demonstraram que a inibição das vias de ativação de MAPK e NF- κ B estão envolvidas na regulação das vias de sinalização mediadas por TLR e PPAR γ , sugerindo um comprometimento da imunogenicidade de células dendríticas.

Alguns estudos têm mostrado que ácidos graxos poliinsaturados podem ativar PPAR γ bem como outros PPARs (Keller e cols., 1993; Forman e cols., 1997). O PPAR γ é o alvo molecular dos tiazolidinediones (TZDs), uma classe de drogas anti-diabéticas que inclui as rosiglitazonas, como por exemplo o BRL49653, pioglitazona, troglitazonas e ciglitazonas que podem ser usados por proporcionar sensibilidade à

insulina em pacientes diabéticos e são ligantes de alta afinidade para PPAR γ (Forman e cols., 1995; Kliewer, 1995; Lehmann e cols., 1995).

Certos prostanóides, incluindo a PGD₂ e seu metabólito a 15d-PGJ₂, bem como outras prostaglandinas, e o ácido 15-(S)-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) têm sido descritas como ativadores de PPAR γ (Forman e cols., 1995; Huang e cols., 1999). Estes prostanóides são produzidos durante a fase tardia da inflamação devido à regulação de COX-2, uma enzima chave para síntese de prostaglandinas. Além destes prostanóides, ácidos graxos insaturados, como o ácido hidroxi-octadecadeinóico (HODE), 9-HODE e 13-HODE encontrados na oxLDL, também podem ativar PPAR γ (Nagy e cols., 1998).

A ativação de PPAR γ em células THP-1 por 15d-PGJ₂ ou TZDs promove mudanças na expressão de marcadores de superfície característicos da diferenciação de monócitos, incluindo a indução de receptores *scavenger* de classe B o CD36 (Tontonoz, 1998). O primeiro alvo em macrófagos a ser identificado foi o CD36, que serve tanto para o transporte de ácidos graxos, bem como um receptor para oxLDL, epitopos de lipídios oxidados em células apoptóticas e lipoproteínas modificadas (Tontonoz, 1998). Como consequência da indução de CD36 através da ativação de PPAR γ , células THP-1 apresentam um aumento na capacidade de internalizar oxLDL (Nagy e cols., 1998). No entanto, a ação do CD36 na internalização de lipídios parece ser um balanço coordenado pela indução de LXR e outros genes envolvidos no efluxo de lipídios das células (Chawla e cols., 2001b). Essas observações indicam que PPAR γ pode ter um importante papel na diferenciação de macrófagos bem como no metabolismo lipídico em macrófagos.



Esquema 1.6 – Vias de sinalização intracelular ativadas por ligantes de PPARs. Os PPARs são receptores nucleares ativados por ligantes e compreendem três subtipos; o PPAR α , PPAR δ e PPAR γ . Após formar um heterodímero com RXR os PPARs regulam diversos aspectos do desenvolvimento, homeostasia, metabolismo lipídico e funções imunes. Esquema adaptado do site www.biologend.com.

1.5.2) PPAR γ e metabolismo lipídico

O papel dos PPARs na diferenciação de macrófagos e no acúmulo de lipídios intracelular tem sido documentado (Nagy e cols., 1998; Tontonoz, 1998). De fato, ligantes específicos de PPAR γ potencializam significativamente a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por oxLDL, agonistas de PAF e G-CSF, sugerindo que PPAR γ tem um papel fundamental na regulação da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (de Assis e cols., 2003; Inazawa e cols., 2003). Desvergne e Wahli, 1999 demonstraram que os PPARs são capazes de controlar os níveis de ácidos graxos celulares livres, regulando a transcrição de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos quando os níveis destes estão aumentados. Além disso, o PPAR γ participa da ativação transcricional de vários genes envolvidos na adipogênese e lipogênese, mecanismos importantes para a maturação de adipócitos, no acúmulo de lipídios, no transporte de glicose, para a sensibilidade à insulina e na expressão de perilipina (Tontonoz e cols., 1994; Rosen e cols., 1999; Wu e cols., 1999; Arimura e cols., 2004; Sugden and Holness, 2008).

O papel dos PPARs no metabolismo lipídico de macrófagos tem sido caracterizado. de Assis e cols., (2003) observaram que um agonista de PPAR γ , o hexadecil azeloil fosfatidilcolina (azPC), presente em frações fosfolipídicas de oxLDL, induziu um aumento no número de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais. Corroborando estes dados, Nagy e cols., (1998) mostraram que oxLDL induz a expressão de PPAR γ , levando a um aumento da expressão de CD36 na membrana celular, sugerindo a participação de PPAR γ na formação de células de espumosas.

Outros estudos têm hipotetizado que as proteínas PAT podem compartimentalizar ácidos graxos esterificados nos corpúsculos lipídicos, para posterior liberação de ligantes para os PPARs (Wolins e cols., 2006b). De acordo com a hipótese de que as proteínas PAT influenciam os níveis de ácido graxos livres, Arimura e cols., (2004) documentaram que a ativação de PPARs aumentam a transcrição de todos os genes das PAT com exceção da TIP47. Os PPARs podem também controlar a transcrição da ADRP em camundongos e humanos (Edvardsson e cols., 2006; Motomura e cols., 2006). De fato, a região de elemento de resposta (PPRE) do PPAR γ foi identificada dentro da região promotora de transcrição para ADRP e perilipina (Chawla e cols., 2003; Arimura e cols., 2004; Targett-Adams e

cols., 2005). Além disso, foi evidenciado a expressão de S3-12 (Ruan e cols., 2003) e perilipina (Rosenbaum and Greenberg, 1998) com a expressão e a ativação de PPAR γ em adipócitos. Assim, a caracterização de PPRE nas regiões promotoras dos genes que codificam estas proteínas, sugere uma possível interação entre os PPARs e a organização do estoque de lipídios intracelulares.

Trabalhos recentes têm indicado o papel de PPAR γ no desenvolvimento e manutenção do metabolismo lipídico no fígado através de vias que regulam a síntese *de novo* de lipídios (Inoue e cols., 2000; Inoue e cols., 2005). De acordo, estudos de Ohhira e cols., (2007) demonstraram que o LPS induz um acúmulo de lipídios e aumento da expressão da ADRP no fígado, por um mecanismo dependente da oxidação de ácidos graxos e da diminuição da expressão de genes regulados por PPAR α , demonstrando que as endotoxinas são capazes de mimetizar uma infecção e sua administração é suficiente para induzir alterações no metabolismo lipídico de certos órgãos e células, sugerindo que processos infecciosos ou inflamatórios têm correlação direta nos mecanismos moleculares de regulação lipídica.

1.5.3) Participação do PPAR γ na resposta inflamatória e infecção

O papel do PPAR γ na resposta inflamatória é controverso. Vários estudos têm investigado o potencial efeito antiinflamatório de ligantes de PPAR γ em monócitos e macrófagos. De maneira geral, os ligantes de PPAR γ mostram efeitos antiinflamatórios em várias doenças. São exemplos: aterosclerose, obesidade induzida pela resistência a insulina, encefalomielites alérgicas, Parkinson, Alzheimer, psoríase, inflamações intestinais e artrite, para revisão ver (Ricote and Glass, 2007).

O tratamento de macrófagos com altas concentrações de agonistas de PPAR γ reduzem a secreção de citocinas inflamatórias e inibem a ativação de macrófagos (Spiegelman, 1998). Alguns ligantes de PPAR γ têm a capacidade de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-12, IL-1 β e IL-6 (Jiang, 1998; Reddy e cols., 2004). De modo interessante ligantes de PPAR γ protegem órgãos de danos associadas com endotoxemia (Collin e cols., 2004; Kaplan e cols., 2005), componentes da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Dugo L 2004), sepse polimicrobiana (Zingarelli e cols., 2003), choque

induzido por zimosan (Cuzzocrea e cols., 2004), bem como choque hemorrágico (Abdelrahman e cols., 2004).

Estudos têm documentado o papel de PPAR γ na sepse, como um fenômeno ambíguo, com propriedades antiinflamatórias (Kaplan e cols., 2005; Joshi e cols., 2003), que parece ser benéfica no tratamento da sepse, em contraste ao seu possível papel pró-apoptótico que parece ser mais deletério agravando o estado de saúde dos pacientes (von Knethen e cols., 2007a).

O papel de PPAR γ em regular a produção de mediadores lipídicos têm sido demonstrada pela indução da expressão de COX-2 devido à ativação de PPARs (Inoue e cols., 2000; Meade e cols., 1999; Pang e cols., 2003). Trabalhos recentes têm mostrado que antiinflamatórios não esteroidais (AINES), ácidos graxos e prostanóides, compostos que são inibidores, substratos e produtos respectivamente da ativação de COX podem regular a expressão gênica via ativação de PPAR γ (Forman e cols., 1997; Kliewer e cols., 1997).

Estudos de Pang e cols., (2003) demonstraram que AINES podem induzir expressão de COX-2 em células do músculo liso do trato respiratório humano, por mecanismos dependentes da ativação de PPAR γ , e considera que este efeito se mostra dependente do tipo celular e AINES administrado. Por outro lado Inoue e cols., (2000), mostram que o estímulo por LPS induz a expressão de COX-2 e regula negativamente a expressão de PPAR γ (Tabela 1.1).

O papel dos PPARs na resposta do hospedeiro frente a patógenos ainda não se encontra esclarecido. Estudos de Castrillo e cols., (2003) demonstraram que estímulos patogênicos (vírus e bactérias) podem interferir com metabolismo de colesterol em macrófagos através da inibição da via de sinalização de LXR. Esta inibição é dependente de TLR e mediada por IRF3, um fator transcricional ativado especificamente por TLR3 e TLR4 e independente da proteína adaptadora MyD88. A ativação do fator regulatório de interferons-3 (IRF3) é suficiente para bloquear a atividade de LXR na indução da expressão de moléculas proteicas pertencentes à família transportadora (ABC) do cassete de ligação e transporte de ATP 1 (ABCA1), inibindo assim o efluxo de colesterol por macrófagos, e desencadeando a formação de células espumosas. Outros trabalhos mostraram que agonistas de LXR inibem a resposta de macrófagos a patógenos bacterianos interferindo com produção de IL-1 β , iNOS, COX-2, MCP-1 e MCP-3 (Joseph e cols., 2003). Além disso, a interação entre as vias de LXR e PPARs tem sido mostrada com um importante papel na

regulação do efluxo lipídico (Valledor and Ricote, 2004). Dois estudos independentes demonstraram que PPAR α e γ regulam a expressão de ABCA1 promovendo o efluxo de colesterol em macrófagos humanos através de uma cascata transcricional mediada por LXR α .

Nos últimos anos, várias evidências têm sugerido que processos infecciosos podem servir como fator de risco para aterosclerose. Trabalhos têm mostrado que *Chlamydia pneumoniae* induz a formação de macrófagos espumosos em modelos humanos e murinos, efeito este que é mediado pela oxLDL, sugerindo que nestes estudos o microorganismo tem uma implicação como um agente causal na aterosclerose (Kalayoglu and Byrne, 1998; Kalayoglu e cols., 1999).

Estudos de He e cols., (2008) e Mei e cols., (2008) documentaram que a infecção por *Chlamydia pneumoniae* pode induzir a formação de macrófagos espumosos na presença de LDL. Estes autores demonstraram que *C. pneumoniae* regula negativamente a expressão de PPAR α e PPAR γ de modo dependente da dose quando em co-cultura com LDL em células THP-1. Este efeito foi revertido pelo tratamento com altas doses de agonistas de PPAR α e PPAR γ . Em contrapartida, estudos deste mesmo grupo demonstraram que *C. pneumoniae* pode induzir aumento de expressão de PPAR γ em células musculares lisas. Desta maneira, os autores sugerem que esta discrepância pode ser devido a diferentes tipos celulares, especificidade ou por outros fatores ainda desconhecidos.

A participação dos PPARs em processos infecciosos desencadeados por micobactérias ainda não se encontra caracterizado. Assim, este trabalho visa mostrar pela primeira vez a relação deste receptor com a infecção por *M. bovis* (BCG), bem como seu papel no fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos, uma vez que estes mecanismos ainda não se encontram totalmente estabelecidos.

Tabela 1.1 – Papel do PPAR γ na resposta imune de macrófagos

PPARγ E RESPOSTA IMUNE EM MACRÓFAGOS
I. Expressão de PPARγ
<ul style="list-style-type: none">- Células não ativadas (em baixos níveis).- Macrófagos humanos e murinos ativados.- Macrófagos tratados com IL-4.- Em células dendríticas murinas.
II. PPARγ: Ativação de Macrófagos <i>in vitro</i>
<p>⇒ Efeitos Antiinflamatórios: ativação por ligantes de PPARγ resultam em:</p> <ul style="list-style-type: none">- Diminuição de citocinas inflamatórias (IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-10, IL-12, gelatinase B).- Diminuição na expressão de iNOS e genes relacionados a SRA.- Apoptose em macrófagos humanos. <p>⇒ Efeitos Pró-inflamatórios: ativação por ligantes de PPARγ resultam em:</p> <ul style="list-style-type: none">- Regulação de receptores de superfície como, (CD14,CD11b/CD18, CD36, SR-B1).

Fonte: Adaptado de Clark, (2002), Journal of Leukocytes Biology.

2) OBJETIVOS E METAS

2.1) Objetivo geral

- Estudar o envolvimento do receptor TLR2 e do receptor nuclear PPAR γ na resposta do hospedeiro frente à infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG.

2.2) Objetivos específicos

- Estudar a formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios durante a infecção por *Mycobacterium bovis*, BCG *in vitro*.
- Analisar a expressão de PPAR γ durante a infecção micobacteriana.
- Avaliar a participação de PPAR γ na ativação celular após a infecção por BCG.
- Estudar o papel do receptor TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos, na produção de PGE₂, citocinas e na expressão de PPAR γ .
- Analisar o papel de possíveis co-fatores de TLR2, como o CD14, CD11b/CD18, e *lipid rafts* na formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios durante a infecção micobacteriana.
- Estudar a participação do receptor CD36 na ativação de macrófagos desencadeada por *M. bovis*, BCG.
- Avaliar o papel da dectina-1, um receptor de β -glicanos, na ativação de macrófagos durante o reconhecimento micobacteriano.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Animais:

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 ou C57Bl/10 fornecidos pelo biotério central da Fundação Oswaldo Cruz. Os camundongos deficientes de receptor do tipo TLR2 e TLR6 foram gentilmente doados por Dr. Ricardo Gazzinelli (UFMG, MG, Brasil), e os deficientes para TLR4 (ScCr) fornecidos pela Universidade Federal Fluminense. Os animais fêmeas ou machos adultos, com peso entre 20 a 25 g foram mantidos em gaiolas plásticas em micro-isoladores com livre acesso à água e ração, em uma sala com temperatura de 22 a 24^oC, com ciclos de 12 h luz/escuro no Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica.

Todos os procedimentos experimentais seguiram as recomendações da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Fiocruz, protocolo L002/08.

3.2) Estímulos micobacterianos:

As micobactérias (*Mycobacterium bovis*, BCG), cepa Moreau, liofilizadas em ampolas de 40 mg contendo aproximadamente 2×10^8 bacilos, foram fornecidas pela Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro. Os bacilos liofilizados foram estocados a 4^oC. O *Mycobacterium smegmatis* (mc2155), foi estocado a -70 °C. Na hora do uso, os bacilos foram ressuspensos em RPMI-1640 estéril a uma concentração de 5×10^7 unidades formadoras de colônia (UFC)/mL, misturados vigorosamente, e sonicados por 5 min. Nós utilizamos a taxa de multiplicidade de infecção (MOI) de 0,05:1; 0,1:1 ou 1:1 (bacilo/célula).

Mycobacterium bovis, BCG – GFP foi gentilmente fornecido por Dr. Michael A O'Donnell, Universidade de Iowa, cidade de Iowa, IA, USA.

3.3) Pleurisia induzida por BCG

Os animais normais ou deficientes foram infectados intratoracicamente com BCG (5×10^6 bacilo/cavidade) em 100 µL salina estéril. Os animais controles

receberam volume igual a 100 μ L de salina estéril. Após 24 horas os animais foram mortos em câmara de CO₂ e tiveram suas cavidades lavadas com 1 mL de PBS heparinizado (10 UI/mL). Para avaliar o envolvimento da ativação de CCR3, os animais foram pré-tratados com injeções intraperitoneais de anti-eotaxina (10 μ g/cavidade), ou anti-CCR3 (10 μ g/cavidade) (R&D Systems) 30 min antes da infecção por BCG.

3.4) Contagem de leucócitos totais:

As cavidades peritoneais dos camundongos foram lavadas com 3,0 mL RPMI-1640 estéril contendo antibiótico (penicilina e estreptomicina) sem soro fetal bovino (SFB) para a obtenção dos macrófagos normais. As suspensões de leucócitos provenientes da cavidade, foram mantidas sob refrigeração e diluídas na proporção de 1:40 em solução de Turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise de hemácias e coloração dos leucócitos. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio de campo claro e expressa em milhões de células/mL.

3.5) Análise de eosinófilos

O número de células do lavado pleural foi contado em câmara de Neubauer, após a diluição em solução de Turk. A análise de eosinófilos foi realizada nos citosfregaços (Citocentrífuga, Shandon, Pittsburg) (140 x g), corados por May-Grünwald-Giemsa e analisados em microscopia de campo claro.

3.6) Cultura de macrófagos e infecção *in vitro*

Após a contagem total as células do lavado peritoneal foram centrifugadas a 1200 rpm a 4°C por 10 min. Após este procedimento, as células foram

ressuspendidas em RPMI-1640 (Hyclone) completo (2% SFB, 1% de penicilina e estreptomicina 100 UI/mL concentração final) e incubadas a 37°C na atmosfera de 5% CO₂, em placas de 6 ou 24 poços, estas contendo lamínulas de 13 mm no fundo de cada poço. Em cada um dos poços das placas de 24, foram adicionados 1,0 mL da suspensão celular ajustada para 1 x 10⁶ células/mL ou 4 x 10⁶ células/mL para as placas de 6 poços.

Após 2 h, as células não aderidas foram removidas através de duas lavagens com RPMI-1640. Posteriormente, os macrófagos foram estimulados com diferentes concentrações de BCG MOI (0,05:1) (0,1:1) ou (1:1), ou por agonistas de TLR2; *M. smegmatis* (1:1), zimosan (1:1), Pam₃cys (10 µM), LAM (300 ng/mL), ou por agonista de TLR4, o LPS (500 ng/mL) os controles receberão o veículo. Após 1 h, os bacilos não internalizados e estímulos não aderidos ou internalizados, foram removidos por 2 lavagens com RPMI-1640. Posteriormente, os macrófagos tiveram os tratamentos reconstituídos em meio RPMI-1640 completo onde permaneceram por distintos tempos de infecção (2, 6, 12, 24 ou 48 horas) a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após estes tempos, os sobrenadantes das culturas foram removidos e armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas e mediadores lipídicos.

3.7) Tratamentos com agonistas ou antagonistas de PPAR_γ, e com anticorpos neutralizantes.

Os tratamentos foram realizados 30 min antes da incubação com BCG. Os macrófagos normais e infectados foram tratados com diferentes concentrações de agonista de PPAR_γ, o BRL49653 (Cayman Chemical), na concentração final de (5 µM) ou antagonista, o GW9662 (Cayman Chemical), na concentração final de (1 µM), ambos ressuspendidos em DMSO e na hora do uso diluídos em RPMI-1640 completo, os controles receberam apenas o veículo.

Os anticorpos usados para o ensaio de neutralização dos receptores foram diluídos diretamente em RPMI-1640 completo na concentração final de anti-CD14 e anti-CD11b/CD18 (BD Pharmingen) 10 µM; anti-CD36 (Cayman Chemical) concentração final 2 µg/mL, e anti-dectina-1 (Hycult biotechnology) na concentração final de 2 µg/mL. As drogas que desestruturam *lipid rafts*, methyl-β-ciclodextrina

(M β CD) (Sigma Aldrich) ou filipina (Sigma Aldrich) foram ressuspendidas em água MilliQ estéril e na hora do uso diluídas em RPMI-1640 completo na concentração final de (15 μ g/mL) ou (2 μ g/mL) respectivamente. Os tratamentos cujo veículo foi o DMSO, o (DMSO 0,01% em RPMI) foi usado como controle.

3.8) Contagem de corpúsculos lipídicos

As lamínulas contidas nas placas de 24 poços dos grupos controle ou infectados (2, 6, 12, 24 ou 48 h), tratados ou não, foram fixados em formaldeído 3,7% em PBS (pH 7,4), em seguida, lavados em tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) e fixados em tetróxido de ósmio a 1,5% por 30 min. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas em água destilada, tratadas com tetróxido de ósmio a 1,5% reduzido por tiocarbohidrazida a 1% por 5 min. Em seguida, as lamínulas foram lavadas em água destilada e tampão cacodilato 0,1 M e contrastadas em tetróxido de ósmio a 1,5% por 3 min, lavadas novamente com água destilada e montadas com o meio “Aqua Polymount” (Vector). As análises para quantificação dos corpúsculos foram feitas em microscópio de campo claro (objetiva de 100X). Foram contados os corpúsculos lipídicos obtidos de 50 células de campos consecutivos.

3.9) Lise celular e dosagem de proteínas

Após cada tempo de estimulação, os sobrenadantes foram recolhidos e estocados a -70°C, e os macrófagos aderidos lavados 2 vezes com PBS 1X (pH 7,4). Após esta lavagem, 50 μ l de tampão de lise celular/(1 X 10⁶ células): 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 16 mM CHAPS (detergente); 0,5 mM dithiothreitol (agente redutor); 1 mM EDTA (inibidor de metaloprotease); 1 mM benzamidina HCl (inibidor de soro protease); 1 μ g/mL de leupeptina (inibidor de thiol protease); 10 μ g/ml soybean (inibidor de tripsina), foi adicionado e as células lisadas mecanicamente por raspagem. O lisado celular foi centrifugado em microcentrífuga (eppendorf) a 800 g/10 min e o sobrenadante armazenado a -20°C. As proteínas foram dosadas pelo “kit” de dosagem de proteína BCA (Pierce) de acordo com o protocolo fornecido pelo

fabricante. Aplicamos 20 μg de proteínas totais de cada amostra ou 60 μL do lisado total no gel.

3.10) Western blotting

A suspensão celular foi submetida à eletroforese em SDS-PAGE (em gradiente de acrilamida 10%) e transferida para uma membrana de nitrocelulose umedecida em metanol e tampão de transferência (100 mL de 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8 quando dissolvidos em 80 mL de H_2O MiliQ e 20 mL de metanol). A transferência foi feita a 17 Volts por 60 min em sistema semi-seco (Trans-Blot Semi Dry). Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h ou por ± 16 h com solução bloqueadora de leite 5% em TBST (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST, e incubada por 1 h ou por ± 16 h com o anticorpo primário anti-PPAR γ (clone H100, ou clone E8 Santa Cruz Biotechnology) diluição 1:500, para CD36 usamos anticorpo policlonal anti-CD36 (Cayman Chemical) 1:400 e, como controle positivo experimental, usamos um anticorpo monoclonal anti- β -actina (BD Transduction Laboratories) na concentração de 1:5.000. Após este tempo, as membranas foram lavadas com TBST, e as proteínas de interesse foram então identificadas pela incubação da membrana com anticorpos secundários anti-coelho ou anti-camundongo (Pierce), conjugado a peroxidase (HRP) diluídos na hora do uso na concentração de 1:10.000. Todos os anticorpos primários e secundários foram diluídos em TBST. A detecção foi feita com o sistema de análise de “Western blotting “Supersignal Chemiluminescence” (Pierce) e a membrana exposta a filme de autoradiografia (Kodak MR biomax).

3.11) Dosagem de PGE₂

Os níveis de PGE₂ nos sobrenadantes das culturas foram avaliados por ensaio imunoenzimático conforme as instruções do fabricante (Cayman Chemical, Inc). Placas de 96 poços foram cobertas com 200 μl de anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo diluído em tampão fosfato de potássio (0,05 M) durante o período de

uma noite. No dia seguinte, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com adição de 200 µl de tampão fosfato de potássio (0,05 M) com BSA 1% e a placa foi mantida sob agitação, por 4 horas. Após este tempo a placa foi lavada com Tween 20 a 0,05% em PBS. Em seguida, foram adicionados 50 µl das amostras previamente diluídas em EIA Buffer 1:200 ou 50 µl da PGE₂ na curva-padrão (1 ng/ml, 500, 250, 125, 63, 31 e 16 pg/ml diluídos tampão fosfato de potássio 0,05 M com BSA 1%). O anticorpo anti-PGE₂ (50 µl) e a PGE₂ conjugada com colinesterase foram adicionados e incubados durante cerca de 16 h. O branco recebeu somente o tampão fosfato com 1% de BSA e a PGE₂ conjugada com colinesterase. Após esta etapa, a placa foi lavada (5x) com tampão fosfato contendo Tween 20 a 0,05%. Em seguida, foram adicionados 200 µl do reagente de Elmans, que contém o substrato para a enzima colinesterase (diluído em água MilliQ, segundo instruções do fabricante), para revelar a reação. A placa foi mantida sob agitação durante 2 h e lida em leitora de placa a 405 nm. Os dados foram analisados com o programa Soft Max Pro, e a dosagem baseada na respectiva curva-padrão.

3.12) Dosagem de citocinas (LUMINEX)

Os níveis das citocinas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-17, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, KC, MIP-1 α , RANTES, TNF- α) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foram dosados pelo sistema “Bio Plex System”, capaz de analisar múltiplas citocinas simultaneamente, conforme instruções do fabricante Bio-Rad. As amostras (50 µl) foram diluídas em tampão de diluição, adicionadas aos poços de uma placa de 96 poços com filtro Multiscreen-BV (Milipore Corporation, Bedford, MA).

O ensaio consiste de análise enzimática onde microesferas de poliestireno conjugadas com anticorpos monoclonais para citocinas alvo, são adicionadas nos poços juntamente com as amostras. As amostras foram incubadas com 50 µl da mistura de microesferas acopladas aos anticorpos específicos (2000 microesferas/poço) à temperatura ambiente por 90 min sob agitação ao abrigo da luz. Os poços foram lavados três vezes com 100 µl de tampão de lavagem e a seguir, foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado (25 µl/poço), incubado por

90 min à temperatura ambiente no escuro. Posteriormente foi adicionada estreptavidina acoplada ao fluoróforo (25 µl/poço) e incubada por 10 min à temperatura ambiente. Os marcadores não ligados foram lavados utilizando-se um sistema de filtragem a vácuo. Após a última lavagem, 125 µl do tampão de ensaio foram adicionados a cada um dos poços. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um citômetro constituído de 2 feixes de lasers associados, com a capacidade de medir reações bioquímicas que ocorrem na superfície das microesferas, de onde é emitido um sinal de fluorescência analisado digitalmente. As intensidades de fluorescência das amostras são comparadas com a respectiva curva padrão e analisadas no sistema Bio-Plex (Bio-Rad, Hercules, CA) conforme as instruções do fabricante, sendo as análises dos dados efetuadas através do “Bio-Plex Manager software”.

3.13) Ensaios de Imunolocalização

3.13.1) Imunolocalização de PPAR γ , NF- κ B e TIRAP em macrófagos peritoneais

Após os tempos de estímulos (24 e 48 h) as culturas de macrófagos infectados ou não pelo BCG, foram fixadas em formalina 3% por 10 min, posteriormente as células foram lavadas com PBS, permeabilizadas em Triton 0,05% por 20 min. Após a permeabilização as células foram lavadas 2X com PBS e incubadas com solução de bloqueio, anticorpo de burro (Jackson Laboratories) 1% em PBS por 20 min. Posteriormente incubamos com os anticorpos primários, diluídos na mesma solução de bloqueio, para PPAR γ (clone H-100, Santa Cruz) na concentração final de 2 µg/mL, ou PPAR γ (clone E-8, Santa Cruz) concentração final 2 µg/mL, para o NF- κ B, (Santa Cruz Biotechnology) na concentração final 2 µg/mL e para o TIRAP (eBioscience) na concentração final 2 µg/mL após esta incubação as células foram lavadas 3X com PBS e incubadas com os anticorpos secundários, diluídos na solução de bloqueio. Os anticorpos secundários estavam conjugados com os fluoróforos, (anti-coelho cy3) diluídos 1:3000, (anti-mouse cy3) diluídos 1:3000, ALEXA546 (Molecular Probes) diluídos 1:1000. O 1-ácil -2- (7-octil

BODIPYTM-1- pentanoil) – sn – glicerol (BODIPY 493/503), diluição de uso 1:250, este marcador é um ácido graxo fluorescente que penetra nas células e se incorpora eficientemente tanto em lipídios neutros, quanto em fosfolipídios marcando os corpúsculos lipídicos diretamente.

As especificidade das marcações foram feitas usando controles negativos pelo uso de isotipos controles IgG de coelho no lugar dos anticorpos primários ou com soro de coelho, ou soro de cabra (Jackson Laboratories). A contra-coloração do núcleo foi feita com DAPI (Sigma-Aldrich) na diluição 1:5000 em PBS, por cinco minutos. Posteriormente lavamos 3X com PBS por 10 min. As lamínulas foram montadas em meio de montagem “Aqua Polymounting” (Vector) e analisadas ao microscópio de fluorescência OLYMPUS equipado com câmera digital e processadas pelo programa “ImagePro”, ou analisadas por microscopia confocal no programa CLSM (LSM 510-META, Zeiss).

3.13.2) *Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos humanos*

Os macrófagos humanos derivados de monócitos (6×10^6 células/grupo), não infectados ou infectados com BCG-GFP, foram centrifugados e o pelete formado foi fixado em 4% de paraformaldeído (PFA) pH 7.3 por 24 h a 4°C. Cada bloco celular obtido foi embebido em parafina. Após o emblocamento foram realizados cortes por microtomia e a montagem do material em lâminas de vidro. Posteriormente foi realizada a desparafinização, e re-hidratação, a marcação foi feita com anticorpo monoclonal para PPAR γ (clone E8, Santa Cruz Biotechnology), na diluição de 1:75. O PPAR γ foi detectado pela incubação das secções por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo primário, seguida pela marcação com anticorpo secundário anti-mouse IgG-F (ab), conjugado a peroxidase (HRP).

A visualização foi feita com um kit de amplificação de fluorescência vermelha conjugado a tiramidina usando o tetrametil-rodamina (sistema TSA-TMR, Perkin Elmer Life Science). A contra-coloração do núcleo foi feita com DAPI (Vector). Para medir a especificidade da coloração, controles negativos foram realizados pelo uso do isotipo correspondente a IgG controle (Dako, Glostrup) no lugar do anticorpo primário.

Os controles positivos para marcação de PPAR γ foram feitos com secções de

tecido adiposo humano que exibiam marcações (colorações) nucleares na maioria dos adipócitos. As imagens de fluorescência foram obtidas usando um microscópio Olympus BX51 equipado com câmera digital. As imagens de fluorescência foram capturadas por uma simples exposição onde foi possível visualizar simultaneamente o verde (a presença da micobactéria-GFP), o vermelho (para o PPAR γ), junto com o azul (do núcleo, DAPI). As imagens foram processadas, pelo software “Viewfinder Studio Lite” versão 1.0.136 de 2001, (Pixera, UK Digital Imaging Systems).

3.14) Análises de citometria de fluxo

Após 24 h de infecção, os macrófagos aderentes foram removidos por tratamento com EDTA 6 mM (Gibco) por 20 min no gelo. Após a remoção, os macrófagos foram lavados com PBS gelado e centrifugados a 1500 rpm a 4°C por 10 min. Após este procedimento, as células foram fixados em PFA 4% por 10 min, centrifugadas novamente e incubadas com o BODIPY 493/503 (Molecular Probes, 1 μ M) por 15 min a 37°C. A fluorescência dos corpúsculos lipídicos foi medida no canal de FL1 (fluorescência do BODIPY).

Para a análise da expressão de CD36 após a fixação com PFA, as células foram lavadas 2X com PBS e permeabilizadas com 0,2% Triton em PBS por 20 min. Após esta incubação, as células foram centrifugadas a 1500 rpm 4°C por 10 min, lavadas 1X com PBS, novamente centrifugadas e posteriormente bloqueadas com soro normal de burro 1% em tampão de citometria (PBS1X e SFB 2%) por 20 min. Posteriormente, as células foram novamente centrifugadas a 1500 rpm a 4°C por 10 min, e incubadas com anticorpo primário anti-CD36 conjugado ao fluoróforo FITC (Cayman Chemicals) na diluição 1:50. A intensidade de fluorescência foi obtida no canal de FL1 (fluorescência do CD36-FITC).

As análises foram realizadas em citometria de fluxo no FACS Calibur Sistema de citometria de fluxo (Becton Dickinson) a partir de 10.000 eventos (células) adquiridos por amostra. As análises dos dados quantitativos foram realizadas usando os softwares BD CellQuest Pro software (BD Biosciences) e o programa de análise WinMDI.

3.15) Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo foram comparados através do teste de ANOVA e Newman-Keuls, considerando significativos os valores de $p < 0,05$.

4) RESULTADOS

4.1) *Mycobacterium bovis*, BCG induz a formação de corpúsculos lipídicos em paralelo com o aumento da síntese de PGE₂ em macrófagos peritoneais de camundongos

A formação de corpúsculos lipídicos pode ser desencadeada por vários estímulos inflamatórios e infecciosos. Estudo de D'Avila e cols., (2006) demonstraram que a infecção por BCG *in vivo* induz a formação de corpúsculos lipídicos e que estas estruturas se apresentam como sítios intracelulares das enzimas formadoras de eicosanóides, como 5-LO e COX-2, e da síntese de mediadores lipídicos.

Com base nestes dados, avaliou-se o efeito da infecção *in vitro* com doses significativamente inferiores às utilizadas *in vivo*, analisando não só a dinâmica de formação de corpúsculos lipídicos através da coloração por ósmio, como também os níveis de PGE₂, quantificados no sobrenadante das culturas por ensaio imunoenzimático (EIA). O *M. bovis*, BCG, induziu um aumento do número de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais de modo dependente do tempo estudado, mostrando-se significativo a partir das 6 horas até 24 horas de infecção (Fig. 1).

Na figura 2B, observa-se os corpúsculos lipídicos em macrófagos por microscopia de campo claro após 24 horas de infecção. Nos macrófagos não estimulados não foi possível visualizar a coloração destas organelas (Fig. 2A). Este fenômeno foi acompanhado pelo aumento da produção de PGE₂ (Fig. 3). Os níveis de PGE₂ avaliados nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais apresentaram-se aumentadas já nas primeiras horas após a infecção (2 h), com aumento às 6 horas (em torno de 25%), 12 h e 24 horas (aproximadamente 50%) em relação às células não infectadas.

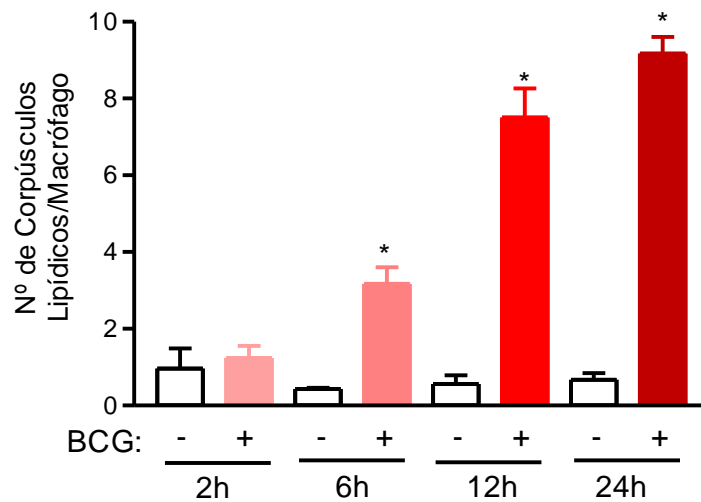


Figura 01 – Cinética de formação de corpúsculos lipídicos às 2, 6, 12 e 24h após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram infectados ou não por BCG, MOI de 1 (1 UFC:1 macrófago) e incubados a 37⁰C na presença de 5% de CO₂, durante os tempos indicados. Após estes tempos as células foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG; ($p < 0,05$).

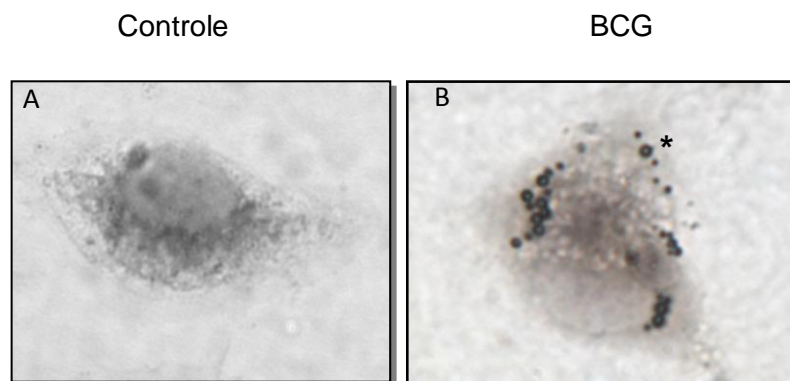


Figura 02 – Imagem de macrófagos peritoneais estimulados ou não por BCG, *in vitro* corados por ósmio: Os macrófagos peritoneais de camundongos foram cultivados e infectados ou não por BCG, MOI de 0,1 e incubados a 37^oC na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. A análise foi realizada em microscópio de campo claro. (A) Macrófago controle; (B) macrófago infectado por BCG. O asterisco indica um corpúsculo lipídico observado como organela citoplasmática osmiofílica.

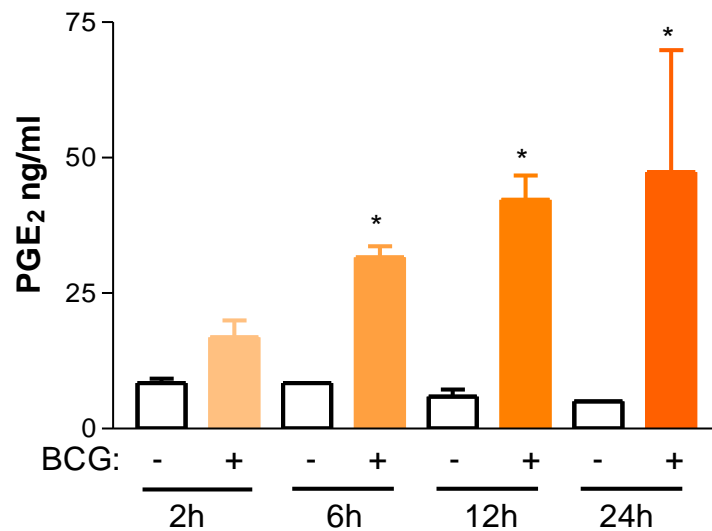


Figura 03 – Cinética da produção de PGE₂, às 2, 6, 12 e 24h após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram infectados ou não por BCG, MOI de 1, incubados a 37⁰C na presença 5% de CO₂, durante os tempos analisados, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG; ($p < 0,05$).

4.2) Avaliação da expressão de PPAR γ em macrófagos durante a infecção por BCG *in vitro*

Vários estudos têm relacionado a participação deste receptor em doenças como diabetes e aterosclerose, com importante destaque para a formação de células espumosas. Nos últimos anos vários trabalhos têm documentado um papel contraditório com relação às vias de sinalização desencadeadas por PPAR γ durante processos inflamatórios e infecciosos.

Nas análises de *Western blotting* verificou-se a expressão de PPAR γ durante a infecção desencadeada pelo BCG *in vitro*. A figura (4) mostra que a infecção por BCG *in vitro*, induz aumento da expressão de PPAR γ e este aumento se mostrou dependente do tempo de infecção, mostrando um considerável aumento da expressão de PPAR γ já a partir de 2 h, e principalmente entre 12 e 24 horas de infecção, o que não acontece nos macrófagos dos grupos controle, onde a expressão de PPAR γ é quase indetectável.

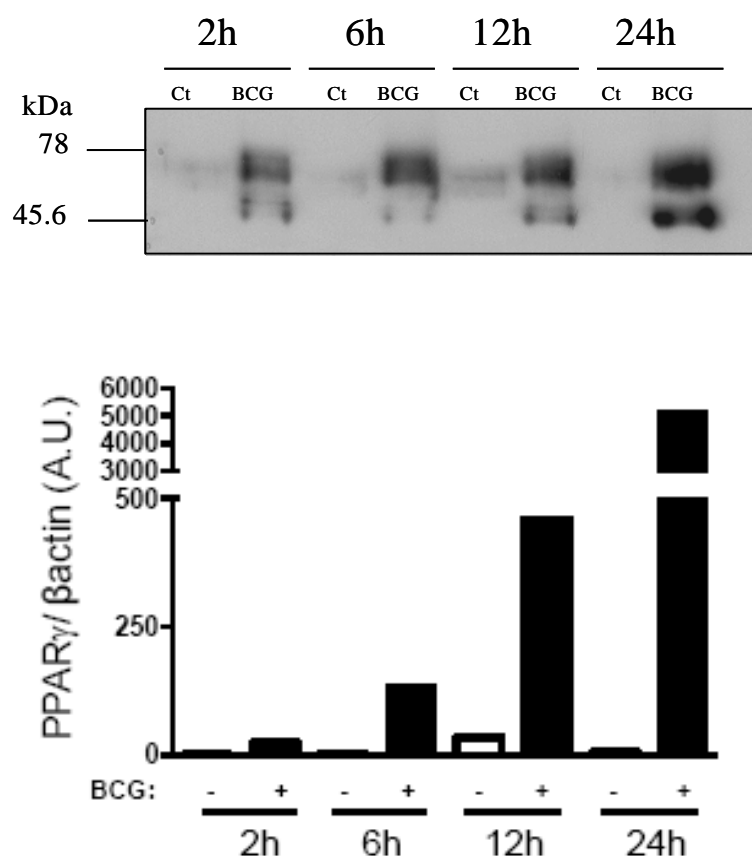


Figura 04 – Análise da expressão de PPAR γ por “Western blotting” em macrófagos infectados com BCG *in vitro*. As raias estão representadas pelos grupos não infectados (ct) ou infectados com BCG, MOI de 1 (1 UFC:1 Macrófago). Pode-se observar que o BCG induz aumento da expressão de PPAR γ (57 KDa) que foi dependente do tempo de infecção analisado, máximo de expressão após 24 horas de infecção. Para a separação das proteínas, os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, foram aplicados 20 μ g de proteínas totais. Para a detecção de PPAR γ utilizou-se anticorpo policlonal de coelho anti-PPAR γ , diluição (1:500) ou anti- β -actina (1:5.000). O gráfico representa a análise densitométrica das bandas de PPAR γ relacionadas com as respectivas bandas de β -actina (unidades arbitrárias, das bandas de “Western blotting”).

4.2.1) Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos humanos infectados por BCG após 24 h

Na figura 5 observa-se os macrófagos humanos diferenciados de monócitos purificados do sangue periférico, em microscopia de fluorescência. Neste experimento o BCG-GFP, induz expressão do PPAR γ bem como a sua translocação para o núcleo celular marcado com DAPI (Fig. 5B), diferente do observado para as células que não foram infectadas (Fig. 5A).

Apesar de não termos realizado marcações específicas para os fagossomos, foi possível observar em contraste de fase algumas imagens com uma localização intracelular de PPAR γ nas proximidades de estruturas sugestivas de fagossomas bacteriano [Fig. 6 (seta) e 7].

Nosso laboratório tem demonstrado que os corpúsculos lipídicos são sítios intracelulares de enzimas como COX-2 e representam locais para síntese de mediadores lipídicos, como PGE₂. Assim, a hipótese inicial era a de que o receptor PPAR γ que é ativado por lipídios pudesse estar co-localizado nos corpúsculos lipídicos. Entretanto, na figura (8C) verificou-se que o PPAR γ não se localiza em corpúsculos lipídicos marcados por BODIPY. Os corpúsculos lipídicos foram marcados com o BODIPY (1:250) (Fig. 8A e D) e o PPAR γ com anticorpo de coelho contra PPAR γ de camundongo (Fig. 8B e E).

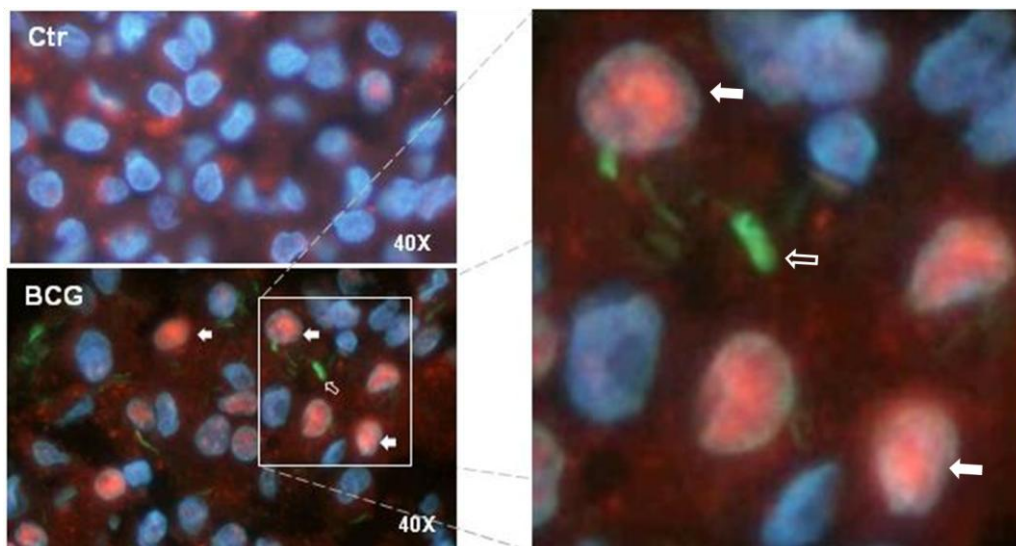


Figura 05 - Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos humanos controles ou infectados por BCG 24h. Imunolocalização de PPAR γ no núcleo dos macrófagos humanos infectados por BCG-GFP. As setas cheias indicam marcação do PPAR γ no núcleo dos macrófagos infectados pelo BCG e a seta vazia indica BCG marcado com GFP. A contra-coloração do núcleo foi feita por DAPI.

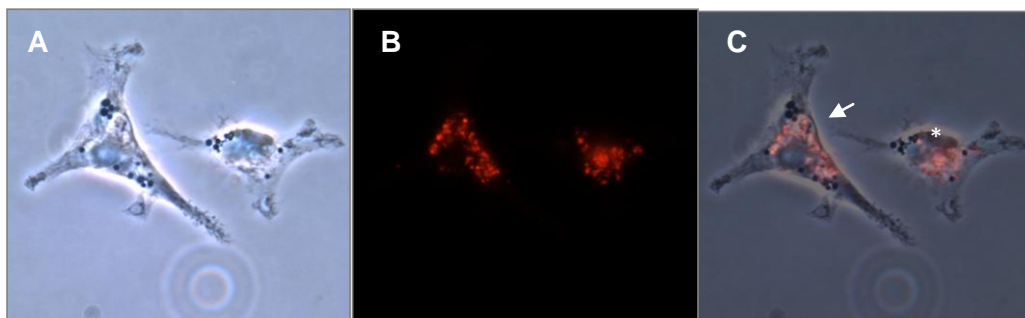


Figura 06 - Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos peritoneais de camundongos infectados por BCG 24h. (A) Macrófago visualizado em contraste de fase, (B) imunolocalização de PPAR γ , revelado por um anticorpo primário de coelho contra camundongo anti-PPAR γ e o anticorpo secundário contra coelho fluorescente cy3. (C) Na imagem de sobreposição podemos observamos que o PPAR γ parece tanto localizado ao redor de estruturas sugestivas de fagossoma bacteriano (seta) ou no núcleo (asterisco), aumento de 100X.

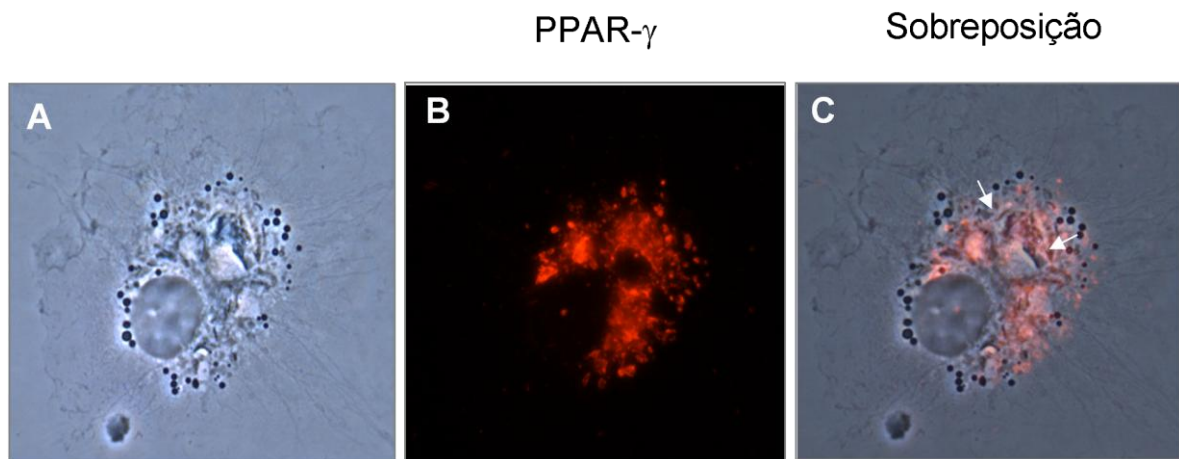


Figura 07 - Imunolocalização de PPAR γ em macrófago infectado por BCG 48 h. (A) Macrófago visualizado em contraste de fase; (B) imunolocalização de PPAR γ revelado por um anticorpo primário de coelho contra camundongo anti-PPAR γ e o anticorpo secundário contra coelho fluorescente Cy3. (C) Na imagem de sobreposição podemos observamos que o PPAR γ se encontra preferencialmente localizado ao redor de estruturas sugestivas de fagossomo bacteriano e em suas proximidades (setas), aumento de 100X.

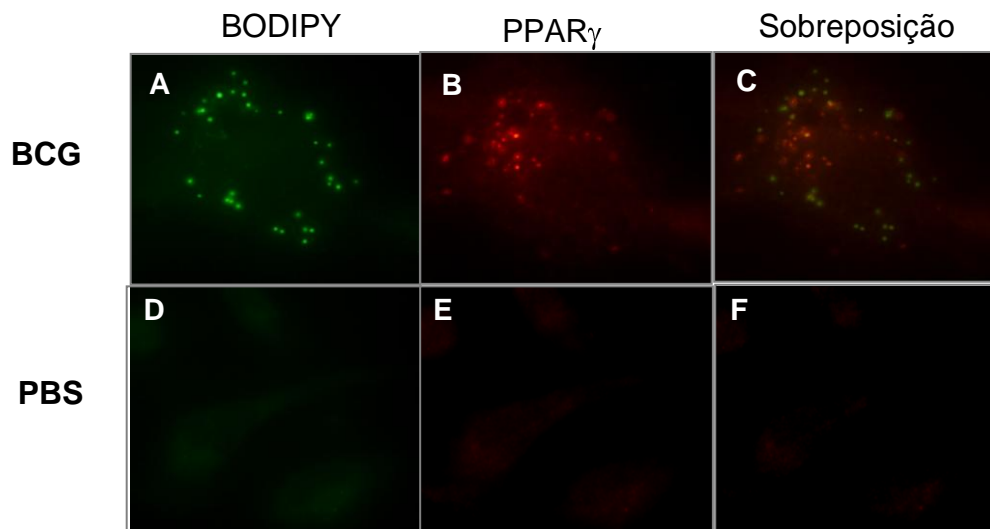


Figura 08 - Imunolocalização de PPAR γ em macrófagos controles (PBS) e infectados por BCG 24 h. Imunolocalização de (A e D) corpúsculos lipídicos por Bodipy e (B e E) PPAR γ revelado por um anticorpo primário de coelho contra camundongo anti-PPAR γ e o anticorpo secundário contra coelho fluorescente Cy3. Na imagem de sobreposição (C) podemos observamos que o PPAR γ não se co-localiza com os corpúsculos lipídicos, aumento de 100X.

4.2.2) Análise da participação de PPAR γ na ativação celular desencadeada pela ação de agonistas durante a infecção por BCG *in vitro*

Os agonistas de PPAR γ são capazes de induzir um acúmulo de lipídios em células monocíticas levando à formação de células espumosas (Tontonoz, 1998). Neste estudo utilizou-se o BRL49653 (5 μ M), um agonista seletivo de PPAR γ , no tratamento de macrófagos *in vitro*.

Avaliamos se a sinalização intracelular desencadeada por PPAR γ está envolvida na infecção por BCG, nós observamos que a infecção com doses sub-ótimas de BCG, MOI 0,05 (1 micobactéria:20 Macrófagos), foi capaz de induzir um aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos, bem como o pré-tratamento dos macrófagos com BRL induziu a formação destas estruturas. Além disso, este agonista foi capaz de induzir um efeito aditivo na formação dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos infectados mesmo com doses sub-ótimas de BCG (Fig. 9A). Uma vez que BRL49653 (5 μ M) age de modo aditivo com baixas doses de BCG na indução da formação de corpúsculos lipídicos, foi avaliado o efeito deste agonista sobre a produção de PGE₂, 24 horas após a infecção. A pré-estimulação com BRL, também foi capaz de induzir a produção de PGE₂ (Fig. 9B) de modo similar ao observado para a formação dos corpúsculos lipídicos durante a infecção micobacteriana (Fig. 9A).

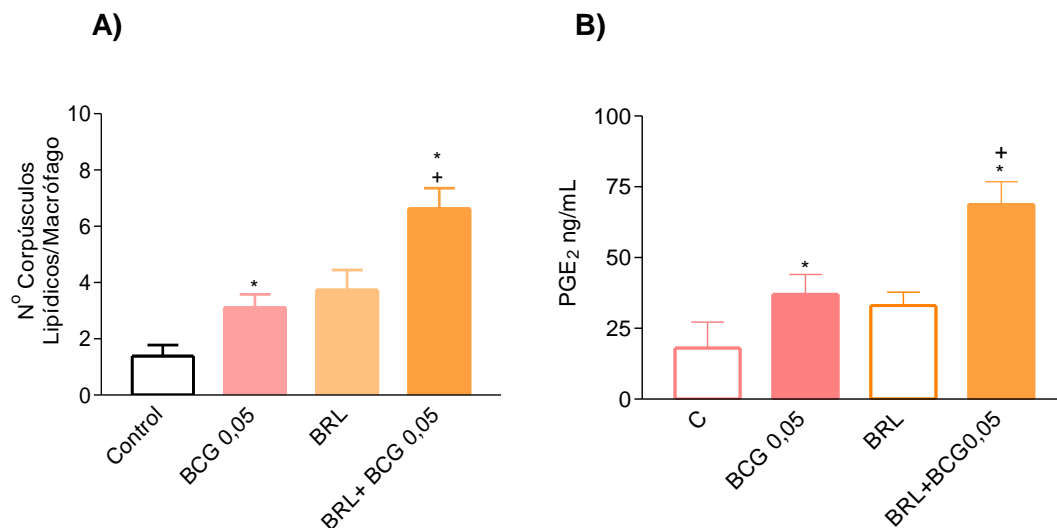


Figura 09 – Efeito do BRL49653 na formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂ após infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com BRL49653 (5 μ M) 30 min antes da infecção por BCG, MOI de 0,05 (1 UFC:20 macrófagos) e incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 h. (A) As células foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro, (B) os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG ou + entre os grupos tratados e não tratados infectados por BCG; ($p < 0,05$).

4.2.3) Inibição da formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂ por GW9662 antagonista seletivo de PPAR_γ em macrófagos infectados por BCG *in vitro*

Para confirmação dos mecanismos de sinalização intracelular desencadeados por PPAR_γ durante a infecção por BCG, realizou-se o tratamento com antagonista seletivo de PPAR_γ, o GW9662 na indução da formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ durante a infecção.

Na figura 10A observa-se que o tratamento com GW9662 (1 μM), inibiu significativamente a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos após 24 horas de infecção, fenômeno que pode ser observado na figura 11B.

Confirmando os resultados obtidos com a inibição da formação de corpúsculos lipídicos e sabendo que estas estruturas podem ser sítios de síntese de PGE₂, foi avaliada a produção de PGE₂ após o tratamento com GW9662. Os dados mostraram que GW9662 também interfere com a produção de PGE₂, após 24 horas de infecção (Fig. 10B) inibindo significativamente a produção deste mediador nas células que receberam o pré-tratamento.

Estes resultados sugerem que o PPAR_γ está envolvido, não só nos mecanismos que levam à formação de corpúsculos lipídicos, como também na produção de mediadores inflamatórios como PGE₂, cuja formação pode se dar nestas estruturas.

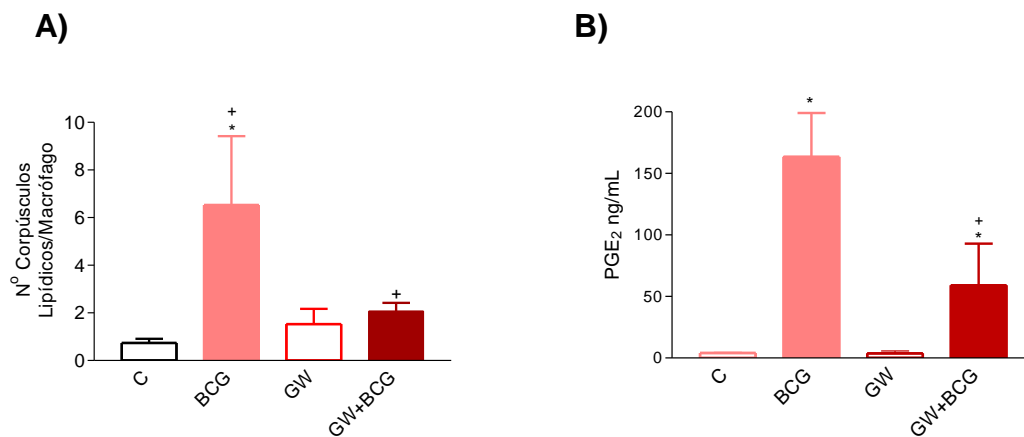


Figura 10 - Efeito do GW9662 na produção de PGE₂ 24 horas após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com GW9662 (1 μ M) 30 minutos antes da infecção por BCG, MOI de 1 (1UFC:1macrófago) e incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 horas, (A) Após 24h de infecção as células foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro, (B) os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG; + diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados infectados por BCG; ($p < 0,05$).

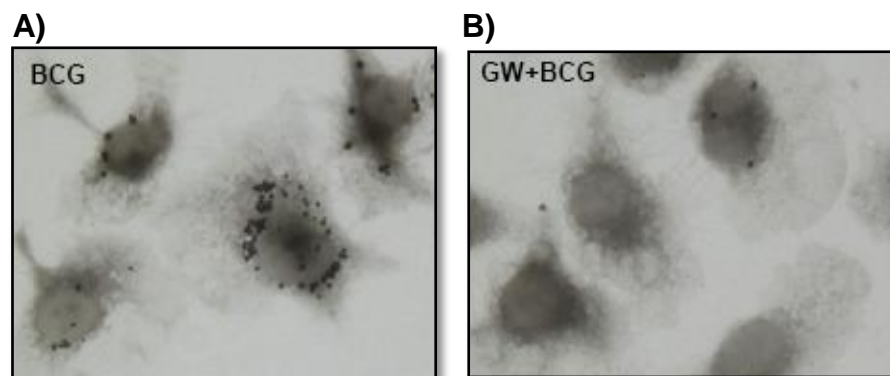


Figura 11 – Imagem da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos tratados por GW9662, antagonista de PPAR γ , durante a infecção experimental por BCG após 24 h. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados 30 min antes da infecção ou não por BCG, MOI de 1 e incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após 24 h de infecção, as células foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos foi realizada em microscópio de campo claro, (A) macrófagos infectados com BCG na presença do veículo (DMSO); (B) macrófagos tratados com GW9662 (1 μ M) e infectados por BCG 24h.

4.2.4) Avaliação da produção de citocinas durante a infecção pelo BCG, nos macrófagos tratados com GW9662

Neste estudo detectamos o aumento de produção de 17 citocinas, com perfis, tanto pró-inflamatórias, quanto antiinflamatórias, bem como quimiocinas e citocinas envolvidas a fatores de crescimento. As citocinas foram detectadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos, dentre elas [IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-17, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, KC, MIP-1 α , RANTES] 24 horas após a infecção pelo BCG. Para este estudo, foi utilizado o sistema de detecção de citocinas LUMINEX que detecta múltiplas citocinas simultaneamente.

Em contraste com os resultados observados na inibição de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂, o GW9662 não mostrou efeito inibitório para a produção das citocinas durante a infecção. Apenas seis destas citocinas foram mostradas aqui, são elas a IL-1 β (Fig. 12A), IL-6 (Fig. 12B), IL-12(p70) (Fig. 12C), TNF- α (Fig. 12D) MCP-1 (Fig. 12E) GW-CSF (Fig. 12F) 24 h após a infecção micobacteriana.

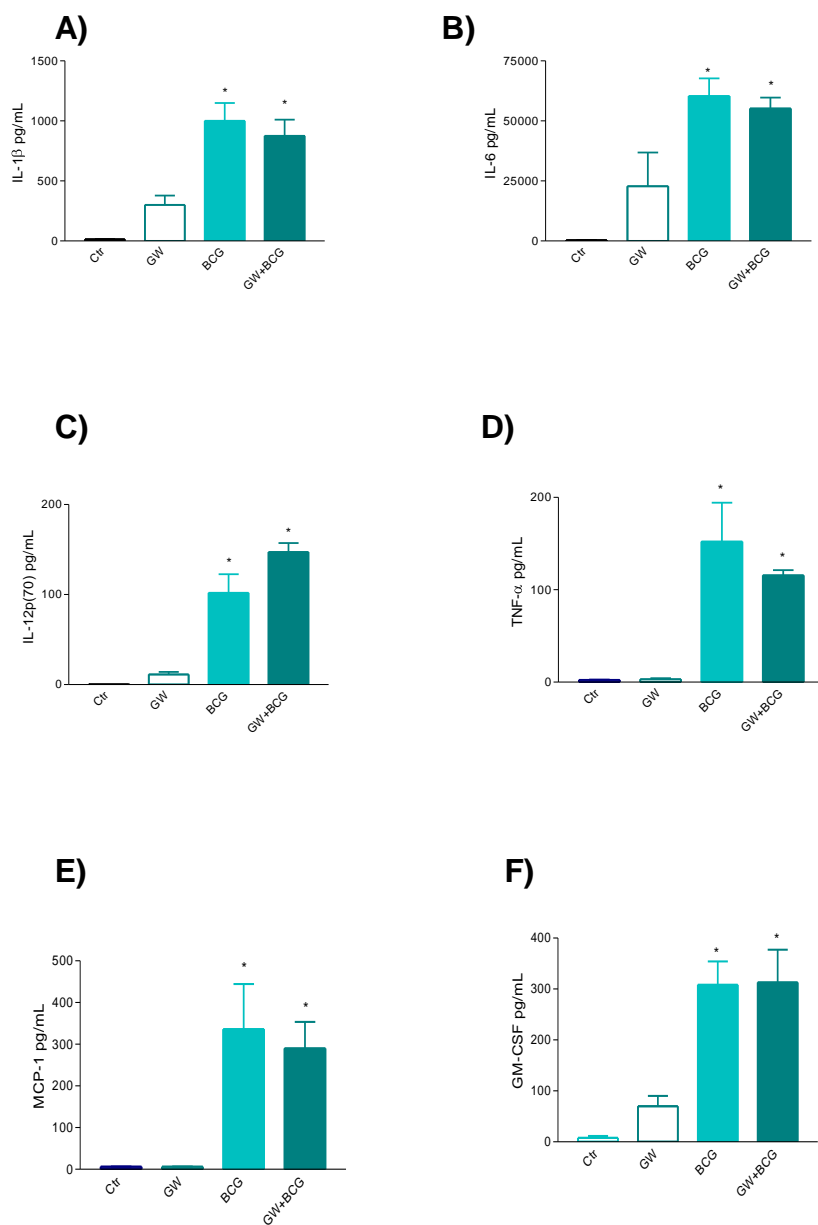


Figura 12 - O GW9662 não foi capaz de inibir a produção de IL-1 β , IL-6, IL-12(p70), TNF- α , MCP-1 e GM-CSF induzida por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados com GW9662 (1 μ M) 30 minutos antes da infecção por BCG, MOI de 0,1 e incubados a 37 $^{\circ}$ C na atmosfera de 5% de CO $_2$ durante 24 horas. Os níveis de (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) IL-12(p70), (D) TNF- α , (E) MCP-1 e (F) GM-CSF, foram detectados pelo sistema LUMINEX. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG tratados ou não com GW; ($p < 0,05$).

4.3) Análise da participação do receptor TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂

Trabalhos têm demonstrado que os receptores TLR2 estão envolvidos no reconhecimento de antígenos micobacterianos por macrófagos. Em leucócitos a formação de corpúsculos é um evento altamente regulado que depende da interação de receptores de superfície celular com seus ligantes. Assim, analisamos o envolvimento do receptor TLR2 durante a infecção pelo BCG *in vitro*. Para analisar o papel deste receptor neste fenômeno, utilizamos macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 deficientes para o receptor TLR2 (TLR2^{-/-}).

O TLR2 é fundamental na ativação de vias de sinalização de macrófagos levando à formação de corpúsculos lipídicos. A infecção por BCG nos macrófagos TLR2^{+/+} nos três tempos analisados (6, 24 e 48 horas) levou a um aumento no número de corpúsculos lipídicos. A infecção com BCG não foi capaz de induzir aumento no número de corpúsculos lipídicos nos macrófagos TLR2^{-/-}, quando comparados às células não infectadas, e este número se expressa de maneira basal (média de 2 corpúsculos/macrófago) (Fig. 13).

Foi avaliado anteriormente que o BCG induz aumento significativo na produção de PGE₂ (Fig. 3) a partir de 2 horas de infecção em macrófagos TLR2^{+/+}, atingindo um pico 24 h após a infecção. Na análise de produção de PGE₂ nos sobrenadantes das culturas de macrófagos TLR2^{-/-}, observou-se que este mediador da resposta inflamatória, não apresentou níveis aumentados durante a infecção por BCG nos tempos analisados (6, 24, e 48 horas), quando comparados aos macrófagos TLR2^{-/-} não infectados. Diferentemente da indução causada pela micobactéria nos macrófagos TLR2^{+/+}, onde os níveis de produção de PGE₂ detectados são significativamente maiores em todos os tempos de infecção analisados. A figura 14 mostra a diferença na indução da produção de PGE₂ nos macrófagos TLR2^{+/+} comparados aos TLR2^{-/-} e seus respectivos controles.

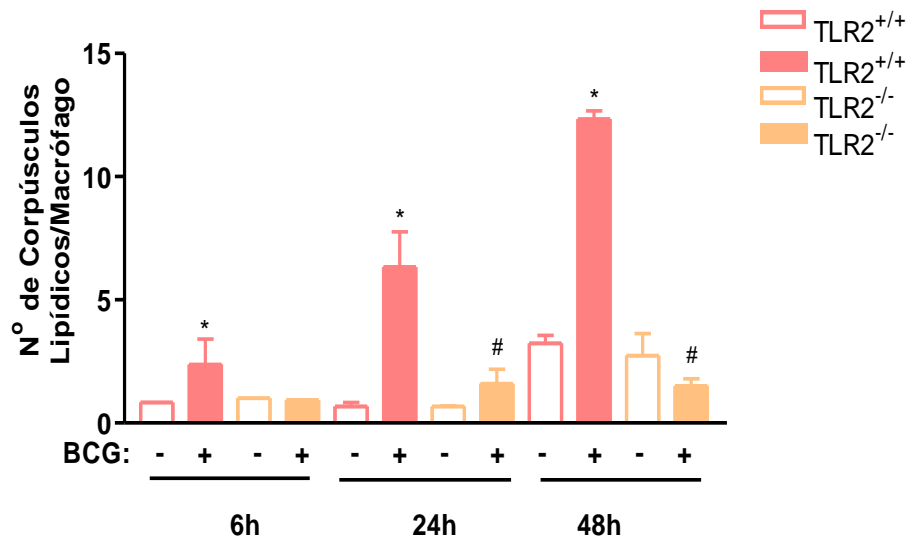


Figura 13 – Análise do envolvimento do receptor TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos 6, 24 e 48 horas após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos normais (TLR2^{+/+}) ou deficientes (TLR2^{-/-}) para o receptor TLR2, foram infectados ou não por BCG, MOI de 1 e incubados a 37⁰C na atmosfera de 5% CO₂. As células foram coradas com tetróxido de ósmio e a contagem dos corpúsculos lipídicos de 50 células consecutivas foi realizada em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG nos animais TLR2^{+/+}, # diferença significativa entre os grupos TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} infectados por BCG; (p<0,05).

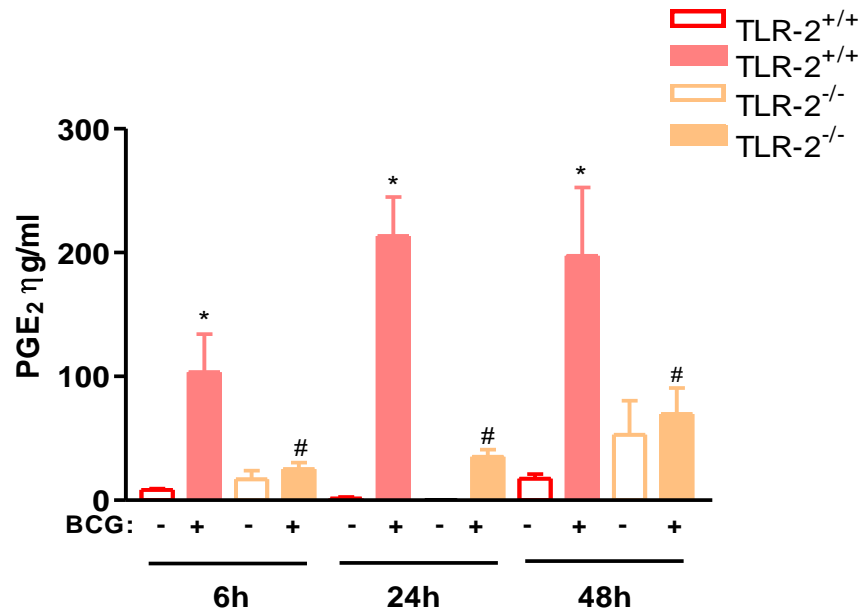


Figura 14 – Análise do envolvimento do receptor TLR2 na produção de PGE₂, 6, 24 e 48 horas após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos TLR2^{+/+} ou TLR2^{-/-} foram infectados ou não por BCG, MOI de 1 e incubados a 37^oC na atmosfera de 5% CO₂. A produção de PGE₂ foi detectada no sobrenadante das culturas de macrófagos por ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG nos animais TLR2^{+/+}, # diferença significativa entre os grupos TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} infectados por BCG; (*p*<0,05).

4.3.1) Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos de animais TLR2^{-/-} e TLR4^{-/-} infectados por BCG

Os receptores TLR2 e TLR4, e mais recentemente TLR6 e TLR1 que heterodimerizam com TLR2, têm sido implicados na mediação da sinalização intracelular por micobactérias (Means e cols., 2001; Means e cols., 1999b; Takeuchi e cols., 2002). Para investigar o papel do reconhecimento de patógenos mediados por TLR nos mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos, nós utilizamos o modelo de pleurisia nos camundongos normais ou deficientes para o receptor TLR2 ou TLR4 (ScCr) durante a infecção por BCG. Nós observamos um aumento significativo na formação de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos dos animais TLR2^{+/+}, TLR4^{+/+} (ScSn) e TLR4^{-/-} (ScCr), mas não nos eosinófilos dos animais TLR2^{-/-}. Estes resultados demonstram um papel essencial para o receptor TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos.

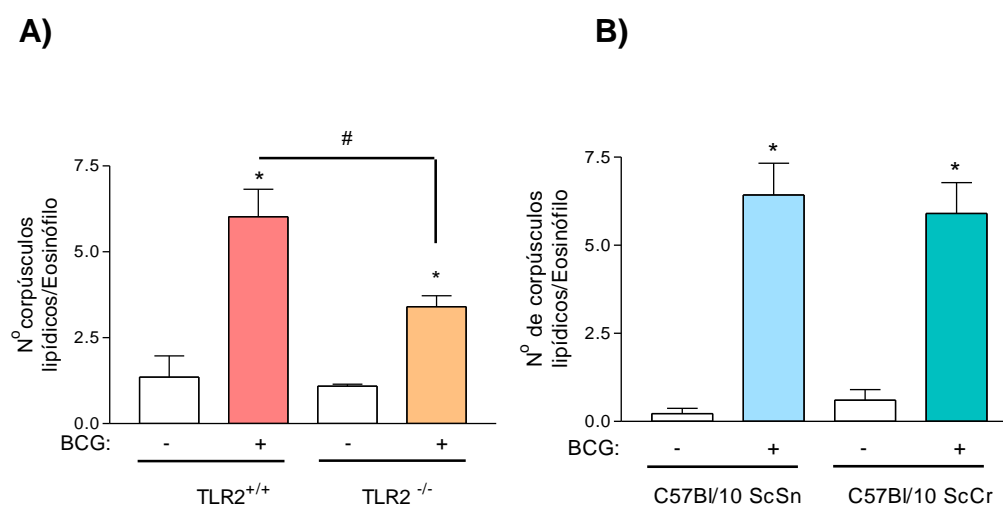


Figura 15. Mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos induzido por BCG: Papel da sinalização de TLR2. (A e B) análise da formação de corpúsculos lipídicos nos animais (A) TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-}, (B) C57BL/10 ScSn (TLR4^{+/+}) e C57BL/10 ScCr (TLR4^{-/-}). Cada barra representa média ± SEM de 8 animais. * Diferença entre os grupos controle e infectados; # representa diferença entre os grupos de camundongos normais e deficientes; ($p < 0.05$).

4.3.2) TLR2 está envolvido na produção de IL-5 e eotaxina endógena, mediada por CCR3 durante a infecção por BCG *in vivo*

Trabalhos recentes têm descrito o papel da IL-5 no acúmulo de eosinófilos induzidos por *Mycobacterium bovis*, BCG (Menezes-de-Lima-Junior e cols., 1997). Como a migração de eosinófilos induzida por BCG foi inibida nos animais TLR2^{-/-} (Fig. 16 C), nós verificamos o envolvimento de TLR2 na síntese de IL-5 e eotaxina durante a infecção por BCG *in vivo*. Nossos resultados demonstraram que TLR2^{-/-} produziram quantidades reduzidas de IL-5 na pleura dos animais infectados quando comparados aos animais TLR2^{+/+} (Fig. 16A).

A eotaxina é um mediador chave no tráfego de eosinófilos em mucosas (Rothenberg, 1999). Este mediador induz seus efeitos através do receptor CCR3. Estudos têm documentado que ativação de CCR3 mediada por eotaxina foi um potente indutor da formação de corpúsculos lipídicos (Vieira-de-Abreu e cols., 2005; Bandeira-Melo e cols., 1999). Deste modo, avaliamos se a infecção por BCG induzida o aumento de eotaxina e se este mecanismo é dependente de TLR2.

Observou-se o aumento de produção de eotaxina *in vivo* no lavado pleural dos animais TLR2^{+/+} mas não nos TLR2^{-/-} (Figura 16B). Para investigar o papel da eotaxina na ativação, recrutamento e formação de corpúsculos lipídicos de eosinófilos durante a infecção, nós pré-tratamos os camundongos com anticorpos neutralizantes para eotaxina ou CCR3.

O influxo de eosinófilos e a formação de corpúsculos lipídicos foram significativamente inibidos durante a infecção (Fig. 16C e D) em camundongos tratados com anti-CCR3 e anti-eotaxina, indicando que a biogênese de corpúsculos lipídicos induzida por BCG depende da ativação de CCR3. É importante ressaltar que o recrutamento de neutrófilos e monócitos bem como a formação de corpúsculos lipídicos nestas células do infiltrado observado 24 horas após a infecção, (D'Avila e cols., 2006; Menezes-de-Lima-Junior e cols., 1997) não foram afetados pelo pré-tratamento com anti-CCR3 ou com anti-eotaxina, mostrando a especificidade do tratamento.

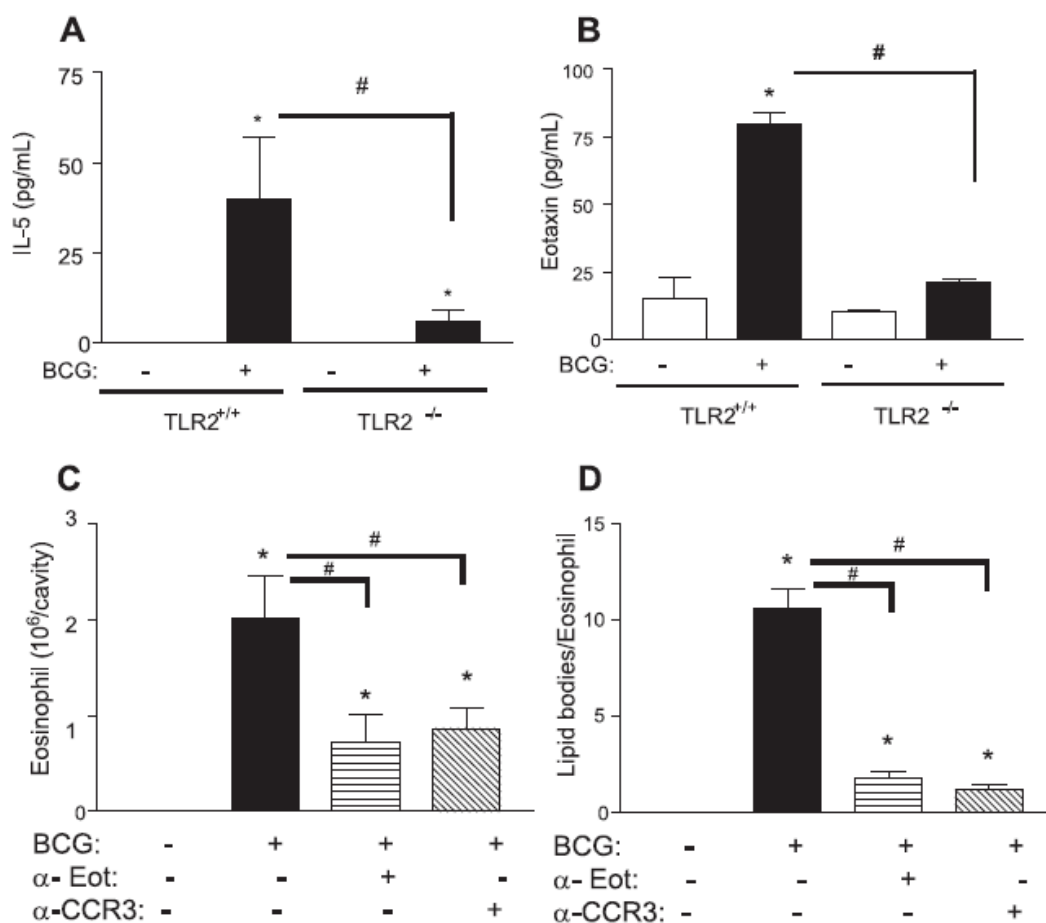


Figura 16 – TLR2 está envolvido na produção de IL-5 e eotaxina endógena, mediada por CCR3 durante a infecção por BCG. A produção de (A) IL-5 ou (B) eotaxina foram avaliadas no lavado pleural de animais TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} estimulados *in vivo* por BCG (5×10^6 bacilo/cavidade) ou veículo por 24 h. Os níveis destas citocinas foram dosados por ELISA. Foi analisado o efeito da neutralização da eotaxina ou do CCR3 no acúmulo de eosinófilos na cavidade pleural (C) e na formação de corpúsculos lipídicos (D) induzidos pela infecção por BCG. Os anticorpos neutralizantes foram administrado intra-peritonealmente 30 minutos antes da infecção intratorácica por BCG (5×10^6 bacilo/cavidade), a análise dos eosinófilos foi realizadas após 24 h de infecção. Cada barra representa a média \pm SEM de 4 animais. * Diferença entre o grupo controle e infectado; # diferença entre o grupo tratado e não tratado infectados por BCG ou entre o grupo dos animais TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-}; ($p < 0.05$).

4.3.3) Avaliação da produção de citocinas durante a infecção pelo BCG 24 horas, em macrófagos normais e deficientes para TLR2

Utilizando o sistema LUMINEX, detectou-se o aumento de produção de 17 citocinas, tanto pró como antiinflamatórias, nos sobrenadantes das culturas de macrófagos TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} dentre elas [IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12(p40), IL-12(p70), IL-17, IFN- γ , G-CSF, GM-CSF, KC, MIP-1 α , RANTES] 24 horas após a infecção por BCG. A figura 17 mostra seis destas citocinas IL-1 α (17A), IL12(p70) (17B), KC (17C), IL-10 (17D), MIP-1 (17E), RANTES (Fig. 17F). Em contraste aos níveis detectados nos animais TLR2^{+/+}, estas citocinas com exceção de MIP-1 α e RANTES, não foram induzidas ou se apresentavam em níveis baixos nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos TLR2^{-/-} após a infecção. Aqui devemos chamar a atenção para a produção de MIP-1 α e RANTES, citocinas pró-inflamatórias, que tiveram um aumento de produção significativo, expressando níveis semelhantes aos detectados nas culturas de macrófagos TLR2^{+/+} 24 horas após a infecção. A figura 17E mostra os níveis de MIP-1 α e a figura 17F os níveis de RANTES detectados na dosagem do LUMINEX.

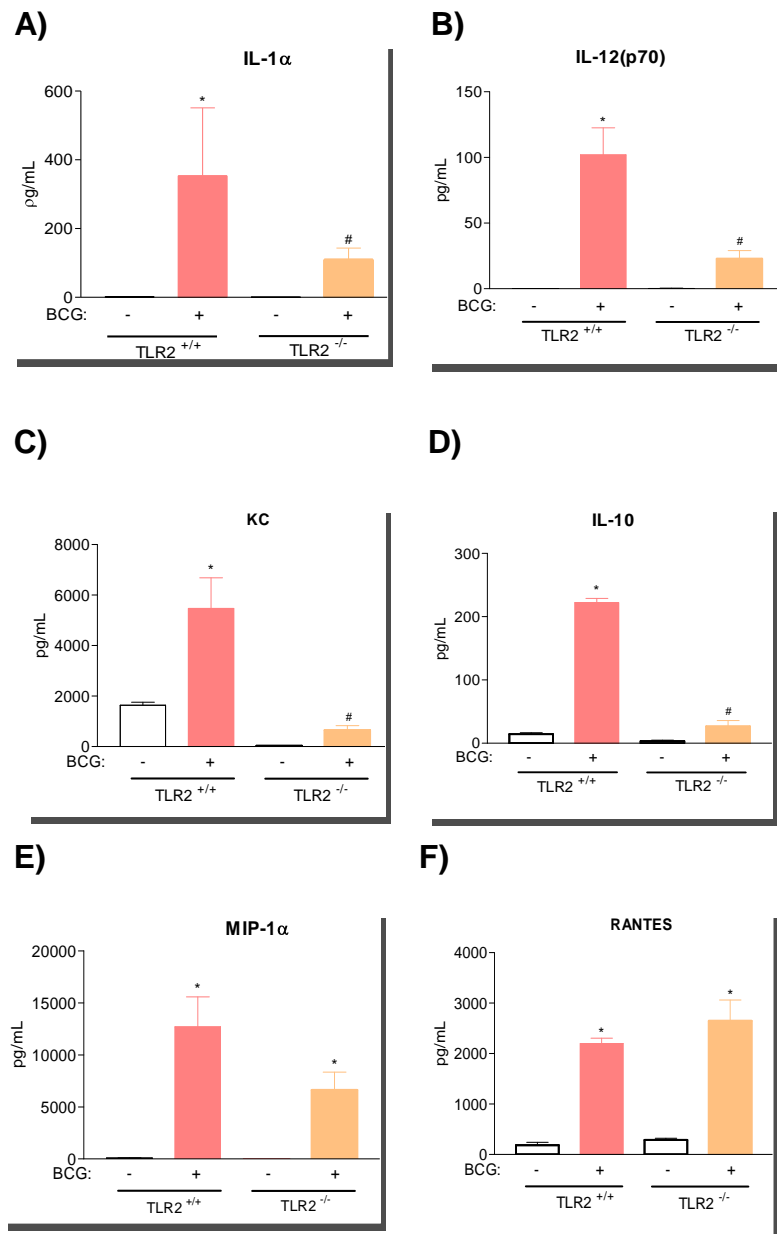


Figura 17 – Estudo da participação do receptor TLR2 na produção de IL-1 α , IL-12(p70), KC, IL-10, MIP-1 α e RANTES, 24 horas após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais de camundongos normais ou deficientes para o receptor TLR2 foram infectados por BCG, MOI de 0,1 e incubados a 37⁰C na atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Após os tempos de infecção os níveis de (A) IL-1 α , (B) IL-12(p70), (C) KC, (D) IL-10, (E) MIP-1 α e (F) RANTES foram detectados pelo sistema LUMINEX. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG nos animais, # diferença significativa entre os grupos TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} infectados por BCG; ($p < 0,05$).

4.3.4) Imunolocalização de NF- κ B em macrófagos normais ou deficientes para o receptor TLR2 estimulados ou não por LAM 24 h

O processo de fagocitose do BCG se dá pela ligação de receptores da superfície celular a componentes na parede celular micobacteriana, incluindo o LAM. Vários agonistas para os TLRs têm sido identificados, incluindo LPS, lipoproteínas, glicolipídios, LAM e LTA. O reconhecimento do LAM é semelhante ao LPS de bactérias Gram-negativas, com pontos comuns nas vias de sinalização desencadeadas por estes microorganismos (Hoheisel e cols., 1995; Schluger and Rom, 1998).

O LPS (Fig. 18C) e o LAM (Fig.18E) são capazes de induzir a ativação celular e translocação de NF- κ B para o núcleo, das células dos animais TLR2^{+/+}, diferente do observado para as células não estimuladas (Fig.18 A e B). Além disso, o LPS (500 ng/mL) induz um aumento da translocação nuclear de NF- κ B de maneira independente de TLR2 (Fig. 18D), mas este receptor se mostra indispensável na sinalização desencadeada por LAM no que diz respeito ao aumento de expressão e a translocação do NF- κ B, uma vez que, nos macrófagos dos animais TLR2^{-/-} não observamos o aumento da expressão e a translocação deste receptor para o núcleo celular (Fig. 18F).

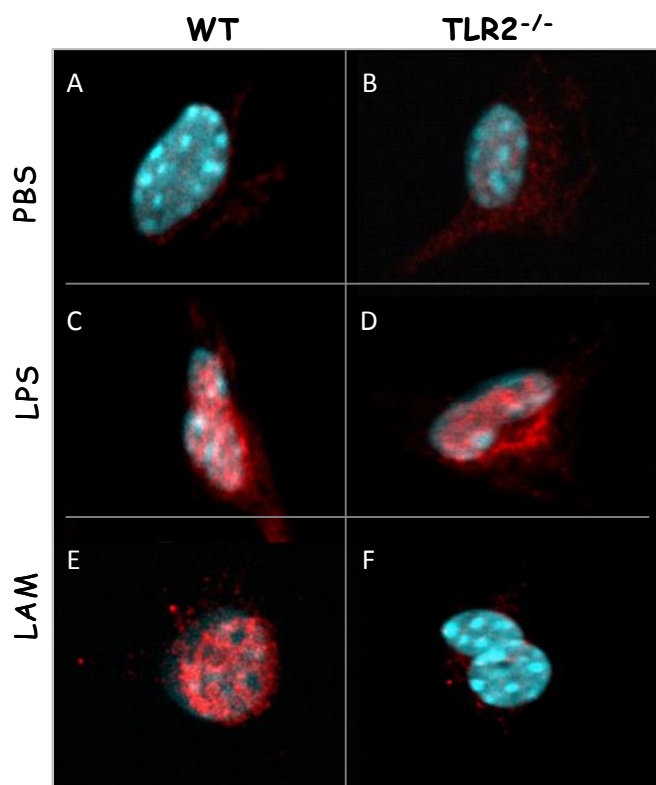


Figura 18 - Imunolocalização de NF- κ B em macrófagos normais ou deficientes para o receptor TLR2 estimulados ou não por LPS ou LAM 24 h. (A, C e E) Macrófago normal (B, D e F) deficiente do receptor TLR2. (C e D), macrófagos estimulados por LPS, imunolocalização de NF- κ B revelado por um anticorpo de coelho contra camundongo fluorescente Cy3, núcleo marcado com DAPI. (E e F) Macrófagos estimulados com LAM, onde observamos a indução da translocação de NF- κ B para o núcleo em (E) TLR2^{+/+}, mas não em (F) TLR2^{-/-}, mostrando que o LAM não induz aumento de expressão e a translocação do NF- κ B para o núcleo celular nos animais TLR2^{-/-}. As imagens foram obtidas por CLSM (LSM 510-META, Zeiss), aumento de 100X.

4.3.5) *Imunolocalização de TIRAP em macrófagos peritoneais infectados por M. bovis, BCG*

A cascata de sinalização desencadeada pela ativação dos receptores TLR2 por antígenos micobacterianos, culmina com a ativação de várias proteínas no ambiente intracelular, dentre elas o TIRAP. Deste modo, esta análise fornece uma possibilidade a mais para o estudo das vias de ativação de TLR2 por BCG.

Na figura 19 observa-se os macrófagos em microscopia de fluorescência, onde a infecção por BCG induz aumento da expressão do TIRAP marcado com Cy3 (Fig. 19E), diferente do observado para as células que não foram infectadas (Fig. 19B). O núcleo está marcado por DAPI (19E e 19F) e os corpúsculos lipídicos (19A e 19D) foram marcados com BODIPY. Estes dados mostram que a ativação de TLR2 desencadeia a ativação de proteínas no ambiente intracelular, após a infecção por BCG *in vitro*.

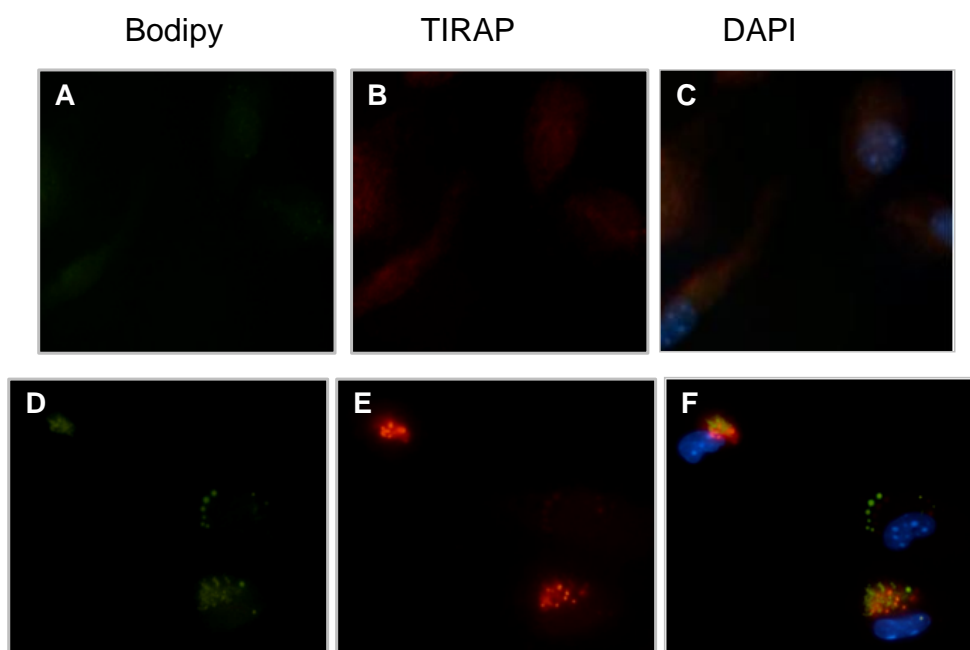


Figura 19 - Imunolocalização de TIRAP e corpúsculos lipídicos em macrófagos controles (PBS) e infectados por BCG 24 h. Imunolocalização de corpúsculos lipídicos (A e D) por BODIPY, TIRAP (B e E) por Cy3 e (C e F) do núcleo por DAPI. Podemos observar nos macrófagos infectados por BCG, MOI 1 24h (D, E e F), uma intensa marcação de TIRAP (E) que foi diferente do observado para os macrófagos não infectados (B), aumento de 100X.

4.3.6) Análise da participação do receptor TLR2 na expressão de PPAR γ durante a infecção por BCG *in vitro*

Em paralelo à análise da participação do TLR2 na formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE₂, e produção de citocinas, nós verificamos o papel do TLR2 durante a infecção por BCG na expressão de PPAR γ . Como o observado para os outros parâmetros, nós verificamos que o TLR2 tem um importante papel na sinalização desencadeada por BCG no que diz respeito à expressão de PPAR γ , uma vez que os macrófagos dos animais TLR2^{-/-} não mostraram o aumento de expressão do PPAR γ (Fig. 20).

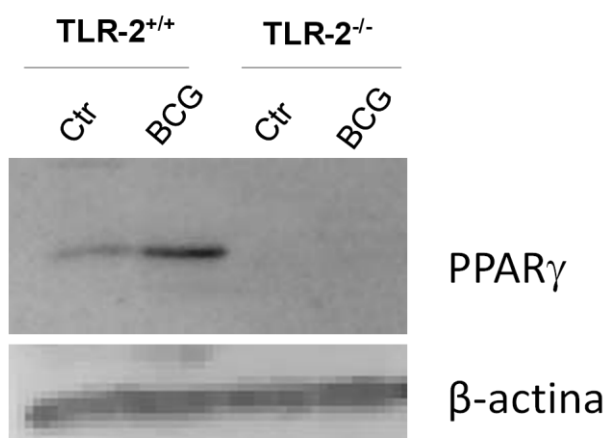


Figura 20 – Análise da expressão de PPAR γ por *Western blotting* em macrófagos normais e deficientes para o receptor TLR2 infectados por BCG. As raias estão representadas pelos grupos não infectados (-) ou infectados com BCG (+) MOI de 0,1. Pode-se observar que o BCG induz aumento da expressão de PPAR γ (57 kDa) nos animais normais, mas não nos macrófagos deficientes para o receptor TLR2. Para a separação das proteínas, os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Foram aplicadas 20 μ g de proteínas totais. Para a detecção de PPAR γ utilizou-se anticorpo de coelho anti-PPAR γ na diluição de (1:500).

4.3.7) Envolvimento do TLR2 na ativação e translocação de PPAR γ por componentes da parede celular micobacteriana

A ativação de TLR2 por LAM induziu a ativação e a translocação de PPAR γ para o núcleo celular nos macrófagos peritoneais após 24 horas de estimulação (Fig. 21). Na figura 21C observou-se que o LAM foi capaz de induzir aumento de expressão e translocação de PPAR γ para o núcleo dos macrófagos dos animais TLR2^{+/+}, diferente do observado para os macrófagos TLR2^{-/-} na figura (21D), onde não foi possível observar este fenômeno. Não só a bactéria inteira, mas componentes de sua parede celular podem desencadear aumento da expressão e ativação de PPAR γ de modo dependente de TLR2.

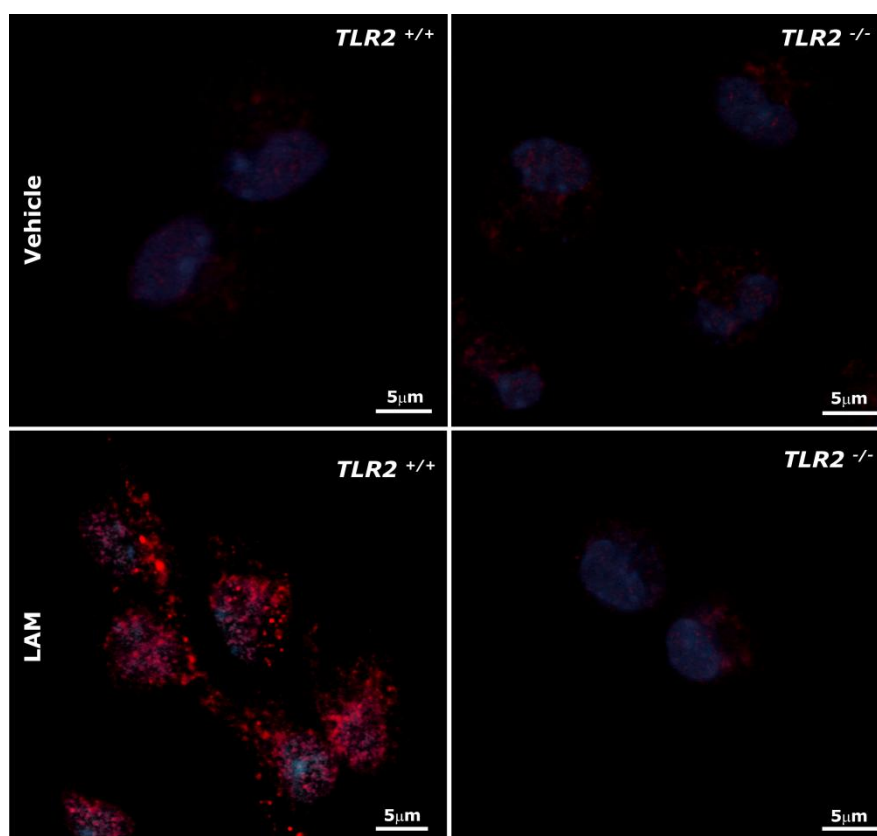


Figura 21 – Imunolocalização de PPAR γ por microscopia confocal em macrófagos normais e deficientes para o receptor TLR2 estimulados com LAM por 24 h, *in vitro*. Nesta análise nós observamos a imunolocalização de PPAR γ em macrófagos murinos de animais TLR2^{+/+} e TLR2^{-/-} estimulados (C e D) ou não (A e B) com LAM (300 ng/mL). Em (C) observamos o aumento da expressão de PPAR γ nos animais TLR2^{+/+} marcado com anticorpo secundário de coelho conjugado com ALEXA-546, que não foram visualizados em (D) animais TLR2^{-/-} estimulados com LAM por 24 horas. A marcação nuclear pode ser observada pela fluorescência com DAPI. As imagens foram obtidas por CLSM (LSM 510-META, Zeiss).

4.3.8) Ligantes TLR2 induzem diferentes respostas de macrófagos *in vitro*

Uma vez, que a expressão de PPAR γ foi dependente da sinalização desencadeada por TLR2 durante a infecção, utilizou-se diferentes ligantes de TLR2 como o BCG, *M. smegmatis* (1:1), Pam₃cys (100ng/mL) e zimosan (1:1) para a análise da formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e citocinas.

A ativação de macrófagos por *M. smegmatis*, Pam₃cys e zimosan, foram capazes de induzir a produção de citocinas como TNF- α (Fig. 22A) e KC (Fig. 22B), mas esta ativação não foi suficiente para induzir formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 22C) e síntese de PGE₂ (Fig. 22D). Este efeito foi diferente ao observado para a indução desencadeada por BCG, que foi capaz de induzir de maneira significativa não só a síntese de citocinas como também a formação de corpúsculos lipídicos paralelo com aumento da produção de PGE₂. Assim, a ativação desencadeada por BCG induz formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE₂ diferente da indução provocada por *M. smegmatis*, Pam₃cys e zimosan.

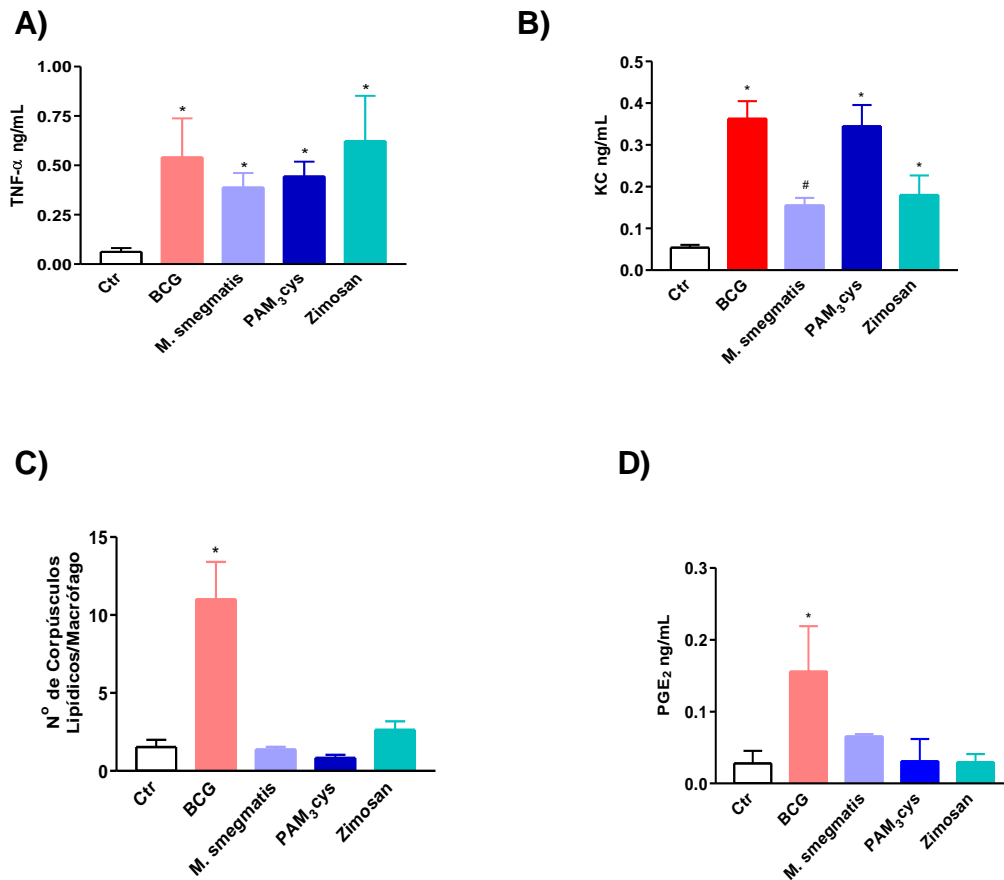


Figura 22 – Estudo do envolvimento de agonistas do receptor TLR2 (*M. smegmatis*, pam₃cys e zimosan) e BCG na síntese de citocinas, formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂ 24h após a infecção. (A) TNF- α , (B) KC, (C) corpúsculos lipídicos e (D) PGE₂. Os macrófagos peritoneais de camundongos normais foram infectados ou não por BCG, *M. smegmatis*, zimosan, MOI de 1, e Pam₃cys (10 μ M). As células foram incubadas a 37°C na presença de 5% de CO₂ durante 24 h, os níveis de TNF- α e KC foram detectados por ELISA, o número de corpúsculos lipídicos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, e os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA). Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG, # diferença entre o grupo infectado por BCG e o infectado por *M. smegmatis*; ($p < 0,05$).

4.3.9) Avaliação da expressão de PPAR γ por ligantes de TLR2

Paralelo com as análises da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂, neste experimento observou-se que o *M. smegmatis* (1:1) e zimosan (1:1) não foram capazes de induzir a formação de corpúsculos (Fig. 23A) como o observado na figura anterior, bem como a expressão de PPAR γ (Fig. 23B). Uma vez que os agonistas de TLR2 (*M. smegmatis*, Pam₃cys e zimosan) não foram capazes de induzir formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e a expressão de PPAR γ , mas induziram produção de citocinas. Assim, sugerindo que a ativação de TLR2, embora essencial, não seja suficiente para desencadear vias de formação de corpúsculos, produção de PGE₂ e aumento da expressão de PPAR γ .

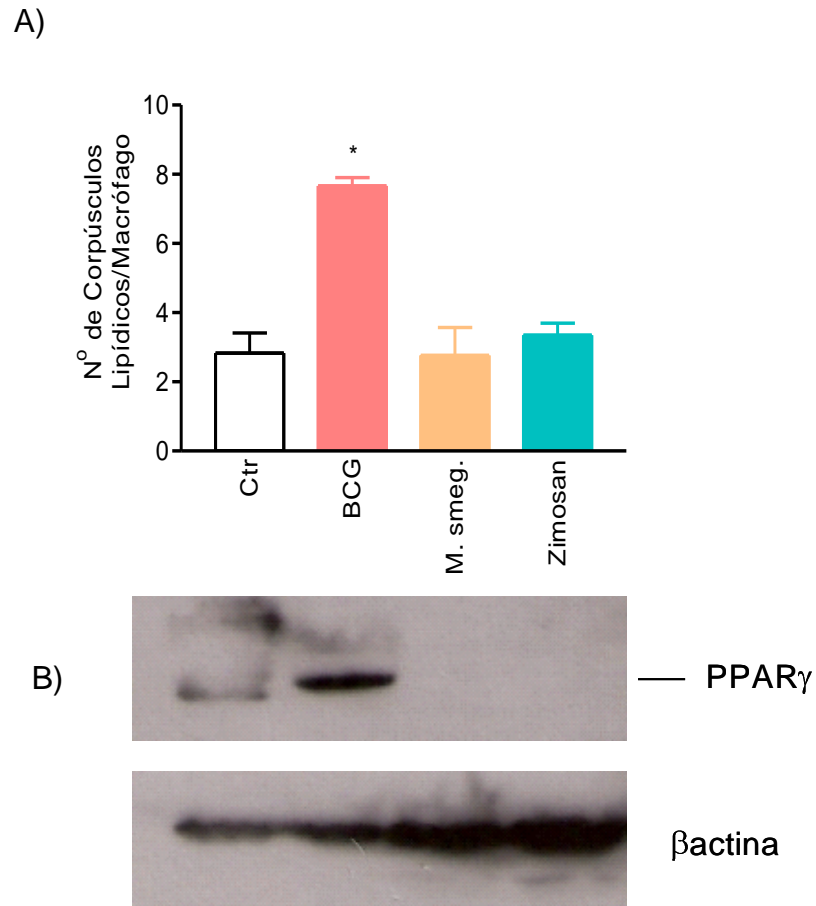


Figura 23 – Análise da formação de corpúsculos lipídicos e expressão de PPAR γ por *Western blotting* em macrófagos infectados com BCG, *M. smegmatis*, ou zimosan 24 h *in vitro*. (A) o número de corpúsculos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre o grupo controle e infectado por BCG; ($p < 0,05$). (B) na análise de *Western blotting* as raias estão representadas pelos grupos controles (ctr) e infectados por BCG, *M. smegmatis* ou zimosan. Pode-se observar que o BCG induz aumento da expressão de PPAR γ (57 kDa) que não foi detectado quando os macrófagos foram estimulados por *M. smegmatis* ou zimosan. Para a separação das proteínas os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% aplicamos 30 μ L de proteínas totais. Para a detecção de PPAR γ utilizou-se anticorpo de coelho anti-PPAR γ na diluição de (1:500).

4.4) Estudo do papel de TLR6 durante a infecção por *M. bovis*, BCG em macrófagos peritoneais *in vitro*

Uma vez que TLR2 é importante na sinalização desencadeada por patógenos intracelulares como *M. bovis*, BCG, na indução da formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e expressão de PPAR γ , mas que não é suficiente para ligantes como o *M. smegmatis* e zimosan induzirem os parâmetros analisados, nós decidimos investigar a participação de possíveis co-fatores para o TLR2 no fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos. Uma vez que o TLR6 tem sido descrito como um importante co-fator para TLR2 por sua capacidade de se heterodimerizar e participar em diversos processos infecciosos, nós decidimos analisar a participação do TLR6 nos mecanismos de formação de corpúsculos, produção de PGE₂ e síntese de citocinas durante a infecção.

O TLR6 não está envolvido na formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 24A), produção de PGE₂ (Fig. 24B), bem como na síntese de TNF- α (Fig. 24C) durante a infecção por BCG *in vitro*.

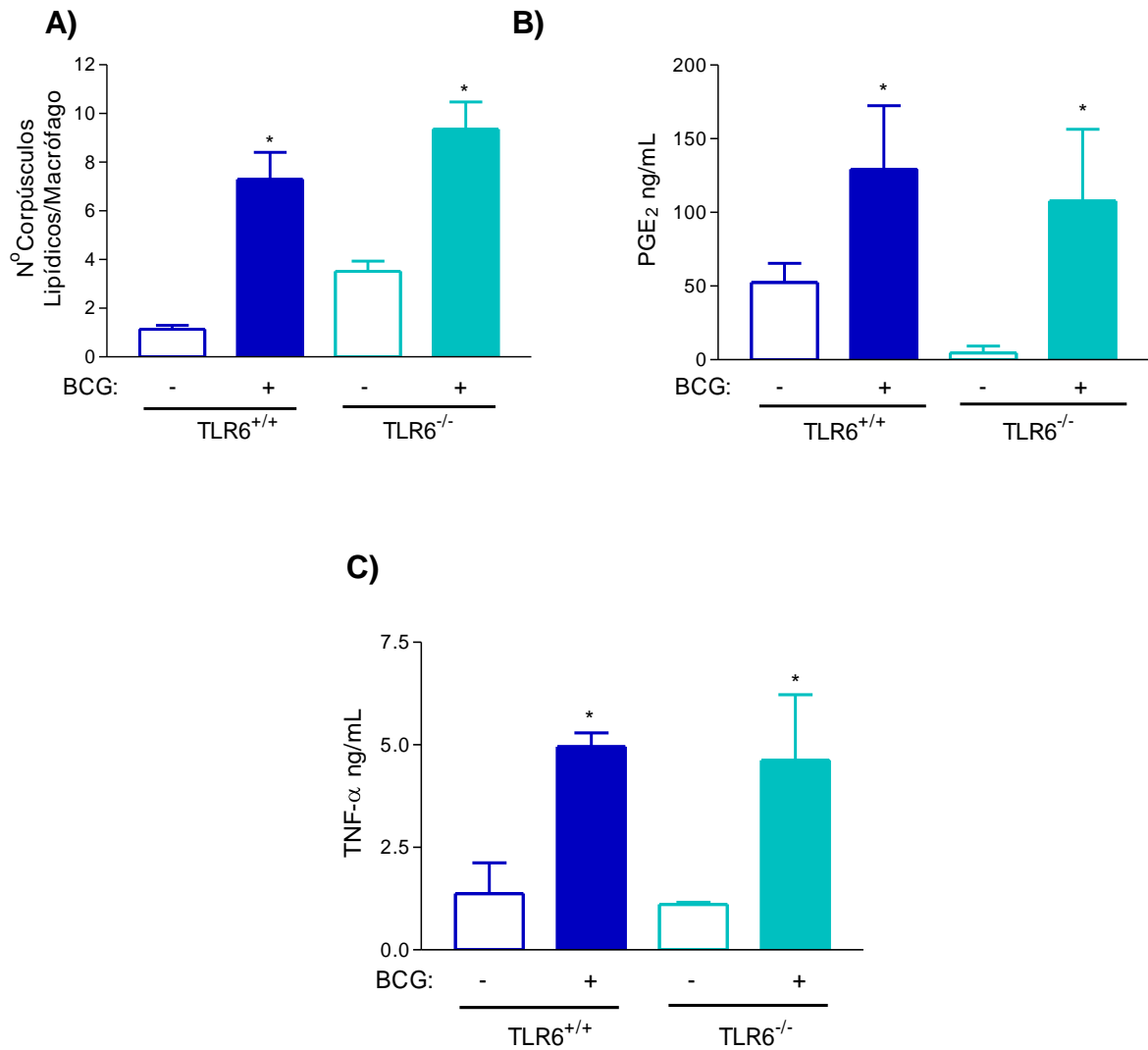


Figura 24 – Estudo do envolvimento do receptor TLR6 na formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE₂ e TNF-α 24 h após a infecção por BCG. Os macrófagos de camundongos normais (TLR6^{+/+}) ou deficientes (TLR6^{-/-}) para o receptor TLR6 foram incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂, infectados ou não por BCG, MOI 1. Nós observamos a indução da formação de (A) corpúsculos lipídicos, (B) produção de PGE₂ e (C) TNF-α que não é dependente de TLR6. O número de corpúsculos lipídicos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA) e os níveis de TNF-α foram detectados por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre os grupos controles e infectados por BCG; ($p < 0,05$).

4.5) Análise da participação de CD14 e das integrinas CD11b/CD18 no processo de formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e TNF- α durante a infecção

Nosso laboratório documentou a participação das integrinas CD11b/CD18 na formação de corpúsculos lipídicos induzidos por LPS (Pacheco e cols., 2002). Nós então, decidimos investigar a participação de CD11b/CD18, bem como do CD14, que têm sido descritos no reconhecimento de antígenos bacterianos. Além disso, tem sido demonstrado que o CD14 pode interagir com vários TLRs induzindo a produção de citocinas após infecções bacterianas e virais (Compton e cols., 2003; Pauligk e cols., 2004).

Os anticorpos neutralizantes anti-CD14 (10 μ M) e anti-CD11b/CD18 (10 μ M) foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 25A), a produção de PGE₂ (Fig. 25B), mas este efeito não foi observado para produção de TNF- α (Fig. 25C) durante a infecção por BCG 24 horas.

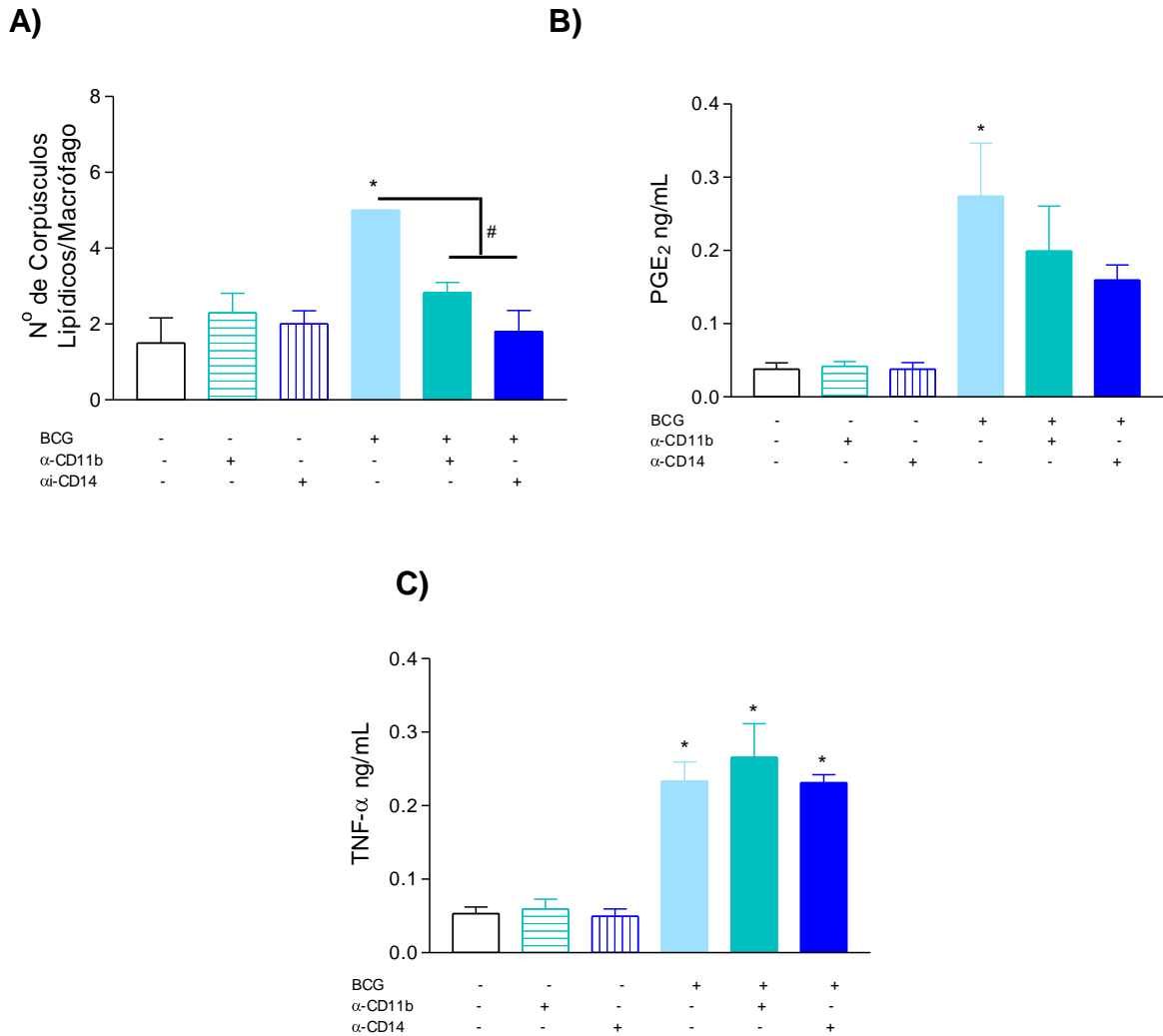


Figura 25 – Estudo da participação das integrinas CD11b/CD18 e CD14 na formação de corpúsculos lipídicos produção PGE₂ e TNF- α 24 h após a infecção. (A) Os macrófagos peritoneais dos camundongos foram incubados a 37°C na presença de 5% de CO₂ e pré-tratados com anti-CD11b/CD18 (10 μ M) ou anti-CD14 (10 μ M) 30 min antes da infecção por BCG, MOI 1. Nós observamos que o pré-tratamento inibe a (A) formação de corpúsculos lipídicos e a (B) produção de PGE₂, e não altera a produção de (C) TNF- α após a infecção por BCG. O número de corpúsculos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA), e o TNF- α por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre o grupo controle e infectado por BCG; # diferença entre os grupos tratados e não tratados e infetados por BCG; ($p < 0,05$).

4.6) Envolvimento de lipid rafts na sinalização celular durante a infecção por BCG

As *lipid rafts* são domínios lipídicos na superfície celular onde encontramos compartimentalizados vários receptores relacionados ao reconhecimento de patógenos, dentre eles TLR4, TLR2, TLR1, TLR6, bem como CD11b/CD18 e CD36. Nestas análises nós investigamos a participação dos *lipid rafts* no fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e TNF- α durante a infecção por BCG.

Paralelo com os dados descritos para a participação de CD11b/CD18 e CD14 o tratamento dos macrófagos com drogas que desestruturam *lipid rafts* como M β CD (15 μ g/mL), e filipina (2 μ g/mL) promovem a inibição da formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 26A e B) e a produção de PGE₂ (Fig. 26C), mas não de TNF- α (Fig. 26D).

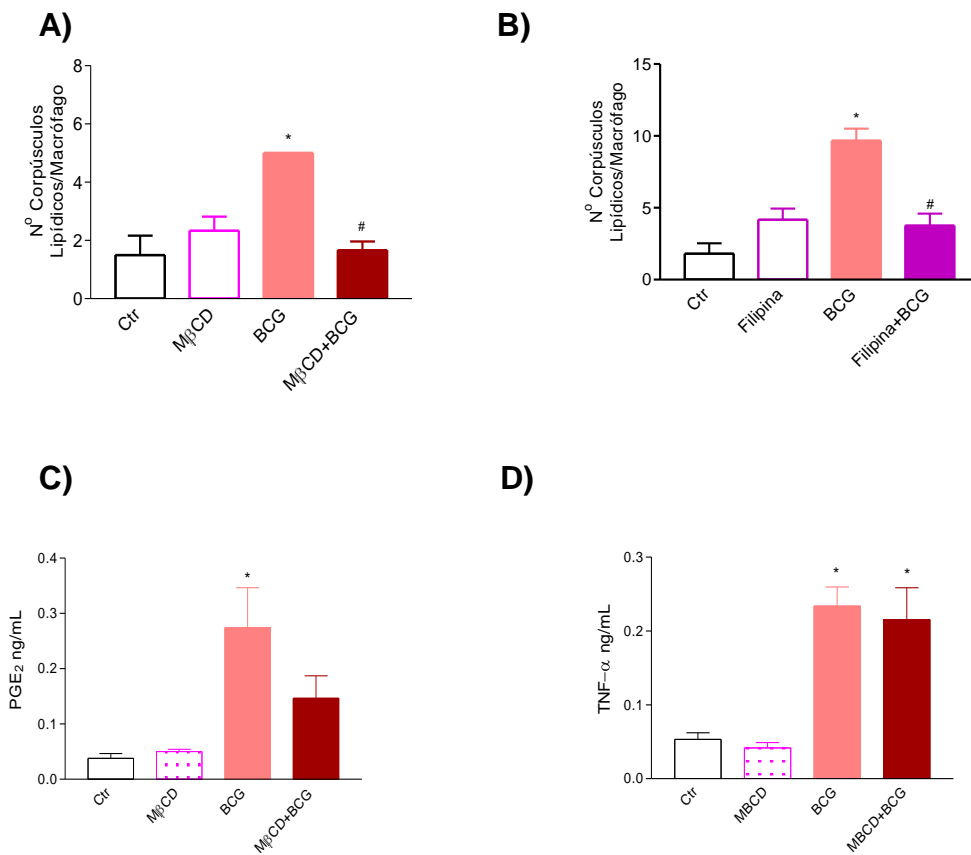


Figura 26 – Análise do envolvimento de *lipid rafts* na formação de corpúsculos lipídicos produção PGE₂ e TNF-α. Os macrófagos peritoneais de camundongos normais foram incubados a 37°C na presença de 5% de CO₂ e pré-tratados com MβCD (15 μg/mL) ou Filipina (2 μg/mL) 30 min antes da infecção por BCG, MOI 1. Nós observamos que o pré-tratamento dos macrófagos com (A) MβCD ou (B) filipina inibe a formação de corpúsculos lipídicos, (C) produção de PGE₂, e não altera a produção de (D) TNF-α. O número de corpúsculos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA), e o TNF-α por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média ± erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre o grupo controle e o grupo infectado por BCG; # diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados e infectados por BCG; (p<0,05).

4.7) Estudo da participação de CD36 na infecção de macrófagos peritoneais durante a infecção por BCG

O CD36 tem sido descrito como um receptor *scavenger* envolvido com a formação de macrófagos espumosos importante em condições patológicas como na aterosclerose. Aqui nós pretendemos avaliar a participação do CD36 na infecção por BCG.

Por análises de citometria de fluxo observou-se que o CD36 teve sua expressão aumentada nos macrófagos peritoneais após 24 horas de infecção por *M. bovis*, BCG *in vitro* medida pela intensidade de fluorescência do CD36 conjugado ao FITC (Fig. 27A e B) que foi acompanhada pelo aumento da formação de corpúsculos lipídicos medida pela intensidade média de fluorescência do BODIPY (Fig. 27C e D).

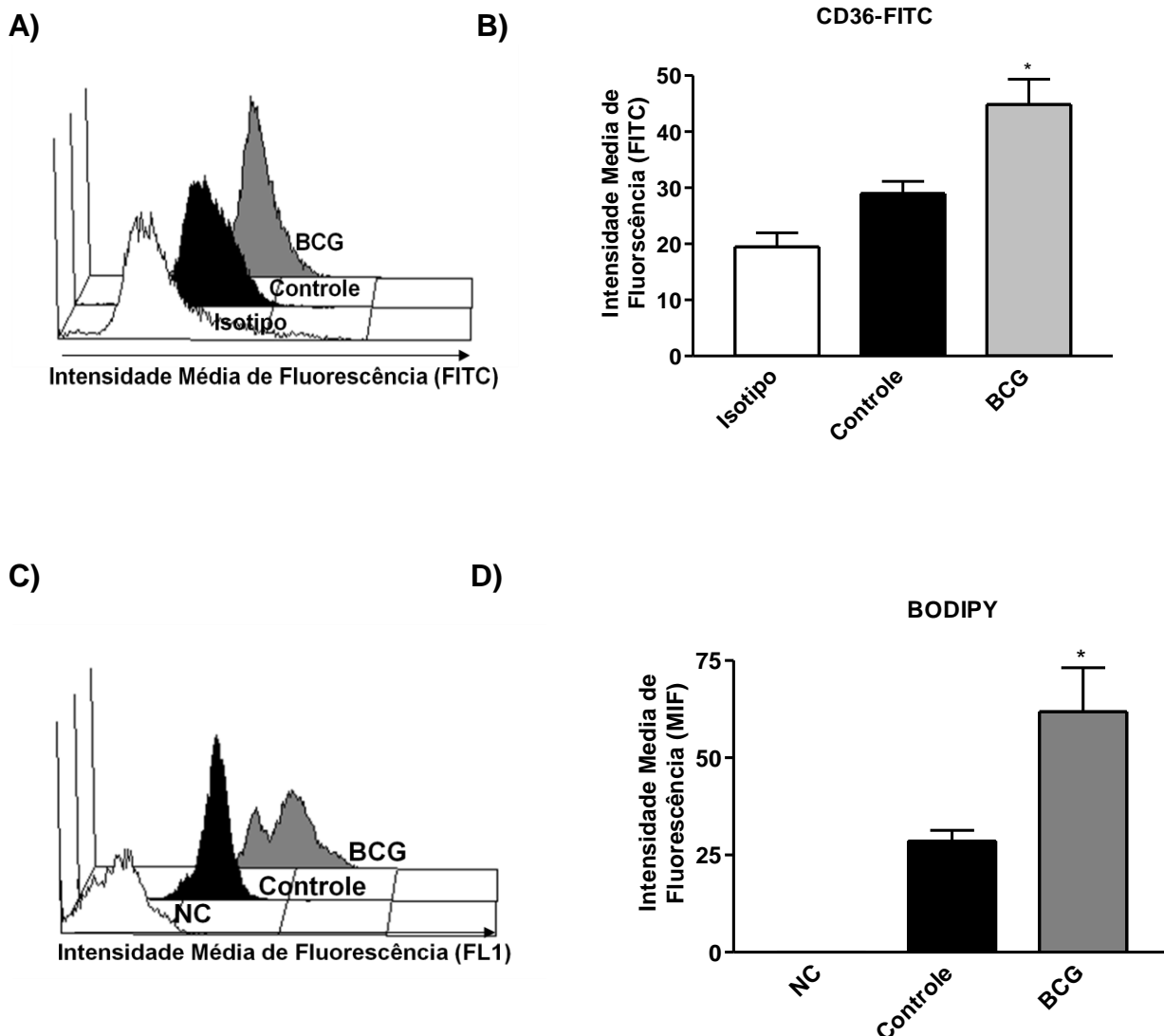


Figura 27 – Estudo da participação do receptor CD36 de macrófagos peritoneais durante a infecção por BCG 24h. Os valores da intensidade média de fluorescência (MIF) do FITC para CD36 ou do BODIPY para os corpúsculos lipídicos foi expressa em histograma (A e C), seguido pela representação gráfica (B e D). Em (A e B) marcação de CD36, onde observamos o controle do Isotipo IgG (branco), células controles não infectadas, (preto) e macrófagos infectados por BCG (cinza). Em (C e D) marcação para corpúsculos lipídicos, observamos os macrófagos não corados (NC) os macrófagos controles (preto) e os macrófagos infectados (cinza). Os histogramas mostram a intensidade média de fluorescência (FL1) (A) ou BODIPY (B) de 10.000 eventos; n=3 (total de 10 animais/grupo). As análises foram feitas no citômetro de fluxo (FACS CALIBUR “Flow Cytometry System”).

4.7.1) Avaliação do papel do CD36 na ativação dos macrófagos peritoneais após a infecção por BCG 24 horas *in vitro*

O anticorpo neutralizante para CD36 (anti-CD36) na concentração de 2 µg/mL foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 28A), produção de PGE₂ (Fig. 28B), mas não afetou a produção de TNF-α (Fig. 28C) após 24 horas de infecção.

Além disso, por análise de *Western blotting* nós pudemos avaliar que o tratamento com o anticorpo neutralizante para o CD36 foi capaz de regular a própria expressão de CD36 nos macrófagos peritoneais infectados por BCG 24 horas, raia quatro (Fig. 29).

De modo interessante, na figura 30 que o pré-tratamento dos macrófagos com o anticorpo neutralizante para o receptor CD36, foi capaz de regular negativamente a expressão de PPAR_γ nos macrófagos infectados por BCG, visualizado na raia quatro (Fig. 30).

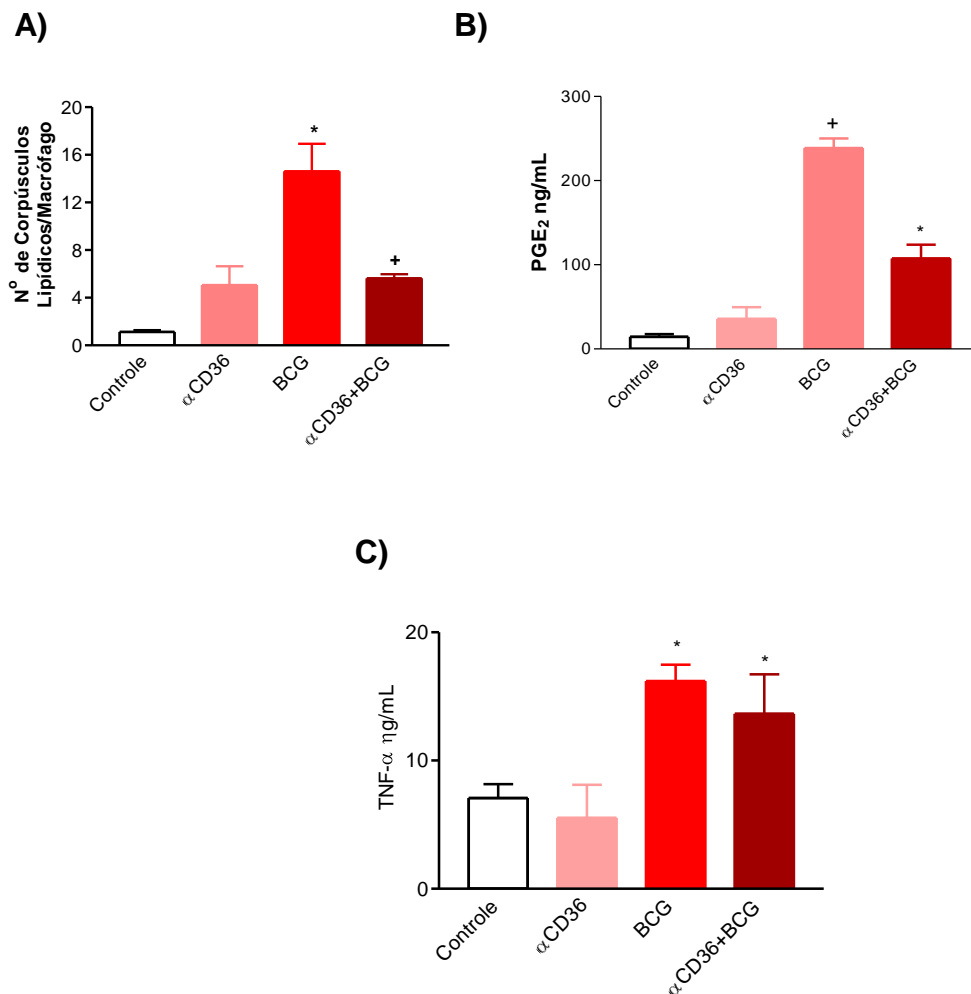


Figura 28 – Análise da participação do receptor CD36 na formação de corpúsculos lipídicos produção de PGE₂ e TNF- α , 24 h após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais foram incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ e pré-tratados com o anticorpo neutralizante para o CD36 (2 μ g/mL) 30 min antes da infecção por BCG, MOI 1. Nós observamos que o pré-tratamento dos macrófagos inibiu a (A) formação de corpúsculos lipídicos, (B) produção de PGE₂, e não alterou a (C) produção de TNF- α . O número de corpúsculos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA), e o TNF- α por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre o grupo controle e o grupo infectado por BCG; + diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados infectados por BCG; ($p < 0,05$).

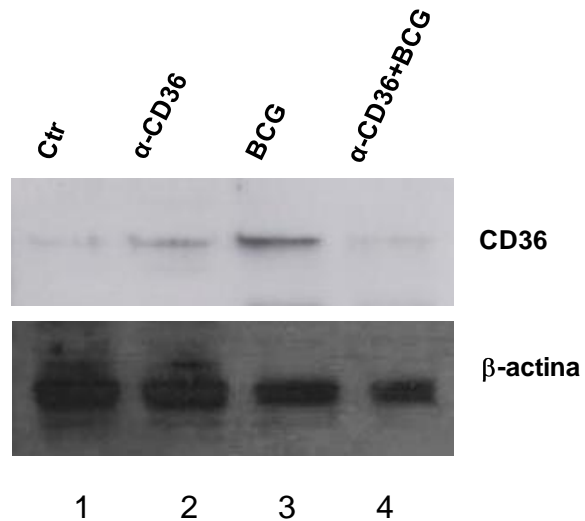


Figura 29 – Análise da expressão de CD36 por *Western blotting* em macrófagos infectados com BCG, tratados ou não com anticorpo neutralizante para o receptor CD36 *in vitro*. Observamos que o BCG, MOI 1, induz aumento da expressão do CD36 (88 kDa) (raia 3), e que o tratamento com o anticorpo neutralizante para CD36 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) bloqueia a capacidade do BCG induzir a expressão do CD36 (raia 4). Para a separação das proteínas os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, aplicamos 30 μL de proteínas totais. Para a detecção de CD36 utilizou-se anticorpo de coelho anti-CD36 na diluição (1:400).

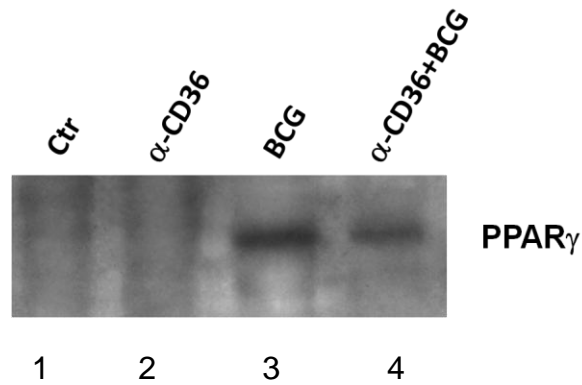


Figura 30 – Avaliação da expressão de PPAR γ por *Western blotting* em macrófagos infectados com BCG, tratados ou não com anticorpo neutralizante para o receptor CD36 *in vitro*. Nós analisamos a expressão de PPAR γ (57 kDa) nos macrófagos submetidos ao ensaio de neutralização de CD36. Observamos que o pré-tratamento com anti-CD36 modula negativamente a expressão de PPAR γ durante a infecção micobacteriana (raia 4) quando comparado as células que não receberam o pré-tratamento (raia 3). Para a separação das proteínas os lisados celulares foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. Foram aplicados 30 μ L de proteínas totais. Para a detecção de PPAR γ utilizou-se o anticorpo de coelho anti-PPAR γ na diluição (1:500).

4.8) Envolvimento da dectina-1 no reconhecimento micobacteriano e ativação de macrófagos peritoneais

Estudos recentes demonstraram que a dectina-1, um receptor envolvido com o reconhecimento de β -glicanos, pode auxiliar na amplificação da resposta inflamatória através da indução de citocinas dependente de TLR2 em camundongos. Estudos recentes documentaram a participação da dectina-1 em resposta ao *M. tuberculosis* (Rothfuchs e cols., 2007).

A participação de possíveis co-fatores para TLR2 no reconhecimento micobacteriano, foi verificada com o uso de anticorpo neutralizante para dectina-1 (2 μ g/mL), documentamos que este receptor tem um papel importante no que diz respeito à formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios. A dectina-1 foi o único receptor em adição ao TLR2 capaz de inibir os três parâmetros analisados neste estudo; a formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 31A), a produção de PGE₂ (Fig. 31B), bem como a síntese de TNF- α (Fig. 31C). Isto sugere que a dectina-1 pode atuar em conjunto com TLR2, no que diz respeito à formação de corpúsculos, produção de mediadores lipídicos, bem como na secreção de citocinas.

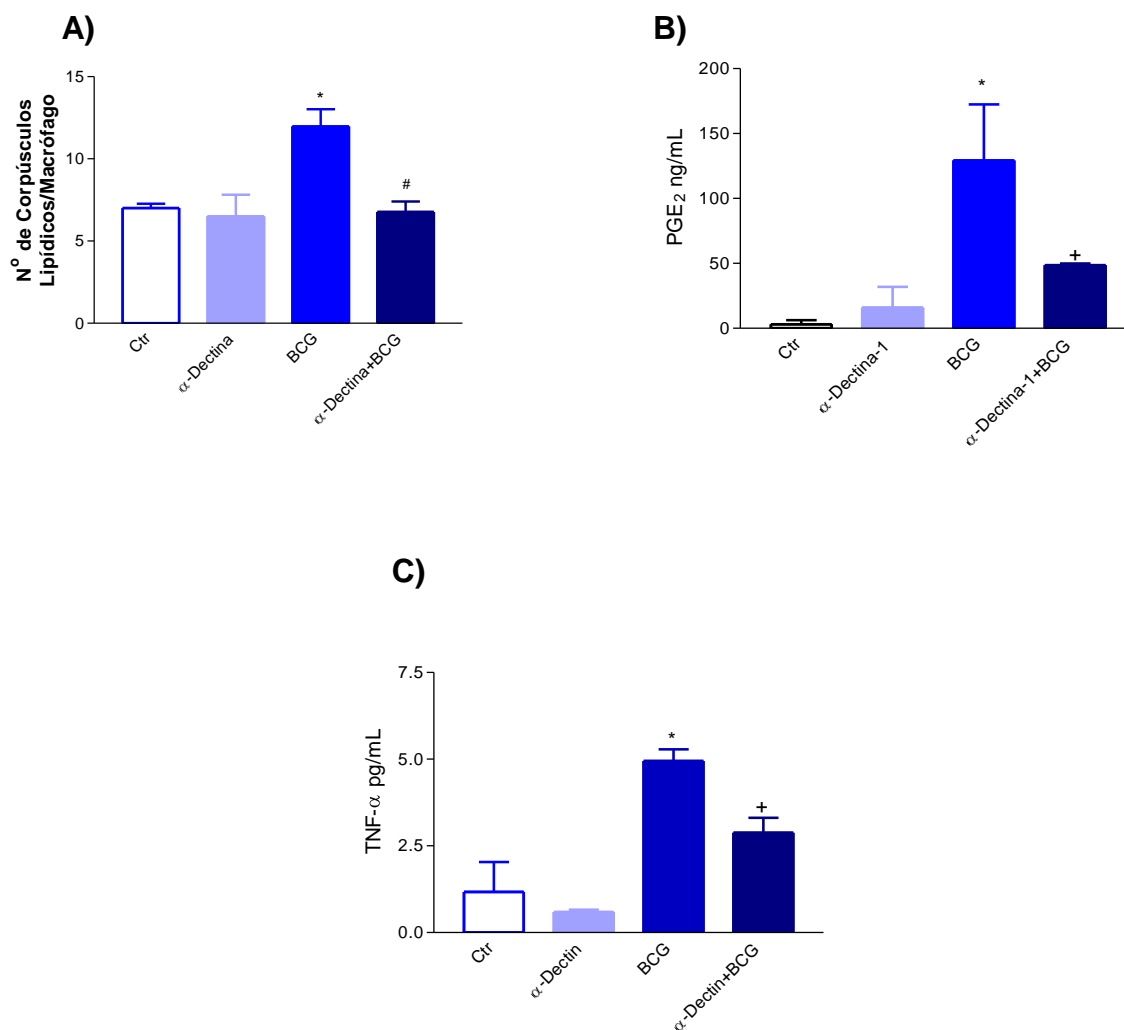


Figura 31 – Análise da participação do receptor de β -glicanos, dectina-1, na formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e TNF- α , 24 h após a infecção por BCG. Os macrófagos peritoneais foram incubados a 37°C na atmosfera de 5% de CO₂ e pré-tratados com anti-dectina-1 (2 μ g/mL) 30 min antes da infecção por BCG, MOI 1. Nós observamos que o pré-tratamento dos macrófagos inibiu (A) a formação de corpúsculos lipídicos, (B) a produção de PGE₂, (C) e a produção de TNF- α . O número de corpúsculos foi obtido pela contagem de 50 células consecutivas em microscópio de campo claro, os níveis de PGE₂ foram detectados por ensaio imunoenzimático (EIA), e os níveis de TNF- α por ELISA. Os resultados são representativos de 3 experimentos independentes e expressam a média \pm erro padrão da média (EPM); n=3; * diferença significativa entre o grupo controle e infectado por BCG; + diferença entre os grupos tratados e não tratados infectados por BCG; ($p < 0,05$).

5) DISCUSSÃO

Os macrófagos são os principais agentes de defesa contra patógenos intracelulares e têm importante papel no metabolismo de lipídios e processos inflamatórios. Embora existam vários estudos sobre a resposta inflamatória em doenças como a tuberculose, pouco se sabe sobre os eventos celulares e moleculares envolvendo o papel de mediadores inflamatórios na resposta patógeno-hospedeiro.

A diferenciação de macrófagos em células espumosas é uma observação patológica comum em várias doenças, incluindo granulomas formados durante a tuberculose, tanto em condições clínicas, quanto experimentais (Ridley and Ridley, 1987; Hernandez-Pando e cols., 1997; Cardona e cols., 2000) e na aterosclerose, onde o aspecto “espumoso” dos macrófagos é refletido pelo acúmulo intracelular de lipídios.

Nos últimos anos, os corpúsculos lipídicos têm sido considerados como organelas dinâmicas e funcionalmente ativas, atuando na sinalização em leucócitos para regulação do metabolismo lipídico, no tráfego de membranas, na sinalização intracelular e na síntese de mediadores inflamatórios.

Pesquisadores do nosso grupo têm demonstrado a indução de corpúsculos lipídicos em leucócitos durante infecções causadas por patógenos intracelulares. São exemplos a infecção por BCG *in vivo* e *in vitro* (D'Avila e cols., 2006; D'Avila e cols., 2007; Almeida e col., submetido) e a infecção de macrófagos por *Trypanosoma cruzi* (Melo e cols., 2003; D'Avila e cols., 2008b).

Dois estudos recentes de nosso grupo mostraram que o BCG induz formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (macrófagos e eosinófilos) da cavidade pleural *in vivo* (D'Avila e cols., 2006; D'Avila e cols., 2007). Os autores demonstraram que a formação dos corpúsculos lipídicos nos leucócitos durante infecções micobacterianas ocorreu independente da internalização do patógeno. Além disso, o estímulo fagocítico por partículas de látex também não foi suficiente para induzir a biogênese destas organelas, sugerindo que a biogênese de corpúsculos lipídicos é um fenômeno independente da fagocitose e pode estar envolvido com a produção de citocinas durante a infecção. Na linha destes achados D'Avila e cols., (2007) demonstraram que a formação de corpúsculos lipídicos foi independente da participação de receptores para TNF- α , IFN- γ e MCP-1.

A formação de corpúsculos lipídicos é um fenômeno dependente de estímulo, e em parte da neo-síntese de proteínas, sugerindo desta maneira que a ativação de fatores transcricionais estão envolvidos na biogênese destas organelas. De acordo

com os estudos de D'Avila e colaboradores, trabalhos têm documentado que *M. leprae* induz aumento do número de corpúsculos lipídicos, expressão de ADRP e perilipina associadas aos corpúsculos lipídicos em macrófagos e adipócitos (Tanigawa e cols., 2008; Matos e cols., em preparação). Neste estudo foi utilizado o modelo de infecção *in vitro*, para caracterizar a formação de corpúsculos lipídicos induzido por micobactérias. As análises demonstraram um aumento crescente no número de corpúsculos lipídicos a partir de 2 horas atingindo um pico entre 24 e 48 horas após a infecção.

Os mecanismos que regulam o acúmulo intracelular de lipídios, bem como a ativação de fatores transcricionais envolvidos no metabolismo lipídico de macrófagos, durante processos infecciosos e o seu significado na patofisiologia e no curso de doenças desencadeadas por patógenos intracelulares não são completamente entendidos.

Vários trabalhos têm caracterizado a participação de receptores nucleares envolvidos no metabolismo lipídico, como os PPARs, durante processos inflamatórios (Nagy e cols., 1998; Tontonoz, 1998; Chawla e cols., 2001c), mas o papel deste fator transcricional na fisiologia dos macrófagos permanece desconhecido. Estudos têm documentado que PPARs controlam a transcrição gênica da ADRP em camundongos e humanos (Edvardsson e cols., 2006; Motomura e cols., 2006). Na linha destes achados, estes autores identificaram a região de elemento de resposta (PPRE) para PPAR γ dentro da região promotora de transcrição para ADRP (Chawla e cols., 2003; Targett-Adams e cols., 2005).

Para a análise da relação de receptores nucleares com o fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos, foi avaliada a participação do PPAR γ na infecção por *M. bovis*, BCG *in vitro*. Trabalhos recentes demonstraram que um agonista de PPAR γ , o hexadecil azeloil fosfatidilcolina (azPC), presente em frações fosfolipídicas de LDL oxidada ou agonistas do receptor de PAF, induziu aumento no número de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais após estimulação, sugerindo o envolvimento de genes alvo de PPAR γ neste fenômeno. Na literatura atual não encontramos referências sobre o envolvimento dos PPARs durante a resposta do hospedeiro frente a infecções micobacterianas. Assim este trabalho, pela primeira vez, visa mostrar a relação deste receptor com processos infecciosos desencadeados por micobactérias, bem como sua participação na ativação celular e produção de mediadores inflamatórios. De maneira interessante, os resultados

mostraram que a infecção de macrófagos por BCG altera significativamente os níveis de expressão de PPAR γ , sugerindo a participação deste receptor nas vias de sinalização intracelular de macrófagos derivados de monócitos humanos e macrófagos peritoneais de camundongos durante a infecção por BCG. Nos estudos de imunolocalização, verificou-se que o BCG induziu ativação e translocação do PPAR γ para o núcleo celular após 24 h de infecção, tanto em macrófagos humanos quanto de camundongos. Um ponto curioso deste estudo foi a observação de imagens da localização do PPAR γ ao redor de estruturas sugestivas de serem fagossomas bacterianos ou em suas proximidades às 48 horas após a infecção. Uma vez que o significado funcional do PPAR γ durante as infecções micobacterianas não é conhecido, estes resultados revelam que este receptor pode ter importante papel nos mecanismos intracelulares envolvidos com o acúmulo de lipídios de macrófagos desencadeados por micobactérias.

O papel antiinflamatório de agonistas de PPAR γ pela ativação farmacológica, como os TZDs, agonistas sintéticos de PPAR γ são amplamente usados para tratamento de diabetes tipo II. Sua eficácia clínica no diabetes, juntamente com estudos iniciais de seus efeitos mediando a resposta inflamatória em linhagens macrofágicas, têm relacionado a participação de PPAR γ como um modulador endógeno da inflamação (Crosby e cols., 2005).

Para as análises do papel de PPAR γ na ativação ou desativação celular durante a infecção por BCG, utilizou-se um agonista da classe dos TZDs o (BRL49653). Os resultados mostraram que o BRL49653 foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos. Além disso, este agonista foi capaz de potencializar a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos infectados com doses sub-ótimas de BCG (1 UFC:20 macrófagos). Mais ainda, foi observado que o antagonista seletivo de PPAR γ o GW9662, inibiu significativamente a formação de corpúsculos lipídicos, nos macrófagos infectados por BCG 24 horas. Em conjunto os dados sugerem uma relevante e importante participação do PPAR γ nos mecanismos que levam ao acúmulo intracelular de lipídios em macrófagos infectados por micobactérias.

O PPAR γ pode exercer seus efeitos na formação de células espumosas por regular a expressão de LXR (Fitzgerald e cols., 2002). A interação entre LXR e TLR representa uma ligação direta entre imunidade inata e o metabolismo de colesterol em macrófagos. Isto sugere que ativação de LXR pode afetar não somente vias de

sinalização relacionadas ao efluxo de colesterol mas também na síntese de ácidos graxos modulados por ligantes de TLR. Vários autores tem reportado que a imunidade inata via TLR pode contribuir diretamente para o desenvolvimento de placas ateroscleróticas (Gibson e cols., 2004; Michelsen e cols., 2004; Mullick e cols., 2008). Esta resposta é mediada por TLR e LXR por vias de regulação bidirecional. Deste modo, a relação de LXR-TLR fornece um mecanismo para explicar como infecções microbianas podem interferir com o metabolismo de colesterol e contribuir para doenças cardiovasculares. A *C. pneumoniae* pode promover o desenvolvimento de células espumosas por desencadear uma resposta pró-inflamatória dependente de TLR, que pode ser inibida pela ativação de LXR (Chen e cols., 2008). Nos dados preliminares que necessitam de confirmação o agonista de LXR, o T0901317, foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (em torno de 5X) comparados às células não estimuladas. Esta formação foi significativamente inibida nos macrófagos infectados por BCG 24 horas (aproximadamente 60%), sugerindo que a infecção por micobactérias inibe vias de ativação de LXR.

Trabalhos recentes têm atribuído que o aumento do número de corpúsculos lipídicos em leucócitos pode resultar em um aumento paralelo da produção de eicosanóides por estas células para revisão ver (Bozza e Bandeira-Melo, 2005; D'Avila e cols., 2006). Os corpúsculos lipídicos formados em macrófagos já se mostraram serem sítios intracelulares de compartimentalização de enzimas formadoras de eicosanóides, incluindo 5-LO e COX-2. Estes autores demonstraram também que o BCG foi capaz de induzir aumento na síntese de PGE₂ e que este mediador é preferencialmente produzido nos corpúsculos lipídicos após 24 horas de infecção. Desta forma, os autores sugerem que os corpúsculos lipídicos funcionam como sítios de síntese deste mediador durante infecções micobacterianas. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos não são bem conhecidos. As análises de produção de PGE₂ mostraram que macrófagos peritoneais *in vitro* são capazes de responder à infecção por BCG, com aumento da produção deste mediador já nas primeiras horas de infecção (2 h), atingindo indução máxima após 24 e 48 horas. Além disso, verificou-se uma importante participação do PPAR_γ na produção de PGE₂ onde o BRL49653 potencializou tanto a formação dos corpúsculos lipídicos quanto a produção de PGE₂, e o antagonista, o GW9662, inibiu significativamente a formação destas organelas, bem como a produção de PGE₂, durante a infecção por BCG. Análises da expressão de COX-2 foram realizadas e

constatamos que esta enzima apresenta expressão aumentada a partir de 2 horas após a infecção por BCG, efeito que permanece até as 24 horas e desaparece completamente após 48 h (dados não mostrados).

O trabalho de Laposata, (1988) caracterizou a indução da expressão da enzima COX-2 durante infecções micobacterianas, principalmente entre 2 e 48 horas. Estes dados contribuem com os resultados apresentados e sugerem que a produção de PGE₂ na infecção por BCG *in vitro* é dependente da expressão de COX-2. De acordo com estes dados, foi demonstrado que macrófagos espumosos localizados em áreas infectadas por *M. tuberculosis* ou em células da cavidade pleural de camundongos tiveram marcação fortemente positiva para COX-2 e PGE₂ (Rangel Moreno e cols., 2002; D'Avila e cols., 2006).

O estudo de Pontsler e cols., (2002) demonstrou que COX-2 é induzida em monócitos por agonistas de PPAR_γ sugerindo a participação deste receptor nas vias de sinalização intracelular que levam à produção de mediadores inflamatórios induzidos por COX-2. Apesar de não termos realizado experimentos relacionados à inibição de COX-2, sugerimos que durante a infecção micobacteriana o PPAR_γ poderia estar modulando positivamente as vias de ativação de COX-2.

Os mecanismos envolvidos na regulação da expressão de PPAR_γ durante a infecção micobacteriana foram investigados. Os PPAR_γ regulam diversos genes da resposta inflamatória de forma complexa (Castrillo e cols., 2003). Os dados da literatura sobre o papel deste receptor na resposta inflamatória têm se mostrado controverso. Alguns estudos têm investigado o potencial efeito antiinflamatório de ligantes de PPAR_γ em monócitos e macrófagos (Chinetti e cols., 2000; Ricote e cols., 1998). Outros autores, no entanto, têm indicado um papel pró-inflamatório através da ativação de PPAR_γ (Chawla e cols., 2001c; Inoue e cols., 2000; Meade e cols., 1999; Pang e cols., 2003).

O Estudo de Chawla e cols., (2001c) demonstrou que células deficientes em PPAR_γ, ativadas por LPS e tratadas com agonistas de PPAR_γ como 15d-PGJ₂ e TZDs podem induzir produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 igualmente em células normais ou deficientes para o receptor PPAR_γ, mostrando que ambos agonistas tem efeitos inespecíficos. Dados semelhantes foram observados por Crosby e cols., (2005) que constataram que a produção de iNOS em células deficientes ou normais para PPAR_γ são igualmente inibidas após o tratamento com concentrações acima de 10 μ m (consideradas altas) de agonistas

sintéticos deste receptor.

Outros estudos relatam a ativação de PPAR γ por seus ligantes na indução e na inibição da expressão de fatores de transcrição como a proteína ativadora 1 (AP-1), STAT e NF- κ B, fatores com importante papel na regulação da resposta inflamatória em vários tipos celulares (Glass and Ogawa, 2006). Outros estudos demonstraram que o eixo de sinalização IL-4 – STAT6 – PPAR γ tem um papel crucial na diferenciação de macrófagos e na imunidade inata contra *Leishmania major* (Huang e cols., 1999; Odegaard e cols., 2007).

O envolvimento de MAPK (p38 e ERK) tem sido demonstrado nas vias de sinalização que envolvem a ativação de NF- κ B e de PPAR γ . Estudo de Appel e cols., (2005) documentou que ligantes de TLR podem mediar diferentes vias de sinalização em células dendríticas humanas resultando em propriedades funcionais distintas, sugerindo que a inibição de vias de MAPK e NF- κ B estão envolvidas na regulação da sinalização de TLR mediada por PPAR γ em células dendríticas, estes efeitos podem estar relacionados com um mecanismo de retroalimentação negativo envolvido na resolução da resposta imunológica.

Diversos mecanismos estão sendo propostos, na regulação das vias de inibição de NF- κ B por PPAR γ . Um deles pode ocorrer através da interação direta do PPAR γ com a subunidades de NF- κ B (p65, p50 ou ambos), e inibição da degradação de I κ B (Daynes and Jones, 2002; Dubuquoy e cols., 2002). Além disso, outros estudos indicam que mecanismos de trans-repressão podem estar ocorrendo, onde PPAR γ compete com NF- κ B por co-ativadores que são necessários para transcrição de genes alvos.

Em resumo, os PPAR γ podem interagir por mecanismos distintos, para revisão ver von Knethen e cols., (2007a), (1^o) pela interação direta na via do NF- κ B, associando-se com NF-AT, AP-1 ou STAT, que são importantes fatores de transcrição envolvidos na expressão de genes pró-inflamatórios, prevenindo a expressão destes genes. (2^o) o PPAR γ pode inibir a atividade de MAPK que é necessária para induzir ativação de genes pró-inflamatórios, por mecanismos ainda desconhecidos. (3^o) o PPAR γ pode bloquear a translocação de PKC α , que normalmente induz a ativação do sistema de oxidação de NADPH responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio. (4^o) o PPAR γ pode interferir com co-fatores transcricionais como SRC-1 ou com a proteína de ligação de CREB (CBP/p300) que induzem a expressão de genes pró-inflamatórios. (5^o) pode ainda

inibir a degradação proteossomal de um complexo de co-repressores dos receptores nucleares.

De acordo com os dados descritos acima, foi documentado o papel da desativação de PPAR γ na síntese de citocinas. O antagonista seletivo de PPAR γ , o GW9662, ao contrário do efeito observado para a inibição de formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE $_2$, não foi capaz de inibir a síntese de citocinas tanto do perfil pró-inflamatório quanto antiinflamatório, sugerindo que ativação de PPAR γ pode modular a resposta de macrófagos por vias de sinalização intracelulares que levam a diferentes respostas durante a infecção micobacteriana.

O entendimento dos mecanismos moleculares mencionados acima ainda não são completamente caracterizados. Por isso é difícil identificar uma única via de sinalização devido à ativação de PPAR γ . É possível que existam mecanismos de sinalização que vão depender: do tipo de celular, da isoforma ou do tipo de PPAR, e da região promotora no gene alvo (revisado por Bensinger and Tontonoz, 2008). É importante considerarmos também que o PPAR γ pode desempenhar funções intrínsecas na ausência de agonistas sintéticos, onde a participação de ligantes endógenos pode desencadear a modulação de processos inflamatórios. Os ligantes dos receptores nucleares podem ter múltiplos alvos celulares, e todos eles têm o potencial de alterar significativamente a expressão de genes envolvidos na formação de células espumosas (Joseph e cols., 2003). Alguns autores têm demonstrado que *C. pneumoniae* induz um aumento da expressão de ACAT1 por vias dependentes de PPAR γ de modo dependente de dose em macrófagos THP-1 expostos a LDL, induzindo deste modo a formação de células espumosas (He e cols., 2008). Mais ainda, os trabalhos de Kim e cols., (2008) e Mei CL e cols., (2009 *in press*), analisaram a participação de PPAR γ durante a infecção por *Chlamydia pneumoniae*, só que um autor relacionou a infecção com a indução da expressão do receptor em células musculares e células endoteliais, o outro mostra que o PPAR γ é regulado negativamente durante a infecção de macrófagos THP-1, em co-cultura com LDL. Este efeito foi dependente do MOI administrada. Neste segundo estudo, os autores sugerem que a bactéria pode afetar a expressão de genes alvos regulados por PPAR α e PPAR γ , levando à formação de células espumosas, mas que estudos futuros necessitam ser realizados.

Diferentes membros da família dos “Toll-like” têm sido implicados no reconhecimento de antígenos micobacterianos, dentre eles: TLR2, TLR4, TLR6 e

TLR1 (Takeuchi e cols., 2002; Sugawara e cols., 2003; Wieland e cols., 2004). Vários trabalhos têm descrito a ativação celular via TLR2 por lipoglicanas da parede celular micobacteriana, como por exemplo, LAM e PIM (Gilleron e cols., 2003; Means e cols., 1999a), sugerindo que TLR2 tem participação crucial na resposta inata contra micobactérias.

Os trabalhos de D'Avila e cols., (2006 e 2007), mostraram que a deficiência para TLR2, mas não para TLR4 impede a migração celular principalmente de neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, para cavidade torácica de camundongos durante a infecção por *M. bovis*, BCG. Nosso interesse então foi investigar a participação dos receptores TLR2 na ativação macrofágica durante a infecção por BCG *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que o BCG não foi capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, bem como a produção de PGE₂ nos macrófagos deficientes para o receptor TLR2.

Foi recentemente demonstrado que macrófagos estimulados via TLR2 desencadeiam uma resposta diferente da observada durante a ativação via TLR4. Estudos mostram os receptores TLR2 e TLR4 implicados no reconhecimento de *Chlamydia pneumoniae*. De modo similar, *Chlamydia pneumoniae*, tem sido caracterizada na formação de células espumosas em humanos e camundongos, sendo capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em camundongos deficientes para o receptor TLR4, mas não em camundongos deficientes para o receptor TLR2 na presença de LDL, embora agonistas para os dois receptores sejam capazes de desencadear a formação de células espumosas e acúmulo de colesterol na presença de LDL (Cao e cols., 2007).

Além de estudarmos o envolvimento de TLR2 durante a infecção por BCG em macrófagos, nós também investigamos a participação de TLR2 em outro tipo celular, os eosinófilos, durante a infecção *in vivo* (D'Avila e cols., 2007 anexo 2). Os eosinófilos são encontrados em tecidos que apresentam uma interface com o ambiente externo e sua flora bacteriana, são exemplos, o trato gastrointestinal e o trato respiratório. Algumas evidências têm relacionado os eosinófilos não somente com doenças alérgicas ou helmínticas, mas também com várias funções imunomodulatórias (Rothenberg and Hogan, 2006). Infecções micobacterianas frequentemente induzem um recrutamento de eosinófilos tanto em humanos (Vijayan e cols., 1992) quanto em modelos de infecções em animais (Menezes-de-Lima-Junior e cols., 1997; Castro e cols., 1991; Werneck-Barroso e cols., 2000; Penido e cols., 2003; Lasco e cols., 2004).

Uma vez que TLR2 tem papel chave na formação de corpúsculos lipídios em macrófagos peritoneais, foi investigado se os eosinófilos provenientes dos animais TLR2^{-/-} respondiam do mesmo modo durante a infecção. Assim, documentamos que os eosinófilos dos animais TLR2^{-/-} não apresentaram aumento no número de corpúsculos lipídicos. Este efeito foi diferente do observado para as células dos camundongos TLR4^{-/-}, onde a deficiência deste receptor não interfere com a formação dos corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG.

De acordo com os dados apresentados acima, Fremond e cols., (2003) mostraram que a produção de mediadores inflamatórios, a ativação e o recrutamento de macrófagos em camundongos é independente de TLR4 durante a infecção por BCG. Em contrapartida, estudos têm demonstrado que eosinófilos não expressam TLR2, TLR4, ou CD14, e conseqüentemente não são capazes de responder diretamente a ligantes de TLR2 ou TLR4 (Sabroe e cols., 2002; Meerschaert e cols., 2000). No entanto, outros trabalhos documentaram que ligantes de TLR4 como o LPS são capazes de induzir o acúmulo de eosinófilos *in vivo* em modelos experimentais através de mecanismos dependentes da produção de citocinas derivadas de monócitos/macrófagos e linfócitos (Penido e cols., 2003; Bozza e cols., 1994). Assim, os mecanismos dependentes de citocinas derivadas destes tipos celulares podem estar envolvidos no recrutamento de eosinófilos durante a infecção por BCG. Mas diferente do observado por estes autores, nossos dados demonstraram que os fenômenos avaliados durante a ativação dos eosinófilos por BCG foram independentes da participação das citocinas como MCP-1, TNF- α e IFN- γ .

Estudos têm descrito o papel da IL-5 no acúmulo de eosinófilos induzidos por *Mycobacterium bovis*, BCG (Menezes-de-Lima-Junior e cols., 1997). Aqui, analisamos o envolvimento de TLR2 na síntese de IL-5 durante a infecção micobacteriana. Os animais TLR2^{-/-} produziram quantidades reduzidas desta citocina na cavidade pleural, quando comparados aos níveis detectados nos animais TLR2^{+/+} após 24 horas de infecção. Em paralelo nós documentamos também a participação deste receptor na síntese de IL-5 durante a infecção em macrófagos peritoneais *in vitro* (dados não mostrados). Estas observações indicam que IL-5 produzida durante a infecção por *M. bovis*, BCG é principalmente dependente da ativação de TLR2.

A eotaxina é um mediador chave no tráfego de eosinófilos dentro de tecidos inflamados (Rothenberg and Hogan, 2006). Bandeira-Melo e cols., (2001b) documentaram que a ativação da via de CCR3 mediada por eotaxina representa um

potente mecanismo indutor da formação de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos. Nós demonstramos que o BCG induz um significativo aumento da produção de eotaxina na cavidade pleural de camundongos TLR2^{+/+}, mas não em animais TLR2^{-/-}. Para investigar o papel da eotaxina, na formação de corpúsculos lipídicos e no recrutamento de eosinófilos induzidos por BCG *in vivo*, nós realizamos o pré-tratamento dos camundongos com anticorpos neutralizantes para eotaxina ou para CCR3, 30 min antes da infecção. Os pré-tratamentos foram capazes de inibir significativamente o influxo de eosinófilos, bem como a formação de corpúsculos lipídicos, indicando que a eotaxina endógena induz ativação eosinofílica via CCR3 capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos nos eosinófilos durante a infecção micobacteriana.

O potencial bactericida dos eosinófilos tem sido demonstrado por sua habilidade fagocítica e pela mobilização de proteínas citotóxicas dos grânulos após infecção (DeChatelet e cols., 1977; Svensson and Wenneras, 2005), o que sugere um papel protetor dos eosinófilos durante as infecções bacterianas. Outros trabalhos têm associado o aumento do número de eosinófilos no sítio da infecção micobacteriana com o crescimento da micobactéria em animais suscetíveis a infecção (Erb e cols., 1999). Isto sugere que os eosinófilos podem exacerbar a doença de maneira a fornecer um ambiente intracelular no qual a micobactéria possa proliferar, contribuindo deste modo para a disseminação do patógeno (Kirman e cols., 2000). No entanto, o papel dos eosinófilos na resposta imune do hospedeiro durante infecções micobacterianas em modelos de tuberculose experimental e clínica ainda não é bem definido.

Corroborando com os dados observados em macrófagos (D'Avila e cols., 2006), os achados em eosinófilos demonstraram que a infecção micobacteriana é capaz de induzir a ativação destas células em uma via dependente da sinalização desencadeada por TLR2. O recrutamento e ativação dos eosinófilos induzidos por BCG é dependente de TLR2 e mediada pela geração de eotaxina e da sinalização através de CCR3.

O TLR2 tem papel fundamental na síntese de citocinas por macrófagos durante a infecção micobacteriana. Estas citocinas podem exercer diferentes efeitos regulatórios na ativação de macrófagos e células do sistema imune durante processos infecciosos. Além disso, componentes da parede celular micobacteriana podem desencadear a ativação e expressão de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, representando a primeira linha de defesa do sistema imune contra a

infecção (Underhill e cols., 1999).

Os macrófagos são as principais células fagocíticas e respondem às infecções micobacterianas com produção de uma série de citocinas, que possuem ações antagônicas, dentre elas, TNF- α , TGF- β , IL-12 e IL-10 (D'Avila e cols., 2006; Flesch and Kaufmann, 1993; Kaufmann, 2002; Bhatt and Salgame, 2007). Isto sugere que o balanço entre citocinas pró- e antiinflamatórias pode contribuir para um equilíbrio entre a instalação da doença e uma resposta imune eficiente.

Alguns trabalhos descrevem a estreita relação entre a geração de PGE₂ e a modulação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias (Betz and Fox, 1991; Renz e cols., 1988). Os resultados mostraram que durante a infecção por BCG as citocinas produzidas podem apresentar um perfil pró-inflamatório, dentre elas IL-1 α , IL-12(p70), quimiocinas como (KC), citocinas imunorregulatórias como a IL-10 bem como citocinas relacionadas com fatores de crescimento como G-CSF e GM-CSF (dados não mostrados). Paralelo com as observações nos eosinófilos, o TLR2 mostrou-se fundamental para a síntese da maioria das citocinas estudadas. Mas o receptor não foi necessário para o BCG induzir a produção de (MIP-1 α e RANTES), onde os níveis destas citocinas nos macrófagos TLR2^{-/-} foram similares aos detectados para os macrófagos dos animais TLR2^{+/+}. A presença de outros receptores envolvidos na sinalização por BCG, como os receptores de manose e CD14 que reconhecem o LAM (Hoheisel e cols., 1995; Schluger and Rom, 1998), podem em menor ativar vias intracelulares, levando à produção de MIP-1 α e RANTES. Os resultados sugerem que componentes da parede celular de micobactérias podem induzir a produção de quimiocinas por mecanismos dependentes e independentes de TLR2.

As análises de imunolocalização mostraram que o LPS, o principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, foi capaz de induzir a translocação de NF- κ B de maneira independente de TLR2, mas este receptor se mostrou indispensável na sinalização desencadeada por LAM. Assim, os macrófagos dos animais TLR2^{-/-} foram incapazes de induzir a expressão e consequentemente a translocação do NF- κ B para o núcleo dos macrófagos, sugerindo que o TLR2 é fundamental na ativação de vias de sinalização celular induzindo a ativação de NF- κ B por LAM, mas não por LPS.

Vários trabalhos têm descrito a ativação celular via TLR2 por lipídios micobacterianos, sugerindo que TLR2 tem participação crucial na resposta inata

contra micobactérias. Após a detecção e o reconhecimento microbiano por TLRs, uma ou mais proteínas adaptadoras dos TLRs no citoplasma celular são ativadas. Quatro domínios contendo estas proteínas adaptadoras estão envolvidos na propagação da sinalização desencadeada por TLRs. São elas, MyD88, TRAM, TRIF e TIRAP. A ativação dessas proteínas levam à expressão de fatores transcricionais como NF- κ B, AP-1 e fatores regulatórios de interferons (IRF), os quais induzem a ativação de centenas de genes envolvidos na resposta imune (Yamamoto e cols., 2002; Yamamoto e cols., 2003a; Yamamoto e cols., 2003b). No entanto, nem todos os TLRs utilizam os mesmos adaptadores. Por exemplo, TIRAP e MyD88 (ativação induzida a partir da membrana plasmática) induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, diferente de TRAM e TRIF (ativados a partir de endossomos) que induzem a resposta de interferons (Yamamoto e cols., 2003b; Horng e cols., 2002).

Durante a ativação desencadeada por ligantes de TLR2, várias proteínas no ambiente intracelular, dentre elas o TIRAP, são ativadas. Nos estudos de imunolocalização foi possível verificar que a infecção por BCG 24 horas, induziu a ativação de TIRAP, diferente do observado para as células que não foram infectadas, mostrando que ligantes de TLR2 induzem a ativação da cascata de sinalização intracelular em macrófagos infectados. Assim, estes resultados demonstraram que TLR2 é fundamental para induzir a formação de corpúsculos lipídicos e mediadores inflamatórios durante, como também na indução da expressão de PPAR γ durante a infecção micobacteriana.

Em resumo, demonstrou-se que o receptor TLR2 é necessário e participa das vias de sinalização que levam à indução da expressão de PPAR γ nos macrófagos peritoneais *in vitro* durante a infecção por BCG 24 horas. Além disso, a infecção por BCG altera significativamente os níveis de expressão de PPAR γ de maneira dependente de TLR2 e sugere-se que os receptores nucleares ativados por lipídios podem modular a formação de corpúsculos lipídicos, a síntese de PGE₂ e a função de macrófagos durante infecções micobacterianas.

A habilidade de componentes da parede celular micobacteriana como LAM induzir a expressão de PPAR γ foi investigada. O LAM foi capaz de induzir o aumento da expressão e a translocação de PPAR γ para o núcleo dos macrófagos de modo dependente de TLR2. Assim, sugere-se que componentes da parede celular e produtos derivados de patógenos intracelulares estão envolvidos nos mecanismos de ativação de receptores nucleares por vias dependentes de TLR2. De fato a

ativação de macrófagos *in vitro* por agonistas de TLR2 (*M. smegmatis*, Pam₃cys e zimosan) foram eficientes na ativação celular no sentido de desencadear a síntese de citocinas como TNF- α e KC, em quantidades significativas similares às induzidas por BCG. No entanto, estes ligantes não foram capazes de induzir formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂, ou induzir expressão de PPAR γ , indicando que ligantes de TLR2 não são suficientes para induzir vias de ativação celular envolvidas no acúmulo intracelular de lipídios. Estes dados estão de acordo com os estudos de Peyron e cols., (2008) demonstraram que apenas espécies virulentas de micobactérias como *M. tuberculosis* e *M. avium*, são capazes de induzir a formação de macrófagos espumosos diferente do observado para cepas avirulentas como *M. smegmatis* que foram incapazes de desencadear a formação destas células. Assim, sugere-se que os corpúsculos lipídicos participem nos mecanismos de sobrevivência e escape de patógenos intracelulares do sistema imune por vias dependentes de TLR2.

Embora a ativação de TLR2 seja essencial para o fenômeno de formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios na infecção por BCG, sua ativação *per se* não é suficiente para desencadear a ativação de vias que levem à formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e expressão de PPAR γ em condições de ativação não patogênicas, sugerindo, deste modo, a participação de outros co-fatores na indução destes fenômenos.

O TLR2 é o mais promíscuo dos receptores TLRs descritos. Esta característica está relacionada à sua habilidade única de se heterodimerizar com outros TLRs, como TLR1 e TLR6 (Ozinsky e cols., 2000b) e também a outras moléculas sinalizadoras. Alguns trabalhos têm demonstrado a capacidade de TLR2 de formar heterodímeros com TLR1 e TLR6 por mecanismos que ocorrem independentemente de ligantes (Triantafilou e cols., 2006; Ozinsky e cols., 2000b).

Os resultados mostraram que o TLR6 não tem papel essencial na resposta celular durante a infecção por *M. bovis*, BCG. Onde a formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e TNF- α não estavam alterados nos macrófagos peritoneais dos animais TLR6^{-/-}, quando comparados aos macrófagos dos animais TLR6^{+/+}.

A participação de CD14 e de integrinas como CD11b/CD18 na formação de corpúsculos lipídicos em células estimuladas com LPS ou histoplasma foi documentado (Pacheco e cols., 2002; Sorgi C e cols, 2009 *in press*). Outros estudos

têm demonstrado que o complexo formado entre TLR4/MD2 pode interagir com CD14 e CD11b/CD18. O CD14 tem um papel crítico na resposta celular por se ligar ao LPS de bactérias Gram-negativas bem como a lipídios de Gram-positivas como, as peptideoglicanas, LTA, lipoproteínas e ao LAM (Strapagiel e cols., 2008; Kim e cols., 2008). Além disso, vários trabalhos têm descrito a capacidade do CD14 se associar com TLRs por sua característica de reconhecer PAMPs da parede celular microbiana (Underhill e cols., 1999; Schroder e cols., 2003).

Os experimentos de neutralização de CD14 ou CD11b/CD18 em macrófagos com anticorpos anti-CD14 ou anti-CD11b/CD18, mostraram que os tratamentos foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos durante a infecção por BCG, similar ao observado por Pacheco e cols., (2002) em células estimuladas por LPS. Paralelo a esta análise, os anticorpos neutralizantes anti-CD14 e anti-CD11b/CD18 também foram capazes de inibir a produção de PGE₂, mas estes tratamentos não alteraram a produção de citocinas (TNF- α) durante a infecção por BCG.

Estudos recentes de Triantafilou e cols., (2007) demonstraram que LPS de *H. pylori* e *P. gingivalis* podem induzir a formação de agrupamentos moleculares, compreendendo TLR2, TLR1, CD11b/CD18 e CD36. Após ativação por ligantes específicos estes receptores podem ser recrutados para regiões específicas da membrana celular, chamadas *lipid rafts*. Devido ao importante papel das *lipid rafts* no recrutamento de receptores usados por microorganismos, estas estruturas se tornaram foco de investigações no campo das infecções. São exemplos de patógenos envolvidos neste mecanismo, *E. coli*, *Salmonella thyphymurium*, *Chlamydia spp*, *Mycobacterium spp* entre outros, para revisado ver Lafont and van der Goot, (2005). Vários estudos têm descrito a participação de *lipid rafts* na sinalização celular mediada por TLRs. Nas *lipid rafts* podem ser encontrados compartimentalizados vários receptores relacionados ao reconhecimento de patógenos, dentre eles TLR4, TLR2, TLR1, TLR6, bem como CD11b/CD18 e CD36. No entanto, o papel das *lipid rafts* e a associação de moléculas de sinalização na resposta imune inata, em resposta a infecções micobacterianas ainda permanece desconhecido. Estudo de Gatfield e Pieters, (2003) demonstrou que *M. tuberculosis* vivo usam *lipid rafts* para entrar nas suas células hospedeiras e persistem nos nichos intracelulares escapando da via endocítica. Em contrapartida, o *M. tuberculosis* morto perde esta capacidade e são envolvidos por lisossomos entrando desta maneira na rota endocítica.

Neste estudo foram utilizadas drogas que tem a capacidade de desestruturar estes domínios lipídicos, como a M β CD e a Filipina. Estas drogas têm a capacidade de retirar o colesterol das membranas celulares, desestruturando a associação dos lipídios e proteínas destes domínios. Nós demonstramos em nossos resultados que o pré-tratamento com ambas as drogas (M β CD e a Filipina) interferem de modo significativo na formação de corpúsculos lipídicos. Verificamos também que a M β CD inibiu a produção de PGE₂, mas não a síntese de citocinas como TNF- α . Corroborando estes estudos Shin e cols., (2008) demonstraram a capacidade de lipoproteínas de *M. tuberculosis* induzir a translocação de TLR2 para *lipid rafts*, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio, direcionando para uma resposta pró-inflamatória. No entanto, o tratamento com as drogas que desestruturam *lipid rafts* foi capaz de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio e a resposta inflamatória.

Em resumo, sugere-se que os co-fatores como CD14, CD11b/CD18 e *lipid rafts*, mas não TLR6 participam em conjunto com TLR2 em plataformas de sinalização celular durante a infecção de macrófagos por BCG, induzindo a formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂, mas não estão envolvidos na modulação da síntese de citocinas.

Estudos recentes têm demonstrado a associação de TLR2 com CD36 em resposta a lipoproteínas diaciladas (Triantafilou e cols., 2006, 2007) e lipopeptídeos. Mas ao contrário dos heterodímeros formados entre TLR2/TLR1 e TLR2/TLR6 encontrados nas *lipid rafts*, as associações de TLR2/CD36 não pré-existem nas *lipid rafts*, mas são induzidas pelo ligante ou estímulo. Nilsen e cols., (2008) demonstraram que CD14 e CD36 funcionam como co-receptores de TLR2 e são necessários para reconhecimento de LTA e para a produção de TNF- α em monócitos. Esta sinalização ocorre preferencialmente na membrana plasmática, e é independente da internalização do ligante.

Encontra-se bem estabelecido na literatura a função patológica dos receptores *scavenger* como o CD36 e sua relação com a formação de macrófagos espumosos e com a aterosclerose. A capacidade do CD36 de monócitos e macrófagos de se ligar e endocitar a oxLDL mostra um papel crítico deste receptor na formação de macrófagos espumosos, desencadeando o desenvolvimento da doença aterosclerótica (Collot-Teixeira 2007).

Estudo de Neyrolles e cols., (2006) documentou a participação de receptores

scavenger e CD36 no processo de interação e reconhecimento de *M. tuberculosis* em adipócitos humanos e murinos. Os autores relataram que após a internalização, a micobactéria pode persistir no interior dos adipócitos sem multiplicação aparente. Mas este evento não acontece em pré-adipócitos onde a micobactéria pode estar em estado replicativo. Isto pode sugerir a dependência de diferentes receptores necessários para o bacilo ser fagocitado nos dois tipos celulares. Além disso, este fenômeno pode também depender do estado funcional relacionado ao metabolismo lipídico da célula hospedeira.

Corroborando estes achados vários estudos têm documentado a participação do CD36 em processos de fagocitose, na sinalização celular, desencadeados por vários tipos de patógenos, como bactérias (Stuart e cols., 2005; Baranova e cols., 2008) e protozoários (Ockenhouse e cols., 1991; D'Ombra e cols., 2007; Portugal e cols., 2008).

Estudos têm mostrado a participação do CD36 na sinalização intracelular de maneira independente de TLR, e relacionado com a ativação das vias de MAPK e JNK em macrófagos (Rahaman e cols., 2006, Baranova e cols., 2008). Outros estudos mostram também que, uma vez ativado, o CD36 pode sinalizar por vias dependentes de PPAR γ através da ativação de p38, MAPK, PKC e PKB (Feng e cols., 2000; Munteanu e cols., 2006) e NF- κ B pela via de PKC (Han e cols., 2000).

Os resultados demonstraram que a infecção por BCG induziu um aumento da expressão do CD36, acompanhada por um aumento na formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos peritoneais após 24 horas de infecção. O anticorpo neutralizante para o receptor CD36 foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE $_2$, mas este efeito não foi observado para produção de TNF- α após a infecção, indicando que o CD36 participa das vias que levam ao acúmulo de lipídios e mediadores lipídicos, mas não nas vias de sinalização que levam à secreção de citocinas.

Por análises de *Western blotting* verificou-se que o pré-tratamento com o anticorpo neutralizante foi capaz de regular a própria expressão de CD36 nos macrófagos peritoneais infectados pela micobactéria. De modo interessante, documentou-se também que a neutralização do CD36 interferiu negativamente na expressão de PPAR γ nos macrófagos após 24 horas de infecção por *M. bovis*, BCG. Estes resultados pela primeira vez, sugerem um importante papel da participação de receptores *scavenger* como CD36 na regulação da expressão de receptores nucleares como o PPAR γ e na ativação de macrófagos durante a sinalização

desencadeada por patógenos intracelulares.

Ainda buscando possíveis co-fatores de TLR2 nos mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios e citocinas durante a infecção micobacteriana, analisou-se o papel do receptor de β -glicanos, a dectina-1, nestes fenômenos. O papel da dectina-1 em processos biológicos durante infecções micobacterianas ainda permanecem desconhecidos. Os resultados mostraram que a dectina-1, estava diretamente envolvida na formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂ e da síntese de citocinas. Foram realizados ensaios de neutralização para este receptor e observamos depois de 24 horas, uma inibição parcial e significativa da formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE₂, bem como de TNF- α , diferente do observado para os outros co-fatores analisados (CD14, CD11b/CD18, CD36) e *lipid rafts*, que não mostraram efeito para a síntese de citocinas. Desta maneira, documentou-se pela primeira vez, que a dectina-1 foi fundamental para desencadear vias de ativação celular que levam tanto à formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios, quanto à síntese de citocinas durante a infecção por *M. bovis*, BCG *in vitro*.

Outros estudos têm demonstrado que durante a infecção de macrófagos por cepas micobacterianas avirulentas, a produção de TNF- α foi dependente de dectina-1, mas em macrófagos infectados por cepas virulentas como *M. avium* e *M. tuberculosis* esta indução foi independente de dectina-1 (Yadav and Schorey, 2006). No entanto, outros estudos mostram que a sinalização dependente de dectina-1 é importante para *M. tuberculosis* induzir a produção de IL-12(p40) e IL-12(p70) (Rothfuchs e cols., 2007). Estes autores ainda discutem que a dectina-1 funciona independentemente da sinalização desencadeada por TLR2, uma vez que o bloqueio de dectina-1 por ligantes específicos inibe a produção de IL-12(p40) em células dendríticas de camundongos TLR2^{-/-} durante a infecção por *M. tuberculosis*. Estes dados sugerem que além da sinalização desencadeada por TLR2 outras moléculas sinalizadoras como a dectina-1, podem induzir uma resposta celular de modo independente de TLR2 durante infecções micobacterianas.

Análises de microscopia eletrônica têm demonstrado uma íntima associação de corpúsculos lipídicos com fagossomas contendo micobactérias ou associados à infecção por *Trypanosoma cruzi* (Melo e cols., 2003; D'Avila e cols., 2006). Corroborando com estes dados, Peyron e cols., (2008) demonstraram que macrófagos espumosos podem servir como um reservatório para persistência do *M. tuberculosis*. Os autores demonstraram que nestas células o bacilo perde a

capacidade replicativa, mas permanece vivos. Além disso, os autores mostraram imagens sugestivas do englobamento ou internalização das bactérias por grandes corpúsculos lipídicos. Assim, os autores confirmaram dados de Hunter e cols., (2007), que demonstraram como resultado da fusão, bactérias livres dentro dos corpúsculos lipídicos, sugerindo deste modo o favorecimento do acesso da bactéria aos nutrientes do hospedeiro.

A diferenciação de macrófagos em células espumosas indica a perda da capacidade de fagocitar novos bacilos, assim como a redução da atividade microbicida. Deste modo, os autores sugerem que os macrófagos espumosos formados nos granulomas durante a tuberculose podem funcionar como reservatórios seguros para a persistência do bacilo em estado dormente não-replicativo. Uma característica de alguns bacilos transferidos para o interior dos corpúsculos lipídicos é que eles apresentam suas próprias inclusões lipídicas intracitoplasmáticas, constituído basicamente de triacilglicerol (Daniel e cols., 2004; Deb e cols., 2006). Isto pode ser considerado como uma característica do estado dormente, não replicativo do bacilo (Neyrolles e cols., 2006; Peyron e cols., 2008).

Outros estudos têm demonstrado a participação de corpúsculos lipídicos em infecções por *Chlamydia trachomatis*. Os corpúsculos lipídicos formados durante a infecção por este patógeno podem ser translocados para dentro do lúmen de vacúolos parasitóforos contendo corpos reticulares, (forma replicativa da *Chlamydia trachomatis*) (Cocchiaro e cols., 2008).

Existem evidências onde proteínas provenientes do parasito podem estar envolvidas na captura e re-utilização dos corpúsculos lipídicos citoplasmáticos por remover um modulador chave do estoque de lipídios, a ADRP (Cocchiaro e cols., 2008). Além disso, o transporte dos corpúsculos lipídicos para o lúmen do vacúolo parasitóforo, pode representar um mecanismo de sequestro e subversão da organela pela bactéria. Este mecanismo pode ser uma estratégia do microorganismo para permanecer “escondido” da resposta imune inata enquanto obtém nutrientes das células hospedeiras. Corroborando com estes dados, tem sido mostrado que *M. leprae* induz aumento da expressão de ADRP e perilipinas que estavam localizadas na membrana de fagossomas contendo o bacilo, sugerindo que o acúmulo dos corpúsculos lipídicos pode evitar como fonte de nutrientes para sobrevivência intracelular deste patógeno (Tanigawa e cols., 2008).

Diversas estratégias de modulação da resposta imune são exercidas por patógenos intracelulares no sentido de viabilizar sua sobrevivência no

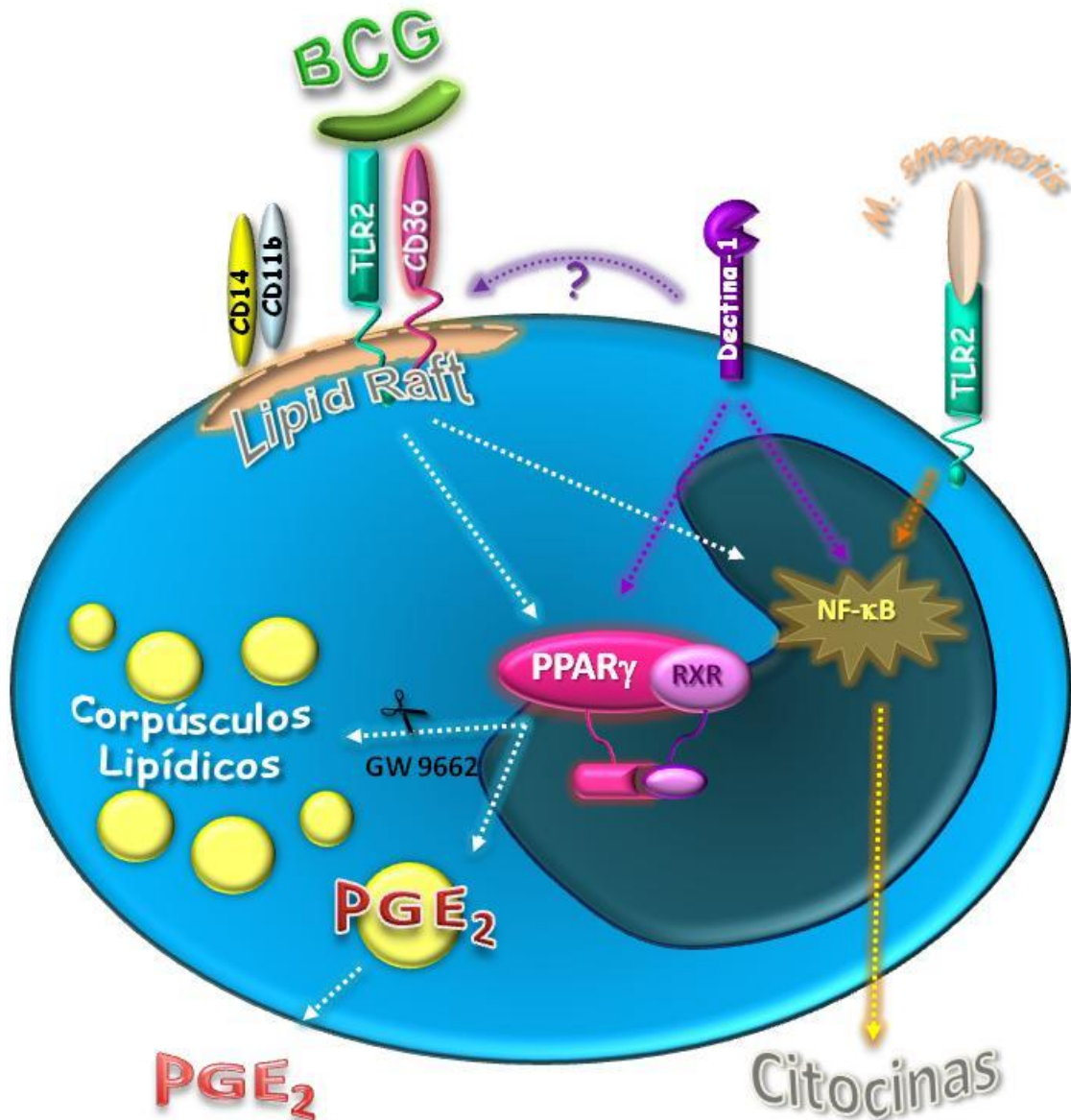
microambiente intracelular. De forma geral, estes mecanismos estão envolvidos na inibição da associação com organelas da via endocítica que envolvem a maturação e acidificação fagossomal, inativação enzimática, e a fusão lisossomal (Vergne e cols., 2004). No entanto, os eventos que regulam estes mecanismos não estão completamente entendidos. Trabalhos de Anes e cols., (2003) documentaram que em culturas de macrófagos infectados por micobactérias, o estímulo com determinados lipídios exógenos foi capaz de modular a maturação fagossomal, com consequente redução da sobrevivência micobacteriana, ao passo que a incorporação de outros tipos de lipídios promove o aumento no crescimento micobacteriano. Estes resultados sugerem um importante papel de lipídios nos mecanismos de modulação do sistema imune nas infecções micobacterianas.

Baseado nos resultados discutidos aqui, nossas perspectivas visam estudar o envolvimento da ativação de PPAR γ na infecção micobacteriana em camundongos, como também a participação do PPAR γ no desenvolvimento da infecção micobacteriana *in vivo*.

Em resumo, os resultados indicam que a infecção de macrófagos por BCG altera significativamente os níveis de expressão do PPAR γ , de maneira dependente de TLR2 e CD36. A ativação de PPAR γ pode modular a ativação celular, induzindo a formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE₂, e a função de macrófagos durante infecções micobacterianas. O estudo da regulação e ativação de receptores nucleares como o PPAR γ durante infecções por patógenos intracelulares traz contribuições sobre os mecanismos básicos de interação e escape, na resposta patógeno-hospedeiro e poderá contribuir para a identificação de novos alvos terapêuticos para a tuberculose.

6) CONCLUSÕES

- ✓ Neste estudo foi caracterizado a participação de TLR2 e seus co-fatores e do receptor nuclear PPAR γ , durante a infecção por *M. bovis*, BCG *in vitro*.
- ✓ O *Mycobacterium bovis*, BCG induz uma resposta inflamatória, caracterizada por aumento no número de corpúsculos lipídicos, produção de várias citocinas e mediadores inflamatórios como PGE $_2$, e expressão do receptor nuclear PPAR γ , efeitos estes dependentes da ativação de TLR2.
- ✓ Os resultados demonstraram que a ativação de PPAR γ é fundamental para biogênese de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios.
- ✓ Além disso, um importante papel da dectina-1, nos fenômenos de formação de corpúsculos lipídicos, produção de PGE $_2$, síntese de TNF- α após a infecção por BCG foi demonstrada.
- ✓ Este trabalho demonstrou pela primeira vez o envolvimento de receptores *scavenger* de macrófagos, como o CD36, nas vias que levam a expressão de PPAR γ durante infecções micobacterianas.
- ✓ Verificou-se também o papel de co-fatores para TLR2, como CD14, integrinas, e CD36 na ativação celular desencadeada pela infecção micobacteriana.
- ✓ Os resultados sugerem que a interação entre TLR2 e seus co-receptores em domínios lipídicos da membrana celular como em *lipid rafts*, podem regular vias de sinalização intracelular envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos, produção de mediadores inflamatórios como PGE $_2$ e expressão de PPAR γ .



Esquema 6.1) Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na ativação do receptor nuclear PPAR γ , na formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios em macrófagos, durante a infecção experimental por *Mycobacterium bovis*, BCG.

7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrahman M, Collin M, Thiernemann C. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand 15-deoxyDelta12,14 prostaglandin J2 reduces the organ injury in hemorrhagic shock. *Shock* 2004;22(6):555-61.
- Akaki T, Sato K, Shimizu T, Tomioka H. [Changes in antibacterial activity of murine peritoneal macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* after prolonged in vitro precultivation]. *Kekkaku* 2000;75(7):477-82.
- Akashi S, Nagakura S, Yamamoto S, Okuda M, Ohkuma Y, Nishimura Y. Structural characterization of human general transcription factor TFIIIF in solution. *Protein Sci* 2008;17(3):389-400.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124(4):783-801.
- Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem* 2003;278(40):38105-8.
- Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, et cols. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 2002;8(8):878-84.
- Anes E, Kuhnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol* 2003;5(9):793-802.
- Appel S, Mirakaj V, Bringmann A, Weck MM, Grunebach F, Brossart P. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood* 2005;106(12):3888-94.
- Arimura N, Horiba T, Imagawa M, Shimizu M, Sato R. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates expression of the perilipin gene in adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279(11):10070-6.
- Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 1975;142(1):1-16.
- Aronoff DM, Serezani CH, Carstens JK, Marshall T, Gangireddy SR, Peters-Golden M, et cols. Stimulatory Effects of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-gamma on Fc gamma Receptor-Mediated Phagocytosis by Alveolar Macrophages. *PPAR Res* 2007;2007:52546.
- Asada K, Sasaki S, Suda T, Chida K, Nakamura H. Antiinflammatory roles of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169(2):195-200.
- Asch AS, Barnwell J, Silverstein RL, Nachman RL. Isolation of the thrombospondin membrane receptor. *J Clin Invest* 1987;79(4):1054-61.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, et cols. Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes* 1997;46(8):1319-27.
- Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Ohura K. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 is a negative regulator of macrophage functions. *Int Immunopharmacol* 2001;1(12):2101-8.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol* 2002a;109(3):393-400.
- Bandeira-Melo C, Calheiros AS, Silva PM, Cordeiro RS, Teixeira MM, Martins MA. Suppressive effect of distinct bradykinin B2 receptor antagonist on allergen-evoked exudation and leukocyte infiltration in sensitized rats. *Br J Pharmacol* 1999;127(2):315-20.

- Bandeira-Melo C, Diaz BL, Cordeiro RS, Jose PJ, Serhan CN, Martins MA, e cols. Inhibition of allergen-induced eosinophil migration by lipoxin (LX)A4 and aspirin-triggered 15-epi-LXA4. *Adv Exp Med Biol* 2002b;507:211-6.
- Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001a;24(6):653-7.
- Bandeira-Melo C, Phoofolo M, Weller PF. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem* 2001b;276(25):22779-87.
- Bandeira-Melo C, Sugiyama K, Woods LJ, Phoofolo M, Center DM, Cruikshank WW, e cols. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol* 2002c;168(9):4756-63.
- Baranova IN, Kurlander R, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Chen Z, Remaley AT, e cols. Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling. *J Immunol* 2008;181(10):7147-56.
- Barnes PF, Chatterjee D, Abrams JS, Lu S, Wang E, Yamamura M, e cols. Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure. *J Immunol* 1992;149(2):541-7.
- Barnes PJ. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond)* 1998;94(6):557-72.
- Barrow WW, de Sousa JP, Davis TL, Wright EL, Bachelet M, Rastogi N. Immunomodulation of human peripheral blood mononuclear cell functions by defined lipid fractions of Mycobacterium avium. *Infect Immun* 1993;61(12):5286-93.
- Beatty WL, Rhoades ER, Hsu DK, Liu FT, Russell DG. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. *Cell Microbiol* 2002;4(3):167-76.
- Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* 2000;1(3):235-47.
- Beil WJ, Weller PF, Peppercorn MA, Galli SJ, Dvorak AM. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 1995;58(3):284-98.
- Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. *Nature* 2008;454(7203):470-7.
- Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol* 1991;146(1):108-13.
- Beyea MM, Heslop CL, Sawyez CG, Edwards JY, Markle JG, Hegele RA, e cols. Selective up-regulation of LXR-regulated genes ABCA1, ABCG1, and APOE in macrophages through increased endogenous synthesis of 24(S),25-epoxycholesterol. *J Biol Chem* 2007;282(8):5207-16.
- Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to Mycobacterium tuberculosis. *J Clin Immunol* 2007;27(4):347-62.
- Bird DA, Gillotte KL, Horkko S, Friedman P, Dennis EA, Witztum JL, e cols. Receptors for oxidized low-density lipoprotein on elicited mouse peritoneal macrophages can recognize both the modified lipid moieties and the modified protein moieties: implications with respect to macrophage recognition of apoptotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6347-52.
- Bonazzi A, Bolla M, Buccellati C, Hernandez A, Zarini S, Vigano T, e cols. Effect of endogenous and exogenous prostaglandin E(2) on interleukin-1 beta-induced

- cyclooxygenase-2 expression in human airway smooth-muscle cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(6):2272-7.
- Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boechat N, Huard RC, Chitale S, Doo H, e cols. Down-modulation of lung immune responses by interleukin-10 and transforming growth factor beta (TGF-beta) and analysis of TGF-beta receptors I and II in active tuberculosis. *Infect Immun* 2004;72(5):2628-34.
- Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Lidberg U, Johansson BR, e cols. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat Cell Biol* 2007;9(11):1286-93.
- Bostrom P, Rutberg M, Ericsson J, Holmdahl P, Andersson L, Frohman MA, e cols. Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(9):1945-51.
- Boulant S, Douglas MW, Moody L, Budkowska A, Targett-Adams P, McLauchlan J. Hepatitis C virus core protein induces lipid droplet redistribution in a microtubule- and dynein-dependent manner. *Traffic* 2008;9(8):1268-82.
- Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(Suppl 1):113-120.
- Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Penido C, Lorangeira AP, das Gracas M, Henriques MO, e cols. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. *J Leukoc Biol* 1994;56(2):151-8.
- Bozza PT, Magalhaes KG, Weller PF. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbaliip.2009.01.005 2009.
- Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. *Pharmacol Ther* 2007;113(1):30-49.
- Bozza PT, Payne JL, Goulet JL, Weller PF. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med* 1996a;183(4):1515-25.
- Bozza PT, Payne JL, Morham SG, Langenbach R, Smithies O, Weller PF. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996b;93(20):11091-6.
- Bozza PT, Yu W, Cassara J, Weller PF. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol* 1998;64(4):563-9.
- Bozza PT, Yu W, Penrose JF, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med* 1997b;186(6):909-20.
- Bozza PT, Yu W, Weller PF. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997a;92 Suppl 2:135-40.
- Brasaemle DL, Barber T, Kimmel AR, Londos C. Post-translational regulation of perilipin expression. Stabilization by stored intracellular neutral lipids. *J Biol Chem* 1997a;272(14):9378-87.
- Brasaemle DL, Barber T, Wolins NE, Serrero G, Blanchette-Mackie EJ, Londos C. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res* 1997b;38(11):2249-63.

- Brasaemle DL, Dolios G, Shapiro L, Wang R. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem* 2004;279(45):46835-42.
- Brown DA, London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:111-36.
- Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol* 2001;11(11):R446-9.
- Brown GD, Gordon S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001;413(6851):36-7.
- Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS, Gordon S. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 2003;197(9):1119-24.
- Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* 2002;196(3):407-12.
- Busso N, So A, Chobaz-Peclat V, Morard C, Martinez-Soria E, Talabot-Ayer D, et al. Leptin signaling deficiency impairs humoral and cellular immune responses and attenuates experimental arthritis. *J Immunol* 2002;168(2):875-82.
- Cao F, Castrillo A, Tontonoz P, Re F, Byrne GI. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2007;75(2):753-9.
- Cardona PJ, Llatjos R, Gordillo S, Diaz J, Ojanguren I, Ariza A, et al. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol* 2000;52(2):156-63.
- Carter GW, Young PR, Albert DH, Bouska J, Dyer R, Bell RL, et al. 5-lipoxygenase inhibitory activity of zileuton. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256(3):929-37.
- Castrillo A, Joseph SB, Vaidya SA, Haberland M, Fogelman AM, Cheng G, et al. Crosstalk between LXR and toll-like receptor signaling mediates bacterial and viral antagonism of cholesterol metabolism. *Mol Cell* 2003;12(4):805-16.
- Castro AG, Esaguy N, Macedo PM, Aguas AP, Silva MT. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect Immun* 1991;59(9):3009-14.
- Chang MK, Bergmark C, Laurila A, Horkko S, Han KH, Friedman P, et al. Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(11):6353-8.
- Chang TY, Chang CC, Lin S, Yu C, Li BL, Miyazaki A. Roles of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 and -2. *Curr Opin Lipidol* 2001;12(3):289-96.
- Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite Toxoplasma gondii. *J Cell Sci* 2002;115(Pt 15):3049-59.
- Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 2001c;7(1):48-52.
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, et al. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 2001b;7(1):161-71.
- Chawla A, Lee CH, Barak Y, He W, Rosenfeld J, Liao D, et al. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(3):1268-73.

- Chawla A, Repa JJ, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 2001a;294(5548):1866-70.
- Chen JS, Greenberg AS, Wang SM. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 2002;86(4):784-91.
- Chen S, Sorrentino R, Shimada K, Bulut Y, Doherty TM, Crother TR, et cols. Chlamydia pneumoniae-induced foam cell formation requires MyD88-dependent and -independent signaling and is reciprocally modulated by liver X receptor activation. *J Immunol* 2008;181(10):7186-93.
- Chilton FH, Lichtenstein LM. Lipid mediators of the allergic reaction. *Chem Immunol* 1990;49:173-205.
- Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000;49(10):497-505.
- Clark RB. The role of PPARs in inflammation and immunity. *J Leukoc Biol* 2002;71(3):388-400.
- Cocchiario JL, Kumar Y, Fischer ER, Hackstadt T, Valdivia RH. Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008.
- Collin M, Abdelrahman M, Thiemermann C. Endogenous ligands of PPAR-gamma reduce the liver injury in haemorrhagic shock. *Eur J Pharmacol* 2004;486(2):233-5.
- Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL. CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2007;75(3):468-77.
- Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, et cols. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003;77(8):4588-96.
- Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol* 2003;57:641-76.
- Covey SD, Brunet RH, Gandhi SG, McFarlane N, Boreham DR, Gerber GE, et cols. Cholesterol depletion inhibits fatty acid uptake without affecting CD36 or caveolin-1 distribution in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;355(1):67-71.
- Crosby MB, Svenson JL, Zhang J, Nicol CJ, Gonzalez FJ, Gilkeson GS. Peroxisome proliferation-activated receptor (PPAR)gamma is not necessary for synthetic PPARgamma agonist inhibition of inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;312(1):69-76.
- Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Britti D, Patel NS, et cols. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute pancreatitis induced by cerulein. *Intensive Care Med* 2004;30(5):951-6.
- Daniel J, Deb C, Dubey VS, Sirakova TD, Abomoelak B, Morbidoni HR, et cols. Induction of a novel class of diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in Mycobacterium tuberculosis as it goes into a dormancy-like state in culture. *J Bacteriol* 2004;186(15):5017-30.
- D'Avila H, Almeida PE, Roque NR, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by Mycobacterium bovis BCG pleurisy. *Infect Immun* 2007;75(3):1507-11.
- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 2008b;8(10):1308-1315.
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated

- formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 2006a;176(5):3087-97.
- D'Avila H, Roque NR, Cardoso RM, Castro-Faria-Neto HC, Melo RC, Bozza PT. Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol* 2008a;10(12):2589-604.
- Daynes RA, Jones DC. Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(10):748-59.
- de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, e cols. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol* 2003;171(4):2090-8.
- Deb C, Daniel J, Sirakova TD, Abomoelak B, Dubey VS, Kolattukudy PE. A novel lipase belonging to the hormone-sensitive lipase family induced under starvation to utilize stored triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 2006;281(7):3866-75.
- DeChatelet LR, Shirley PS, McPhail LC, Huntley CC, Muss HB, Bass DA. Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood* 1977;50(3):525-35.
- Deliverie P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, e cols. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999;274(45):32048-54.
- Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, e cols. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001;193(7):827-38.
- Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20(5):649-88.
- D'Ombrian MC, Voss TS, Maier AG, Pearce JA, Hansen DS, Cowman AF, e cols. *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein-1 specifically suppresses early production of host interferon-gamma. *Cell Host Microbe* 2007;2(2):130-8.
- Downing JF, Pasula R, Wright JR, Twigg HL, 3rd, Martin WJ, 2nd. Surfactant protein a promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(11):4848-52.
- Dreyer C, Keller H, Mahfoudi A, Laudet V, Krey G, Wahli W. Positive regulation of the peroxisomal beta-oxidation pathway by fatty acids through activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR). *Biol Cell* 1993;77(1):67-76.
- Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 2002;360(9343):1410-8.
- Dvorak AM, Monahan-Early R. *Diagnostic Ultrastructural Pathology I*: CRC Press; 1992.
- Dvorak AM, Morgan E, Schleimer RP, Ryeom SW, Lichtenstein LM, Weller PF. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies

- in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J Histochem Cytochem* 1992;40(6):759-69.
- Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. *Histol Histopathol* 2003;18(3):943-68.
- Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. Ultrastructural immunolocalization of basic fibroblast growth factor to lipid bodies and secretory granules in human mast cells. *Histochem J* 2001;33(7):397-402.
- Dvorak AM, Weller PF, Harvey VS, Morgan ES, Dvorak HF. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol* 1993;101(2):136-42.
- Dvorak AM. Biochemical contents of granules and lipid bodies - Two distinctive organelles found in basophils and mast cells. In *Basophil and mast cell degranulation and recovery*. New York: Plenum Press; 1991.
- Edvardsson U, Ljungberg A, Linden D, William-Olsson L, Peilot-Sjogren H, Ahnmark A, et al. PPARalpha activation increases triglyceride mass and adipose differentiation-related protein in hepatocytes. *J Lipid Res* 2006;47(2):329-40.
- Ellner JJ, Daniel TM. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin Exp Immunol* 1979;35(2):250-7.
- Erb KJ, Kirman J, Delahunt B, Moll H, Le Gros G. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon-gamma signalling. *Eur Cytokine Netw* 1999;10(2):147-54.
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001;108(6):785-91.
- Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM, Jr., Hajjar DP, et al. Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway dependent on protein kinase C and PPAR-gamma. *J Lipid Res* 2000;41(5):688-96.
- Fenton MJ, Vermeulen MW. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* 1996;64(3):683-90.
- Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg BJ, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol* 2008;10(10):2058-66.
- Fischer K, Chatterjee D, Torrelles J, Brennan PJ, Kaufmann SH, Schaible UE. Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2. *J Immunol* 2001;167(4):2187-92.
- Fitzgerald ML, Moore KJ, Freeman MW. Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home. *J Mol Med* 2002;80(5):271-81.
- Flesch IE, Kaufmann SH. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology* 1993;189(3-4):316-39.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
- Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(9):4312-7.
- Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 1995;83(5):803-12.

- Francis GA, Fayard E, Picard F, Auwerx J. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol* 2003;65:261-311.
- Franke WW, Hergt M, Grund C. Rearrangement of the vimentin cytoskeleton during adipose conversion: formation of an intermediate filament cage around lipid globules. *Cell* 1987;49(1):131-41.
- Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J, Deretic V. Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block. *Electrophoresis* 2000;21(16):3378-85.
- Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. *Lancet* 2003;362(9387):887-99.
- Fremont CM, Nicolle DM, Torres DS, Quesniaux VF. Control of Mycobacterium bovis BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. *Microbes Infect* 2003;5(12):1070-81.
- Fujimoto T, Kogo H, Ishiguro K, Tauchi K, Nomura R. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol* 2001;152(5):1079-85.
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, e cols. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta* 2004;1644(1):47-59.
- Fukumoto S, Fujimoto T. Deformation of lipid droplets in fixed samples. *Histochem Cell Biol* 2002;118(5):423-8.
- Galli C, Petroni A, Borghi A. Modification of brain vascular eicosanoids after pharmacological treatment and ischemia in the rat: drugs and brain vascular eicosanoids. *Cephalalgia* 1985;5 Suppl 2:79-81.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003;197(9):1107-17.
- Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 2000;288(5471):1647-50.
- Gatfield J, Pieters J. Molecular mechanisms of host-pathogen interaction: entry and survival of mycobacteria in macrophages. *Adv Immunol* 2003;81:45-96.
- Gay NJ, Keith FJ. Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 1991;351(6325):355-6.
- Gaynor CD, McCormack FX, Voelker DR, McGowan SE, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol* 1995;155(11):5343-51.
- Gercken J, Pryjma J, Ernst M, Flad HD. Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. *Infect Immun* 1994;62(8):3472-8.
- Gibson FC, 3rd, Hong C, Chou HH, Yumoto H, Chen J, Lien E, e cols. Innate immune recognition of invasive bacteria accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 2004;109(22):2801-6.
- Gilleron M, Quesniaux VF, Puzo G. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem* 2003;278(32):29880-9.
- Glass CK, Ogawa S. Combinatorial roles of nuclear receptors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6(1):44-55.
- Gomes RN, Bozza FA, Amancio RT, Japiassu AM, Vianna RC, Lorangeira AP, e cols. Exogenous platelet-activating factor acetylhydrolase reduces mortality in

- mice with systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Shock* 2006a;26(1):41-9.
- Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amancio RT, Laranjeira AP, e cols. Increased susceptibility to septic and endotoxic shock in monocyte chemoattractant protein 1/cc chemokine ligand 2-deficient mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production. *Shock* 2006b;26(5):457-63.
- Goren MB, D'Arcy Hart P, Young MR, Armstrong JA. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1976;73(7):2510-4.
- Griffin JF, Mackintosh CG, Buchan GS. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines. *Trends Microbiol* 1995;3(11):418-24.
- Guyton K, Zingarelli B, Ashton S, Teti G, Tempel G, Reilly C, e cols. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate macrophage activation by gram-negative and gram-positive bacterial stimuli. *Shock* 2003;20(1):56-62.
- Han CY, Park SY, Pak YK. Role of endocytosis in the transactivation of nuclear factor-kappaB by oxidized low-density lipoprotein. *Biochem J* 2000;350 Pt 3:829-37.
- Hart PD, Young MR. Ammonium chloride, an inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induces phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic mycobacterium and a nonpathogenic yeast. *J Exp Med* 1991;174(4):881-9.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988;52(2):269-79.
- He P, Mei C, Cheng B, Liu W, Wang Y, Wan J. *Chlamydia pneumoniae* induces macrophage-derived foam cell formation by up-regulating acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 1. *Microbes Infect* 2008.
- Heid HW, Moll R, Schwetlick I, Rackwitz HR, Keenan TW. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res* 1998;294(2):309-21.
- Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPARgamma in human and mouse physiology. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771(8):999-1013.
- Heine H, Muller-Loennies S, Brade L, Lindner B, Brade H. Endotoxic activity and chemical structure of lipopolysaccharides from *Chlamydia trachomatis* serotypes E and L2 and *Chlamydia psittaci* 6BC. *Eur J Biochem* 2003;270(3):440-50.
- Heldwein KA, Liang MD, Andresen TK, Thomas KE, Marty AM, Cuesta N, e cols. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against *Mycobacterium bovis* BCG. *J Leukoc Biol* 2003;74(2):277-86.
- Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997;65(8):3317-27.
- Hines ME, 2nd, Kreeger JM, Herron AJ. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Lab Anim Sci* 1995;45(4):334-51.
- Hirano K, Kuwasako T, Nakagawa-Toyama Y, Janabi M, Yamashita S, Matsuzawa Y. Pathophysiology of human genetic CD36 deficiency. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13(4):136-41.

- Hoebe K, Georgel P, Rutschmann S, Du X, Mudd S, Crozat K, e cols. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 2005;433(7025):523-7.
- Hoheisel G, Zheng L, Teschler H, Striz I, Costabel U. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest* 1995;108(6):1614-6.
- Holtta-Vuori M, Tanhuanpaa K, Mobius W, Somerharju P, Ikonen E. Modulation of cellular cholesterol transport and homeostasis by Rab11. *Mol Biol Cell* 2002;13(9):3107-22.
- Hornig T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 2002;420(6913):329-33.
- Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, e cols. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999;400(6742):378-82.
- Hunter RL, Jagannath C, Actor JK. Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs. *Tuberculosis (Edinb)* 2007;87(4):267-78.
- Inazawa Y, Nakatsu M, Yasugi E, Saeki K, Yuo A. Lipid droplet formation in human myeloid NB4 cells stimulated by all trans retinoic acid and granulocyte colony-stimulating factor: possible involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Cell Struct Funct* 2003;28(5):487-93.
- Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem* 2000;275(36):28028-32.
- Inoue M, Ohtake T, Motomura W, Takahashi N, Hosoki Y, Miyoshi S, e cols. Increased expression of PPARgamma in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;336(1):215-22.
- Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990;347(6294):645-50.
- Jackson KE, Klonis N, Ferguson DJ, Adisa A, Dogovski C, Tilley L. Food vacuole-associated lipid bodies and heterogeneous lipid environments in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Mol Microbiol* 2004;54(1):109-22.
- Jiang CT, A.T.; Seed, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998;391(6662):82-86.
- Johnson MM, Vaughn B, Triggiani M, Swan DD, Fonteh AN, Chilton FH. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(2):253-8.
- Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med* 2003;9(2):213-9.
- Joshi VD, Kalvakolanu DV, Cross AS. Simultaneous activation of apoptosis and inflammation in pathogenesis of septic shock: a hypothesis. *FEBS Lett* 2003;555(2):180-4.
- Kalayoglu MV, Byrne GI. Induction of macrophage foam cell formation by *Chlamydia pneumoniae*. *J Infect Dis* 1998;177(3):725-9.
- Kalayoglu MV, Miranpuri GS, Golenbock DT, Byrne GI. Characterization of low-density lipoprotein uptake by murine macrophages exposed to *Chlamydia pneumoniae*. *Microbes Infect* 1999;1(6):409-18.
- Kaplan JM, Cook JA, Hake PW, O'Connor M, Burroughs TJ, Zingarelli B. 15-Deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J(2) (15D-PGJ(2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock. *Shock* 2005;24(1):59-65.
- Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):20-30.

- Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002;61 Suppl 2:ii54-8.
- Keller H, Dreyer C, Medin J, Mahfoudi A, Ozato K, Wahli W. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(6):2160-4.
- Khan SA, Vanden Heuvel JP. Role of nuclear receptors in the regulation of gene expression by dietary fatty acids (review). *J Nutr Biochem* 2003;14(10):554-67.
- Kim YH, Choi SY, Suh JH, Kim TK, Seung KB, Wang YP, e cols. The effect of *Chlamydia pneumoniae* on the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular smooth muscle cells. *Yonsei Med J* 2008;49(2):230-6.
- Kirman J, Zakaria Z, McCoy K, Delahunt B, Le Gros G. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. *Infect Immun* 2000;68(5):2976-8.
- Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, e cols. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(9):4318-23.
- Kliwer SAL, J.M.; Wilson, T.M.; Patel, I.; Morris, D.C.; Lehmann, J.M. A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell*. 1995;83(5):813-819.
- Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria. *Mol Microbiol* 1997;24(2):263-70.
- Kuerschner L, Moessinger C, Thiele C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. *Traffic* 2008;9(3):338-52.
- Lafont F, van der Goot FG. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* 2005;7(5):613-20.
- Laposata MK, S.L.; Capriotti, A.M. Eicosanoids production can be decreased without alterations in cellular arachidonate content or enzyme activities required for arachidonate release and eicosanoid synthesis. *J. Biol. Chem.* 1988;263:3266-3273.
- Larigauderie G, Cuaz-Perolin C, Younes AB, Furman C, Lasselin C, Copin C, e cols. Adipophilin increases triglyceride storage in human macrophages by stimulation of biosynthesis and inhibition of beta-oxidation. *Febs J* 2006;273(15):3498-510.
- Larigauderie G, Furman C, Jaye M, Lasselin C, Copin C, Fruchart JC, e cols. Adipophilin enhances lipid accumulation and prevents lipid efflux from THP-1 macrophages: potential role in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(3):504-10.
- Lasco TM, Turner OC, Cassone L, Sugawara I, Yamada H, McMurray DN, e cols. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2004;72(2):1147-9.
- Lee H, Woodman SE, Engelman JA, Volonte D, Galbiati F, Kaufman HL, e cols. Palmitoylation of caveolin-1 at a single site (Cys-156) controls its coupling to the c-Src tyrosine kinase: targeting of dually acylated molecules (GPI-linked, transmembrane, or cytoplasmic) to caveolae effectively uncouples c-Src and caveolin-1 (TYR-14). *J Biol Chem* 2001;276(37):35150-8.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliwer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome

- proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995;270(22):12953-6.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 1996;86(6):973-83.
- Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(26):14614-9.
- Lien E, Sellati TJ, Yoshimura A, Flo TH, Rawadi G, Finberg RW, e cols. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *J Biol Chem* 1999;274(47):33419-25.
- Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, e cols. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol* 1996;156(7):2566-70.
- Lipsky RH, Eckert DM, Tang Y, Ockenhouse CF. The carboxyl-terminal cytoplasmic domain of CD36 is required for oxidized low-density lipoprotein modulation of NF-kappaB activity by tumor necrosis factor-alpha. *Recept Signal Transduct* 1997;7(1):1-11.
- Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS, e cols. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(6):3077-82.
- Liu P, Bartz R, Zehmer JK, Ying YS, Zhu M, Serrero G, e cols. Rab-regulated interaction of early endosomes with lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2007;1773(6):784-93.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M, Anderson RG. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem* 2004;279(5):3787-92.
- Londos C, Brasaemle DL, Schultz CJ, Segrest JP, Kimmel AR. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol* 1999;10(1):51-8.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie* 2005;87(1):45-9.
- MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(10):5243-8.
- MacMicking JD, Taylor GA, McKinney JD. Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47. *Science* 2003;302(5645):654-9.
- Martin S, Parton RG. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol* 2005;16(2):163-74.
- Matarese G, La Cava A, Sanna V, Lord GM, Lechler RI, Fontana S, e cols. Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin? *Trends Immunol* 2002;23(4):182-7.
- Maya-Monteiro CM, Almeida PE, D'Avila H, Martins AS, Rezende AP, Castro-Faria-Neto H, e cols. Leptin induces macrophage lipid body formation by a phosphatidylinositol 3-kinase- and mammalian target of rapamycin-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2008;283(4):2203-10.
- McDonough KA, Kress Y, Bloom BR. The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages: a study of phagolysosome fusion. *Infect Agents Dis* 1993;2(4):232-5.
- McGregor JL, Catimel B, Parmentier S, Clezardin P, Dechavanne M, Leung LL. Rapid purification and partial characterization of human platelet glycoprotein

- IIIb. Interaction with thrombospondin and its role in platelet aggregation. *J Biol Chem* 1989;264(1):501-6.
- Meade EA, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Peroxisome proliferators enhance cyclooxygenase-2 expression in epithelial cells. *J Biol Chem* 1999;274(12):8328-34.
- Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et cols. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol* 2001;166(6):4074-82.
- Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol* 1999a;163(12):6748-55.
- Means TK, Wang S, Lien E, Yoshimura A, Golenbock DT, Fenton MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1999b;163(7):3920-7.
- Medeiros LA, Khan T, El Khoury JB, Pham CL, Hatters DM, Howlett GJ, et cols. Fibrillar amyloid protein present in atheroma activates CD36 signal transduction. *J Biol Chem* 2004;279(11):10643-8.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000;343(5):338-44.
- Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 1997;9(1):4-9.
- Meerschaert J, Busse WW, Bertics PJ, Mosher DF. CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23(6):780-7.
- Mei CL, He P, Cheng B, Liu W, Wang YF, Wan JJ. *Chlamydia pneumoniae* induces macrophage-derived foam cell formation via PPAR alpha and PPAR gamma-dependent pathways. *Cell Biol Int* 2008.
- Melo RC, D'Avila H, Fabrino DL, Almeida PE, Bozza PT. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 2003;35(1):59-67.
- Melo RC, Fabrino DL, Dias FF, Parreira GG. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. *Inflamm Res* 2006;55(8):342-8.
- Melo RC, Perez SA, Spencer LA, Dvorak AM, Weller PF. Intragranular vesiculotubular compartments are involved in piecemeal degranulation by activated human eosinophils. *Traffic* 2005;6(10):866-79.
- Menezes-de-Lima-Junior O, Werneck-Barroso E, Cordeiro RS, Henriques MG. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol* 1997;62(6):778-85.
- Michelsen KS, Doherty TM, Shah PK, Ardit M. TLR signaling: an emerging bridge from innate immunity to atherogenesis. *J Immunol* 2004;173(10):5901-7.
- Miura S, Gan JW, Brzostowski J, Parisi MJ, Schultz CJ, Londos C, et cols. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem* 2002;277(35):32253-7.
- Miyanari Y, Atsuzawa K, Usuda N, Watashi K, Hishiki T, Zayas M, et cols. The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat Cell Biol* 2007;9(9):1089-97.
- Moore KJ, El Khoury J, Medeiros LA, Terada K, Geula C, Luster AD, et cols. A CD36-initiated signaling cascade mediates inflammatory effects of beta-amyloid. *J Biol Chem* 2002;277(49):47373-9.

- Moreno C, Mehlert A, Lamb J. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 1988;74(2):206-10.
- Moreno C, Taverne J, Mehlert A, Bate CA, Brealey RJ, Meager A, e cols. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol* 1989;76(2):240-5.
- Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, e cols. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995;270(18):10902-8.
- Morr M, Takeuchi O, Akira S, Simon MM, Muhlradt PF. Differential recognition of structural details of bacterial lipopeptides by toll-like receptors. *Eur J Immunol* 2002;32(12):3337-47.
- Motomura W, Inoue M, Ohtake T, Takahashi N, Nagamine M, Tanno S, e cols. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;340(4):1111-8.
- Moura AC, Leonardo PS, Henriques MG, Cordeiro RS. Opposite effects of *M. leprae* or *M. bovis* BCG delipidation on cellular accumulation into mouse pleural cavity. Distinct accomplishment of mycobacterial lipids in vivo. *Inflamm Res* 1999;48(6):308-13.
- Mullick AE, Soldau K, Kiosses WB, Bell TA, 3rd, Tobias PS, Curtiss LK. Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med* 2008;205(2):373-83.
- Munteanu A, Taddei M, Tamburini I, Bergamini E, Azzi A, Zingg JM. Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biol Chem* 2006;281(10):6489-97.
- Murch O, Collin M, Thiemermann C. Lysophosphatidic acid reduces the organ injury caused by endotoxemia-a role for G-protein-coupled receptors and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Shock* 2007;27(1):48-54.
- Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci* 1999;24(3):109-15.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 2001;40(5):325-438.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998;93(2):229-40.
- Nakamura NF, T. Adipose differentiation-related protein has two independent domains for targeting to lipid droplets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;306:333-338.
- Neyrolles O, Hernandez-Pando R, Pietri-Rouxel F, Fornes P, Tailleux L, Barrios Payan JA, e cols. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS ONE* 2006;1:e43.
- Nilsen NJ, Deininger S, Nonstad U, Skjeldal F, Husebye H, Rodionov D, e cols. Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol* 2008;84(1):280-91.
- Nishikawa Y, Quittnat F, Stedman TT, Voelker DR, Choi JY, Zahn M, e cols. Host cell lipids control cholesteryl ester synthesis and storage in intracellular *Toxoplasma*. *Cell Microbiol* 2005;7(6):849-67.
- Novikoff ABN, P.M.; Rosen, O.M.; Rubin, C.S. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J. Cell Biol.* 1980;87:180-196.

- Ockenhouse CF, Klotz FW, Tandon NN, Jamieson GA. Sequestrin, a CD36 recognition protein on Plasmodium falciparum malaria-infected erythrocytes identified by anti-idiotypic antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(8):3175-9.
- Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, et al. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 2007;447(7148):1116-20.
- Ohhira M, Motomura W, Fukuda M, Yoshizaki T, Takahashi N, Tanno S, et al. Lipopolysaccharide induces adipose differentiation-related protein expression and lipid accumulation in the liver through inhibition of fatty acid oxidation in mice. *J Gastroenterol* 2007;42(12):969-78.
- Ohsaki Y, Cheng J, Fujita A, Tokumoto T, Fujimoto T. Cytoplasmic lipid droplets are sites of convergence of proteasomal and autophagic degradation of apolipoprotein B. *Mol Biol Cell* 2006;17(6):2674-83.
- Ohsaki Y, Cheng J, Suzuki M, Shinohara Y, Fujita A, Fujimoto T. Biogenesis of cytoplasmic lipid droplets: From the lipid ester globule in the membrane to the visible structure. *Biochim Biophys Acta* 2008.
- Ozeki S, Cheng J, Tauchi-Sato K, Hatano N, Taniguchi H, Fujimoto T. Rab18 localizes to lipid droplets and induces their close apposition to the endoplasmic reticulum-derived membrane. *J Cell Sci* 2005;118(Pt 12):2601-11.
- Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM. Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. *J Endotoxin Res* 2000b;6(5):393-6.
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000a;97(25):13766-71.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, et al. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 2002;169(11):6498-506.
- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B4-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol* 2007;179(12):8500-8.
- Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(11):4376-80.
- Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ. Cyclooxygenase-2 expression by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human airway smooth muscle cells: role of peroxisome proliferator-activated receptors. *J Immunol* 2003;170(2):1043-51.
- Pauligk C, Nain M, Reiling N, Gemsa D, Kaufmann A. CD14 is required for influenza A virus-induced cytokine and chemokine production. *Immunobiology* 2004;209(1-2):3-10.
- Penido C, Vieira-de-Abreu A, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. *J Immunol* 2003;171(12):6788-94.

- Peyron P, Vaubourgeix J, Poquet Y, Levillain F, Botanch C, Bardou F, e cols. Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* 2008;4(11):e1000204.
- Pfeiffer A, Bottcher A, Orso E, Kapinsky M, Nagy P, Bodnar A, e cols. Lipopolysaccharide and ceramide docking to CD14 provokes ligand-specific receptor clustering in rafts. *Eur J Immunol* 2001;31(11):3153-64.
- Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect* 2001;3(3):249-55.
- Plotkowski MC, Brandao BA, de Assis MC, Feliciano LF, Raymond B, Freitas C, e cols. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microb Pathog* 2008;45(1):30-37.
- Pohl J, Ring A, Korkmaz U, Ehehalt R, Stremmel W. FAT/CD36-mediated long-chain fatty acid uptake in adipocytes requires plasma membrane rafts. *Mol Biol Cell* 2005;16(1):24-31.
- Pol A, Luetterforst R, Lindsay M, Heino S, Ikonen E, Parton RG. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol* 2001;152(5):1057-70.
- Pontsler AV, St Hilaire A, Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Cyclooxygenase-2 is induced in monocytes by peroxisome proliferator activated receptor gamma and oxidized alkyl phospholipids from oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 2002;277(15):13029-36.
- Portugal LR, Fernandes LR, Pietra Pedrosa VS, Santiago HC, Gazzinelli RT, Alvarez-Leite JI. Influence of low-density lipoprotein (LDL) receptor on lipid composition, inflammation and parasitism during *Toxoplasma gondii* infection. *Microbes Infect* 2008;10(3):276-84.
- Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med* 1987;165(1):239-44.
- Prost S, Le Dantec M, Auge S, Le Grand R, Derdouch S, Auregan G, e cols. Human and simian immunodeficiency viruses deregulate early hematopoiesis through a Nef/PPARgamma/STAT5 signaling pathway in macaques. *J Clin Invest* 2008;118(5):1765-75.
- Quesniaux V, Fremond C, Jacobs M, Parida S, Nicolle D, Yeremeev V, e cols. Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria. *Microbes Infect* 2004;6(10):946-59.
- Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab* 2006;4(3):211-21.
- Rangel Moreno J, Estrada Garcia I, De La Luz Garcia Hernandez M, Aguilar Leon D, Marquez R, Hernandez Pando R. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 2002;106(2):257-66.
- Ravetch JV, Bolland S. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 2001;19:275-90.
- Reddy RC, Keshamouni VG, Jaigirdar SH, Zeng X, Leff T, Thannickal VJ, e cols. Deactivation of murine alveolar macrophages by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(3):L613-9.
- Reggiardo Z, Shamsuddin AK. Granulomagenic activity of serologically active glycolipids from *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 1976;14(6):1369-74.
- Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, e cols. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen

- recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002;169(7):3480-4.
- Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor- α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988;141(7):2388-93.
- Rhoades ER, Cooper AM, Orme IM. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995;63(10):3871-7.
- Ricote M, Glass CK. New roles for PPARs in cholesterol homeostasis. *Trends Pharmacol Sci* 2001;22(9):441-3; discussion 444.
- Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771(8):926-35.
- Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR γ) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 1999;66(5):733-9.
- Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998;391(6662):79-82.
- Ridley DS, Ridley MJ. Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification. *Pathology* 1987;19(2):186-92.
- Riley RL, Mills CC, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LU, e cols. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. A two-year study of contagion in a tuberculosis ward. 1959. *Am J Epidemiol* 1995;142(1):3-14.
- Robenek H, Buers I, Hofnagel O, Robenek MJ, Troyer D, Severs NJ. Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2008.
- Robenek H, Robenek MJ, Buers I, Lorkowski S, Hofnagel O, Troyer D, e cols. Lipid droplets gain PAT family proteins by interaction with specialized plasma membrane domains. *J Biol Chem* 2005;280(28):26330-8.
- Robenek MJ, Schlattmann K, Zimmer KP, Plenz G, Troyer D, Robenek H. Cholesterol transporter caveolin-1 transits the lipid bilayer during intracellular cycling. *FASEB J* 2003;17(13):1940-2.
- Robenek MJ, Severs NJ, Schlattmann K, Plenz G, Zimmer KP, Troyer D, e cols. Lipids partition caveolin-1 from ER membranes into lipid droplets: updating the model of lipid droplet biogenesis. *Faseb J* 2004;18(7):866-8.
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(2):588-93.
- Rodriguez-Acosta A, Finol HJ, Pulido-Mendez M, Marquez A, Andrade G, Gonzalez N, e cols. Liver ultrastructural pathology in mice infected with *Plasmodium berghei*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 1998;30(2):299-307.
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, e cols. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4(4):611-7.
- Rosenbaum SE, Greenberg AS. The short- and long-term effects of tumor necrosis factor- α and BRL 49653 on peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 2 gene expression and other adipocyte genes. *Mol Endocrinol* 1998;12(8):1150-60.
- Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, e cols. Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I κ B kinase. *Nature* 2000;403(6765):103-8.
- Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol* 2006;24:147-74.

- Rothenberg ME. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21(3):291-5.
- Rothfuchs AG, Bafica A, Feng CG, Egen JG, Williams DL, Brown GD, e cols. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. *J Immunol* 2007;179(6):3463-71.
- Rouzer CA, Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem* 1988;263(22):10980-8.
- Ruan H, Pownall HJ, Lodish HF. Troglitazone antagonizes tumor necrosis factor- α -induced reprogramming of adipocyte gene expression by inhibiting the transcriptional regulatory functions of NF- κ B. *J Biol Chem* 2003;278(30):28181-92.
- Russell DG, Mwandumba HC, Rhoades EE. *Mycobacterium* and the coat of many lipids. *J Cell Biol* 2002;158(3):421-6.
- Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(8):569-77.
- Russell DG. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat Cell Biol* 2003;5(9):776-8.
- Sabroe I, Parker LC, Wilson AG, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy* 2002;32(7):984-9.
- Savill J, Hogg N, Haslett C. Macrophage vitronectin receptor, CD36, and thrombospondin cooperate in recognition of neutrophils undergoing programmed cell death. *Chest* 1991;99(3 Suppl):6S-7S.
- Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(3 Pt 1):679-91.
- Schmitz G, Orso E. CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* 2002;13(5):513-21.
- Schoonjans K, Martin G, Staels B, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptors, orphans with ligands and functions. *Curr Opin Lipidol* 1997;8(3):159-66.
- Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARs) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1996;1302(2):93-109.
- Schrader M. Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *J Histochem Cytochem* 2001;49(11):1421-29.
- Schroder NW, Morath S, Alexander C, Hamann L, Hartung T, Zahringer U, e cols. Lipoteichoic acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* activates immune cells via Toll-like receptor (TLR)-2, lipopolysaccharide-binding protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 are not involved. *J Biol Chem* 2003;278(18):15587-94.
- Shiffman D, Mikita T, Tai JT, Wade DP, Porter JG, Seilhamer JJ, e cols. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem* 2000;275(48):37324-32.
- Shin DM, Yang CS, Yuk JM, Lee JY, Kim KH, Shin SJ, e cols. *Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol* 2008;10(8):1608-21.
- Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ, Krahenbuhl JL. *Mycobacterial* lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun* 1988;56(5):1232-6.

- Silva AR, de Assis EF, Caiado LF, Marathe GK, Bozza MT, McIntyre TM, e cols. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol* 2002;168(8):4112-20.
- Silverstein RL, Febbraio M. CD36 and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 2000;11(5):483-91.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1(1):31-9.
- Sivarajah A, Chatterjee PK, Patel NS, Todorovic Z, Hattori Y, Brown PA, e cols. Agonists of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma reduce renal ischemia/reperfusion injury. *Am J Nephrol* 2003;23(4):267-76.
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82.
- Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 1998;47(4):507-14.
- Stemberger BH, Walsh RM, Patton S. Morphometric evaluation of lipid droplet associations with secretory vesicles, mitochondria and other components in the lactating cell. *Cell Tissue Res* 1984;236(2):471-5.
- Strapagiel D, Kasztalska K, Druszczynska M, Kowalewicz-Kulbat M, Vrba A, Matusiak A, e cols. Monocyte response receptors in BCG driven delayed type hypersensitivity to tuberculin. *Folia Histochem Cytobiol* 2008;46(3):353-9.
- Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, e cols. 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(9):4844-9.
- Stuart LM, Deng J, Silver JM, Takahashi K, Tseng AA, Hennessy EJ, e cols. Response to *Staphylococcus aureus* requires CD36-mediated phagocytosis triggered by the COOH-terminal cytoplasmic domain. *J Cell Biol* 2005;170(3):477-85.
- Sugawara I, Yamada H, Li C, Mizuno S, Takeuchi O, Akira S. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol* 2003;47(5):327-36.
- Sugden MC, Holness MJ. Role of nuclear receptors in the modulation of insulin secretion in lipid-induced insulin resistance. *Biochem Soc Trans* 2008;36(Pt 5):891-900.
- Svensson L, Wenneras C. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect* 2005;7(4):720-8.
- Szanto A, Nagy L. Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Mol Pharmacol* 2005;67(6):1935-43.
- Szatmari I, Pap A, Ruhl R, Ma JX, Illarionov PA, Besra GS, e cols. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med* 2006b;203(10):2351-62.
- Szatmari I, Rajnavolgyi E, Nagy L. PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* 2006a;1088:207-18.
- Szatmari I, Torocsik D, Agostini M, Nagy T, Gurnell M, Barta E, e cols. PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* 2007;110(9):3271-80.
- Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, e cols. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169(1):10-4.

- Talle MA, Rao PE, Westberg E, Allegar N, Makowski M, Mittler RS, e cols. Patterns of antigenic expression on human monocytes as defined by monoclonal antibodies. *Cell Immunol* 1983;78(1):83-99.
- Tanigawa K, Suzuki K, Nakamura K, Akama T, Kawashima A, Wu H, e cols. Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* 2008;289(1):72-9.
- Targett-Adams P, McElwee MJ, Ehrenborg E, Gustafsson MC, Palmer CN, McLauchlan J. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 2005;1728(1-2):95-104.
- Targett-Adams PC, D.; Gledhill, S.; Hope, G.; Coy, J.F.; Girod, A.; McLauchlan, J. Live cell analysis and targeting of the lipid droplet binding protein ADRP. *J. Biol. Chem.* 2003;278:15998-16007.
- Tauchi-Sato K, Ozeki S, Houjou T, Taguchi R, Fujimoto T. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem* 2002;277(46):44507-12.
- Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, e cols. The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* 2002;169(7):3876-82.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994;79(7):1147-56.
- Tontonoz PN, L.; Alvarez, J.G.; Thomazy, V.A.; Evans, R.M. PPARgamma promotes monocytes/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 1998;93(2):241-252.
- Triantafilou M, Gamper FG, Haston RM, Mouratis MA, Morath S, Hartung T, e cols. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 2006;281(41):31002-11.
- Triantafilou M, Gamper FG, Lepper PM, Mouratis MA, Schumann C, Harokopakis E, e cols. Lipopolysaccharides from atherosclerosis-associated bacteria antagonize TLR4, induce formation of TLR2/1/CD36 complexes in lipid rafts and trigger TLR2-induced inflammatory responses in human vascular endothelial cells. *Cell Microbiol* 2007;9(8):2030-9.
- Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7(3):179-90.
- Uittenbogaard A, Shaul PW, Yuhanna IS, Blair A, Smart EJ. High density lipoprotein prevents oxidized low density lipoprotein-induced inhibition of endothelial nitric-oxide synthase localization and activation in caveolae. *J Biol Chem* 2000;275(15):11278-83.
- Ullrich HJ, Beatty WL, Russell DG. Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway. *J Immunol* 2000;165(11):6073-80.
- Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem* 2004;279(22):23699-709.
- Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, e cols. The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 1999;401(6755):811-5.
- Valledor AF, Ricote M. Nuclear receptor signaling in macrophages. *Biochem Pharmacol* 2004;67(2):201-12.

- van Manen HJ, Kraan YM, Roos D, Otto C. Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(29):10159-64.
- van Meer G. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol* 2001;152(5):F29-34.
- VanHeyningen TK, Collins HL, Russell DG. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. *J Immunol* 1997;158(1):330-7.
- Vergne I, Fratti RA, Hill PJ, Chua J, Belisle J, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell* 2004;15(2):751-60.
- Vieira-de-Abreu A, Assis EF, Gomes GS, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, Bandeira-Melo C, e cols. Allergic Challenge-Elicited Lipid Bodies Compartmentalize In Vivo Leukotriene C₄ Synthesis within Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005;33(3):254-261.
- Vijayan VK, Reetha AM, Jawahar MS, Sankaran K, Prabhakar R. Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis. *Chest* 1992;101(6):1708-9.
- von Knethen A, Soller M, Brune B. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007a;55(1):19-25.
- von Knethen A, Soller M, Tzieply N, Weigert A, Johann AM, Jennewein C, e cols. PPARgamma1 attenuates cytosol to membrane translocation of PKCalpha to desensitize monocytes/macrophages. *J Cell Biol* 2007b;176(5):681-94.
- Wahli W, Braissant O, Desvergne B. Peroxisome proliferator activated receptors: transcriptional regulators of adipogenesis, lipid metabolism and more. *Chem Biol* 1995;2(5):261-6.
- Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, Huygen K, e cols. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 2004;304(5678):1800-4.
- Wallis RS, Ellner JJ. Cytokines and tuberculosis. *J Leukoc Biol* 1994;55(5):676-81.
- Walther TC, Farese RV, Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* 2008.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *Faseb J* 2007;21(1):167-78.
- Welch JS, Ricote M, Akiyama TE, Gonzalez FJ, Glass CK. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(11):6712-7.
- Weller PF, Ackerman SJ, Nicholson-Weller A, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol* 1989;135(5):947-59.
- Weller PF, Dvorak AM. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood* 1985;65(5):1269-74.
- Weller PF, Monahan-Earley RA, Dvorak HF, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *Am J Pathol* 1991;138(1):141-8.
- Weller PFR, S.W.; Dvorak, A.M. Lipid bodies: structurally distinct, non-membranous intracellular sites of eicosanoids formation. Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF 1991.
- Werneck-Barroso E, Moura AC, Monteiro MM, Menezes de Lima Junior O, de Meirelles MN, Henriques MG. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res* 2000;49(5):206-13.

- Wieland CW, Knapp S, Florquin S, de Vos AF, Takeda K, Akira S, e cols. Non-Mannose-capped Lipoarabinomannan Induces Lung Inflammation via Toll-like Receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(12):1367-74.
- Wolins NE, Brasaemle DL, Bickel PE. A proposed model of fat packaging by exchangeable lipid droplet proteins. *FEBS Lett* 2006a;580(23):5484-91.
- Wolins NE, Quaynor BK, Skinner JR, Tzekov A, Croce MA, Gropler MC, e cols. OXPAT/PAT-1 is a PPAR-induced lipid droplet protein that promotes fatty acid utilization. *Diabetes* 2006b;55(12):3418-28.
- Wolins NE, Rubin B, Brasaemle DL. TIP47 associates with lipid droplets. *J Biol Chem* 2001;276(7):5101-8.
- Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, e cols. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med* 1993;178(6):1935-46.
- Wu Z, Rosen ED, Brun R, Hauser S, Adelmant G, Troy AE, e cols. Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity. *Mol Cell* 1999;3(2):151-8.
- Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, e cols. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol* 1994;153(6):2568-78.
- Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 2006;108(9):3168-75.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, e cols. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003a;301(5633):640-3.
- Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, e cols. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003b;4(11):1144-50.
- Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, e cols. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol* 2002;169(12):6668-72.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, e cols. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 1998;152(3):759-69.
- Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood* 2000;95(3):1078-85.
- Zeng Y, Tao N, Chung KN, Heuser JE, Lublin DM. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem* 2003;278(46):45931-6.
- Zhao Z, de Beer MC, Cai L, Asmis R, de Beer FC, de Villiers WJ, e cols. Low-density lipoprotein from apolipoprotein E-deficient mice induces macrophage lipid accumulation in a CD36 and scavenger receptor class A-dependent manner. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(1):168-73.
- Zingarelli B, Sheehan M, Hake PW, O'Connor M, Denenberg A, Cook JA. Peroxisome proliferator activator receptor-gamma ligands, 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 and ciglitazone, reduce systemic inflammation in polymicrobial sepsis by modulation of signal transduction pathways. *J Immunol* 2003;171(12):6827-37.

8) ANEXOS

CROSSTALK BETWEEN TLR2 AND PPAR γ IN INFLAMMATION AND LIPID METABOLISM DURING INFECTION BY *Mycobacterium bovis*, BCG.

Patrícia E. Almeida¹, Adriana R. Silva², Clarissa M. Maya Monteiro¹, Dániel Töröcsik³, Heloisa D'Ávila¹, Balázs Dezső⁴, Kelly G. Magalhães, Hugo C Castro-Faria-Neto¹, Laszlo Nagy³ and Patrícia T. Bozza¹.

¹Laboratório de Imunofarmacologia and ²Laboratório de Inflamação, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; ³Dep. Biochemistry and Molecular Biology and ⁴Dep. Pathology, Medical and Health Science Center, Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Hungary.

Correspondence should be addressed to: Dr. Patrícia T. Bozza

Laboratorio de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; Av. Brasil 4365, Manguinhos; 21045-900 Rio de Janeiro, RJ – Brazil. E-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br

Abstract

Macrophages have important roles in both lipid metabolism and inflammation and are central to immunity to intracellular pathogens. Foamy-like -lipid laden- macrophages are present during the course of *Mycobacteria* infection and have recently been implied in mycobacterial pathogenesis. Here we analyzed molecular mechanisms of formation of macrophage lipid bodies (lipid droplets) during *Mycobacterium bovis* BCG infection, focusing on the role of lipid-activated nuclear receptor PPAR γ . Non-pathogenic *M. smegmatis* failed to induce PPAR γ expression or lipid body formation. We observed that BCG infection induced increased expression of PPAR γ that parallel the augmented lipid body formation and PGE₂ synthesis in mouse peritoneal macrophages. Function of PPAR γ in modulating BCG infection was demonstrated by the capacity of PPAR γ agonist BRL49653 to potentiate lipid body formation and PGE₂ production; while pretreatment with the specific PPAR γ antagonist GW9662 significantly inhibited BCG induced lipid body formation and PGE₂ production. BCG-induced MIP-1 α , IL12p70, TNF α or IL6 production was not inhibited by GW9662 treatment. However, BCG-induced PPAR γ expression and lipid body formation was drastically inhibited in TLR2 deficient mice, suggesting a key role for TLR2 in this process. Our findings show that PPAR γ is involved in lipid body biogenesis and unravel a cross-talk between the innate immune receptor TLR2 with lipid-activated nuclear receptor PPAR γ to coordinate lipid metabolism and inflammation in BCG-infected macrophages.

Introduction

The resurgence of tuberculosis worldwide has intensified research efforts directed to investigate the host defense and elucidate the cellular and molecular mechanisms involved in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *M. tuberculosis* is an intracellular pathogen that survives and replicates within cells of the host immune system, primarily macrophages. Differentiation of macrophages into foamy macrophages is a common pathological observation in tuberculous granulomas and pleuritis both in experimental settings as well as in clinical conditions (1-4). As for other pathological conditions, the foam aspect of macrophages was shown to occur as a reflexion of cytoplasmic lipid accumulation into lipid bodies (lipid droplets)(4-6). Recent studies have demonstrated that newly formed lipid bodies are structurally distinct cytoplasmic sites for lipid mediator synthesis with immunomodulatory functions during BCG infection (4, 6). Moreover, mycobacterial-induced lipid bodies often exhibited intimate contact with bacterial-containing phagosomes. Significantly, a role for mycobacterial-induced lipid body biogenesis and targeting has been suggested to act as escape mechanism during infection by down-modulation of macrophage response and/or acquisition of nutrients, leading to enhanced survival and replication in host cells (4, 6-11). However, the molecular mechanisms that regulate lipid body biogenesis during mycobacterial infection and their contribution to pathophysiology of tuberculosis are not completely understood.

PPAR γ is a member of the lipid activated nuclear receptor family and has been demonstrated to function as a key transcriptional regulator of cell differentiation, inflammation and lipid metabolism in cells such as macrophages and dendritic cells (DC) (for review see [(12)]). PPAR γ is highly expressed in macrophage-derived foam cells within atherosclerotic lesions where it plays an important role in lipid homeostasis and metabolism (13-16). PPAR transcription factor directly regulates the expression of several genes participating in fatty acid uptake, lipid storage and inflammatory response by binding to specific DNA response elements in target genes as heterodimers with the retinoid X receptors (RXR) (17-19). PPARs are expressed by leukocytes including macrophages, dendritic cells, T cells and B cells, where a role for these receptors in inflammation and immunoregulation has been proposed through their ability to regulate the expression of several genes that are involved in inflammation (20, 21).

Of major interest regarding the roles of PPAR γ during pathogen infection, it has been demonstrated that PPAR γ may repress target inflammatory genes, including pro-

inflammatory cytokines and iNOS, through ligand-dependent transrepression of NF- κ B target genes (22, 23). Although the role for PPAR γ as a master regulator of lipid metabolism and inflammation has been described in different conditions, the involvement and relevance of PPAR γ activation in the immune response and macrophage ability to respond to intracellular pathogen infection has not yet been elucidated.

Considering the role of PPAR γ in lipid metabolism, adipocyte and myeloid cell differentiation and inflammatory control, we hypothesize that PPAR γ is regulated and active in lipid body rich cells and PPAR γ may regulate processes associated with lipid body formation in leukocytes during intracellular pathogen infection. Here we demonstrate that mycobacterial infection induces PPAR γ increased expression and activation. Mycobacterial-induced PPAR γ expression and activation was demonstrated as centrally involved in regulating lipid metabolism in macrophages through the modulation of lipid body biogenesis and PGE₂ production during infection. Moreover, our results reveal novel cross-talk pathways between innate immune receptors TLR2 and lipid-activated nuclear receptor PPAR γ .

Experimental Procedures

Animals

C57BL/6 mice were obtained from the Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil) breeding unit. TLR2 knockout (TLR2^{-/-}) and TLR6 knockout (TLR6^{-/-}) mice in a homogeneous C57BL/6 background (24) were kindly donated by Dr. Shizuo Akira (Osaka University, Japan). Animals were bred and maintained under standard conditions at the breeding unit of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazil. Animals were caged with free access to food and water in a room at 22 to 24 °C and a 12 h light/dark cycle in the Department of Physiology and Pharmacodynamic animal facility until used. Animals weighing 20 to 25 g from both sexes were used. All protocols were approved by the Fundação Oswaldo Cruz animal welfare committee.

Bacterial strains

Mycobacterium bovis BCG (Moreau strain) vaccine was obtained by Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil (25). The freeze-dried vaccine was stored at 4 °C and resuspended in RPMI just before use. *Mycobacterium smegmatis* (mc²155) and Zymosan were stored at -70 °C and resuspended in RPMI just before use. GFP- *Mycobacterium bovis* BCG was kindly provided by Michael A O'Donnell, Department of Urology, University of Iowa, Iowa City, IA, USA.

Macrophage culture and in vitro infection

Peritoneal cells from naïve C57/BL6 or TLR2^{-/-} mice were harvested by lavage with sterile RPMI –1640 cell-culture medium. After 2h, the non-adherent cells were removed after lavage with sterile PBS (twice). Macrophages (1x10⁶ cells/mL) were adhered in cover slides within culture plates (24 wells) overnight with RPMI-1640 cell-culture medium containing 2% FCS. Human macrophages were derived from monocytes obtained from platelet- free buffy coats isolated from healthy donors by Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Freiburg, Germany) gradient centrifugation and immunomagnetic cell separation using anti-CD14-conjugated microbeads (VarioMACS; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturers' protocols. Separated monocytes were resuspended (1.5 x 10⁶/ml) and differentiated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 500 U/ml penicillin-streptomycin (Gibco, Paisley, UK) and 2mM L-glutamine (Gibco). Macrophages were infected with BCG (MOI, 1:1) or *M. smegmatis* (MOI, 1:1), stimulate with ligands of TLR2, zymozan (1:1) or

Pam₃cys (10 μM) for 24h at 37°C in CO₂ atmosphere. In inhibitory studies, macrophages were treated for thirty minutes before infection with BRL49653 (5 μM) or GW9662 (1 μM) at 37°C infected by BCG (MOI, 1:1) for 1h, followed by PBS wash (three times) to remove non-internalized BCG. Vehicle (DMSO 0.01%) was used as control. The cell-free supernatants were recovered and stored at -20 °C. Viability was assessed by trypan blue exclusion at the end of each experiment and was always greater than 90%.

Lipid body staining and enumeration

Macrophages were fixed in 3.7% formaldehyde in Ca²⁺/Mg²⁺- free HBSS (pH 7.4), rinsed in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4), stained in 1.5% osmium tetroxide (30 min), rinsed in water, immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5min), rinsed in water, rinsed in 0.1M cacodylate buffer, re-incubated in 1.5% osmium tetroxide (3min), rinsed in distilled water, dried, and mounted for further analysis. The morphology of fixed cells was observed, and lipid bodies were enumerated by light microscopy with a 100x objective lens in 50 consecutive macrophages in each slide.

Prostaglandin E₂ Measurement

PGE₂ levels were measured directly in the supernatant from culture cells obtained 2h, 6h, or 24 h after BCG injection. Cells were washed in HBSS⁻. PGE₂ was assayed in the cell-free supernatant by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical CO).

Cytokine analysis

Supernatants from *in vitro* BCG-infected macrophages after 24 h of infection were collected and stored at -20 °C until the day of analysis. Cytokines were analyzed simultaneously using luminex technology. A mouse multiplex cytokine kit was obtained and the assay performed according to the manufacturer's instructions (Upstate, Waltham, MA). Fifty μL of sample was analyzed on the Bio-Plex system (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Data analyses of all assays were performed with the Bio-Plex Manager software.

Western-blot analysis

Cell lysates were prepared in reducing and denaturing conditions and subjected to SDS-PAGE. Samples were submitted to electrophoresis in 10 % acrylamide gradient SDS-PAGE gels. After transfer onto nitrocellulose membranes, non-specific binding sites were blocked

with 5 % non-fat milk in Tris buffered saline-Tween (TBST; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20). Membranes were probed with the polyclonal ab anti-PPAR γ (H100, Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA) or anti- β -actin mAb (BD Transduction Laboratories) in TBST with 1 % non-fat dry milk. Proteins of interest were then identified by incubating the membrane with HRP-conjugated secondary antibodies in TBST, followed by detection of antigen-antibody complexes by Supersignal Chemiluminescence (Pierce). The detection was done either by exposing the membrane to autoradiography film. For the densitometry analysis, the images from developed films were analyzed in the software Image 2D (GE Healthcare). The spotting and the analysis parameters were performed by a colleague blind to sample identity.

Immunodetection of PPAR γ in human and murine macrophages

Human macrophages obtained from monocytes, non-infected or infected with GFP-BCG (6×10^6 cells/group), were pelleted and fixed in 4% paraformaldehyde (pH7.3) for 24 h at 4°C. Each cell block was then embedded in paraffin followed by sectioning and mounting on the same glass slide. After deparaffinization, rehydration and antigen unmasking, IF staining was made using monoclonal antibody (ab) to PPAR γ (clone E8, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 1:75 dilut). Briefly, PPAR γ was detected by incubating sections 1 h at room temperature with the primary antibody followed by horseradish-peroxidase (HRP) labeled anti-mouse secondary IgG-F(ab) treatment. The visualization was made with tyramide-conjugated red fluorescent amplification kit using tetramethyl-rhodamine (TSA-TMR system, Perkin Elmer Life Science, Boston, MA). The nuclear counterstain was made with DAPI (Vector Labs). To ensure the staining specificities, negative controls were also included by using isotype-matched control IgG (Dako, Glostrup, Denmark) in place of the primary ab. Positive controls for PPAR γ staining were made on normal human adult adipose tissue sections which exhibited nuclear staining in the majority of adipocytes. Fluorescence photography was carried out using an Olympus BX51 microscope equipped with a narrowband tricolor excitation filter and DP71 digital camera. Fluorescent photomicrographs were captured with single exposure which simultaneously visualized both the green (the presence of GFP-mycobacteria) and the red (PPAR γ protein) together with the blue (DAPI) fluorescent lights. For transferring and editing images for documentation, Viewfinder and Studio Lite software version 1.0.136 of 2001 Pixera (Pixera, UK Digital Imaging Systems, UK) and Adobe Photoshop version 8.0 were used.

For immunolocalization of PPAR γ in murine macrophages cells were stimulated with LAM (300 ng/mL). IF staining of formalin (3.7 %) fixed cytopsin smears was made using polyclonal antibody (pab) to PPAR γ (clone H100 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Briefly, PPAR γ was detected by incubating sections 1 h at room temperature with the primary antibody followed by anti-rabbit ALEXA 546-labeled secondary ab (Molecular Probes). Negative controls were also included by using control non immune rabbit serum (Jackson Laboratories, Maine, USA). Images were obtained by CLSM (LSM 510-META, Zeiss). The nuclear counterstain was made with DAPI (Sigma-Aldrich).

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SEM and were analyzed statistically by means of variance followed by Newman-Keuls-student test or Student t test with the level of significance set at $p < 0.05$.

Results

Mycobacterium bovis BCG induces PPAR γ expression, lipid body formation and PGE₂ generation in macrophages

Macrophages have important roles in both lipid metabolism and inflammation and are central to the defense against intracellular pathogens. Lipid laden (foamy) macrophages are present in *Mycobacteria* infection but their molecular mechanisms of formation are currently unknown. Considering the role of lipid activated nuclear receptors in lipid metabolism, macrophage differentiation and inflammation control, we investigated the role of PPAR γ in lipid body formation induced by BCG. PPAR γ functions in macrophages are controlled by regulated expression and ligand-dependent activation. Using an experimental model of mouse peritoneal macrophages infected by *M. bovis*, BCG, we investigated the effect of mycobacterium infection in PPAR γ expression by Western blot analysis. As shown in figure 1A, BCG infection induced a time-dependent increase in the expression of PPAR γ in macrophages. Increased BCG-induced PPAR γ was observed within 2 h and maximum within 24 h after the infection (Fig. 1A). The increased PPAR γ protein expression and nuclear localization upon BCG infection was confirmed in human monocytes infected by fluorescent labeled BCG (Fig. 1B).

Foam cells within atherosclerotic lesion contain high expression levels of PPAR γ (14). Foamy-like phenotype is also observed in mycobacterium infected macrophages *in vivo* (1-3). Next, we evaluated if *in vitro* macrophage infection by BCG directly caused lipid body biogenesis. As seen in figure 1 C, there was markedly increased numbers of lipid bodies in BCG stimulated macrophages when compared to control. BCG-induced lipid body biogenesis paralleled the induction of PPAR γ expression (Fig. 1C). Macrophage lipid bodies have been characterized as key compartmentalization locales of inflammatory mediator production (4, 26-28). We analyzed whether BCG-induced increase in lipid body numbers is associated with PGE₂ production by macrophages *in vitro*. We observed that *M bovis* BCG induced PPAR γ expression and lipid body biogenesis was accompanied by enhanced PGE₂ generation after the infection (Fig. 1D).

PPAR γ specific ligands modulate BCG-induced lipid body biogenesis and PGE₂ generation.

PPAR γ is a lipid activated transcription factor that has been intimately linked to lipid metabolism and storage in fat cells and foam cells. Since macrophage infection by BCG induced PPAR γ increased expression and nuclear localization suggesting its activation, we investigated if PPAR γ could be involved in lipid body biogenesis within mycobacterial infected macrophages. To investigate the functional role of PPAR γ activation during *M. bovis* BCG infection, we used a specific agonist (BRL 49653) or antagonist (GW9662) for the receptor. As shown in figure 2, BRL49653 (5 μ M) potentiated lipid body formation (Fig. 2A) and PGE₂ production (Fig. 2B) induced by suboptimal concentrations of BCG (0.05:1 bacterium/macrophage) at 24h *in vitro*. Conversely, the pretreatment with the selective PPAR γ antagonist GW9662 significantly inhibited lipid body biogenesis (Fig. 2 C and E) and PGE₂ production (Fig. 2 D) induced by BCG (1:1 bacterium/macrophage) infection at 24h *in vitro*, thus indicating a required role for PPAR γ signaling activation in lipid body biogenesis and further prostanoid production during BCG infection.

Cytokine production during BCG infection is independent of PPAR γ activation.

The effect of the pretreatment with PPAR γ antagonist GW9662 on BCG-induced MIP-1 α , IL12p70, IL-6 and TNF- α production by macrophages was investigated during BCG infection. As shown in figure 3, BCG infection significantly increased the synthesis of MIP-1 α , IL12p70, IL-6 and TNF- α within 24h. Pretreatment with GW9662 failed to modify BCG-induced cytokine production by macrophages (Fig. 3).

TLR2-dependent mechanisms are involved in PPAR γ expression in BCG infected macrophages

It has been demonstrated that lipid body formation in leukocytes is a highly regulated event that depends on the interaction of cellular receptors with their ligands, are involved in inflammatory mediator production and are markers of leukocyte activation (29). The role of TLR-mediated pathogen recognition and activation in the mechanism of lipid body formation has been documented (4, 5, 27, 30). Next, we investigated the role of TLR2 in regulating PPAR γ expression during BCG infection *in vitro*. As shown in figure 4A, BCG infection failed to induce PPAR γ expression in macrophages from TLR2^{-/-} mice while it exhibited PPAR γ expression in TLR2^{+/+} mice after 24 h of *in vitro* infection. The role of TLR2 on the increased PPAR γ protein expression and nuclear localization was confirmed in mouse macrophages stimulated by LAM (Fig. 4B). As shown in figure 4B, LAM stimulation

induced increased expression and nuclear localization of PPAR γ was drastically reduced in TLR2^{-/-} mice, demonstrating a key role for TLR2 signaling in PPAR γ expression and activation.

Confirming results obtained *in vivo* with BCG infection (4, 5), lipid body formation, PGE₂ and TNF- α generation in TLR2^{-/-} mice macrophages was drastically inhibited when compared to macrophages from TLR2^{+/+} mice (Fig. 4C-E). In contrast, there was no observed differences in lipid body formation, PGE₂ and TNF- α generation in TLR6^{-/-} mice macrophages compared to the TLR6^{+/+}. These results suggest that TLR6 is not necessary for this phenomenon (Tabela 1).

Stimulation of macrophages *in vitro* with *M. smegmatis* (1:1), zymosan (1:1) or Pam₃Cys, all potent TLR2 ligands and at doses that significantly induced TNF- α production (Fig. 5D), were unable to induce PPAR γ expression, lipid body biogenesis or PGE₂ production in macrophages, under conditions where BCG infection was highly effective (Fig. 5A-C), thus suggesting that although TLR2 activation is essential for mycobacterial-induced lipid body biogenesis and PPAR γ expression it is not sufficient to trigger pathways of lipid body formation and other co-factors may be involved in this process.

Discussion

Macrophages are critical to the defense against intracellular pathogens and have important roles in both inflammation processes and lipid metabolism. Foamy-like -lipid laden- macrophages are formed during the course of *Mycobacterial* infection where the foam aspect of macrophages is a reflex of intracellular lipid accumulation into lipid bodies. Recent studies have demonstrated that lipid bodies are involved in PGE₂ synthesis during BCG infection and suggest that lipid bodies and lipid body-derived PGE₂ might have implications to the pathogenesis of mycobacterial infection (4-6, 31). However, the molecular mechanism by which mycobacterial infection is associated with lipid synthesis and lipid accumulation in lipid bodies is unknown. Our study offers the first evidence that *M. bovis* BCG is able to increase macrophage lipid accumulation and PGE₂ formation through the increased expression and activity of PPAR γ . Moreover, we uncovered novel connections between TLR signaling activation and PPAR γ expression and activation adding support to the growing body of evidence that places PPAR γ signals as key components in inflammation and innate immunity.

We demonstrated that BCG infection in macrophages induced increased expression of PPAR γ in mouse macrophages in a time-dependent manner, apparent within 2h and at maximal levels within 24h after the infection. PPAR γ expression induced by BCG was confirmed also in human monocytes, where by immunofluorescent analysis of BCG-infected cell increased nuclear PPAR γ immunoreactivity was observed. BCG-induced increased macrophage PPAR γ expression was accompanied by enhanced lipid body biogenesis and increased PGE₂ production by the infected cells, which prompted us to investigate if PPAR γ activation was involved in the mechanisms of lipid body biogenesis.

To this end, we analyzed the effect of PPAR γ activation during BCG infection. We observed that the PPAR γ agonists BRL49653 potentiated lipid body formation and PGE₂ production induced by sub-optimal dose of BCG. Accordingly, PPAR activation regulates the accumulation of lipids and the expression of several genes involved with lipid metabolism and accumulation in macrophages (13, 14, 16). That includes also the regulation of ADRP expression; a protein associated with the surface of lipid bodies in numerous cells including macrophages and believed to play a major role in the maintenance of lipid stores (32-34). Indeed, de Assis et al., (35), have demonstrated that PPAR γ agonists, BRL49653 or hexadecil

azeloyl phosphatidyl colin (azPC), potentiates lipid body biogenesis in peritoneal macrophages after oxidized phospholipid stimulation. In order to confirm the involvement of PPAR γ in BCG-induced lipid body formation we investigated the effect of a selective PPAR γ antagonist GW9662. We demonstrated that pretreatment with GW9662 significantly inhibited BCG induced lipid body formation and PGE₂ production, but not TNF, IL-6, IL-12 and MIP1, demonstrating the ability of PPAR γ to differential modulate the response of macrophages to infection.

The mechanisms involved in BCG induced PPAR γ expression were analyzed. Engagement of Toll-like receptors (TLR) proteins activates the expression of pro-inflammatory mediators by macrophages and has been shown to regulate host susceptibility to pathogens. Recent studies have demonstrated that bacterial components may regulate PPAR γ expression and function. For instance, LPS, a component of Gram-negative bacterial cell wall that acts through TLR4-dependent signaling as well as experimental sepsis downregulate PPAR-gamma expression in macrophages and hepatic cells (36, 37). In contrast, TLR4 activation was shown to positive regulate the expression of PPAR γ in epithelial cells (38). Different members of the TLR family including TLR2, TLR4, TLR9, as well as TLR6 and TLR1 that dimerizes with TLR2, have been implicated in the host response to mycobacterial infection to mediate intracellular signaling in mycobacterial antigen recognition, cytokine production and lipid metabolism (39-42). In particular, TLR2 appears to be critical for sensing mycobacteria and is classically recognized as a principal inducer of signals in mycobacterial infection (39). Accordingly, lipid body biogenesis induced by *M. bovis*, BCG was shown to be highly dependent on TLR2-dependent signaling (4-6). Thus, we asked whether TLR2 activation was involved in the regulation of PPAR γ expression and/or activation during experimental infection by *M. bovis*, BCG. BCG-induced PPAR γ expression, lipid body formation, PGE₂ and TNF- α generation were drastically inhibited in TLR2 deficient mice, demonstrating a requisite role for TLR2 in BCG mediated macrophage up-regulation of PPAR γ protein content. Interestingly activation of macrophages *in vitro* with the non-pathogenic *M. smegmatis*- failed to induce PPAR γ expression, lipid body formation, or PGE₂ production, while inducing TLR2-dependent TNF- α production, suggesting that TLR2 activation although essential for mycobacterial-induced lipid body formation is not sufficient to trigger pathways of lipid body formation and other co-factors may be involved. Accordingly, TLR2-dependent signaling may be modulated by the concomitant interaction with co-receptors and according to the co-receptor used distinct downstream signaling

pathways may be recruited leading to differential cellular compartmentalization and responses (43-46).

The increased PPAR γ expression and activation may have profound implications in the pathogenesis of mycobacterial infection and will require further investigations. Recent studies have shown that PPAR γ activation could inhibit NF- κ B and MAP kinase pathways, two of the most important signaling pathways regulating pro-inflammatory responses triggered by TLR activation (23, 47). Of note, recent work has implicated PPAR γ in controlling arginase I expression in macrophages conferring the ability to PPAR γ in the polarization of monocyte differentiation toward an alternative anti-inflammatory phenotype with implications to the ability of macrophages to kill leishmania parasites (48, 49).

In conclusion, our findings demonstrated that mycobacterial infection induces PPAR γ expression in a highly regulated manner that is dependent of TLR2 signaling. Moreover, PPAR γ act as key modulator of lipid metabolism and inflammation in BCG-infected macrophages in a TLR2 dependent signaling, demonstrating an essential role for mycobacterial-induced lipid body formation and PGE₂ production with potential implication to the pathogenesis of mycobacterial infection.

References

1. Ridley, D. S., and M. J. Ridley. 1987. Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification. *Pathology* 19:186-92.
2. Cardona, P. J., R. Llatjos, S. Gordillo, J. Diaz, I. Ojanguren, A. Ariza, and V. Ausina. 2000. Evolution of granulomas in lungs of mice infected aerogenically with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol* 52:156-63.
3. Hernandez-Pando, R., L. Pavon, K. Arriaga, H. Orozco, V. Madrid-Marina, and G. Rook. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 65:3317-27.
4. D'Avila, H., R. C. Melo, G. G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2006. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* 176:3087-97.
5. D'Avila, H., P. E. Almeida, N. R. Roque, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2007. Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infect Immun* 75:1507-11.
6. D'Avila, H., C. M. Maya-Monteiro, and P. T. Bozza. 2008. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *Int Immunopharmacol* 8:1308-15.
7. Melo, R. C., H. D'Avila, D. L. Fabrino, P. E. Almeida, and P. T. Bozza. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell* 35:59-67.
8. Chen, J. S., Y. L. Chen, A. S. Greenberg, Y. J. Chen, and S. M. Wang. 2005. Magnolol stimulates lipolysis in lipid-laden RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem* 94:1028-37.
9. Kumar, Y., J. Cocchiario, and R. H. Valdivia. 2006. The obligate intracellular pathogen *Chlamydia trachomatis* targets host lipid droplets. *Curr Biol* 16:1646-51.
10. Cardona, P. J. 2007. New insights on the nature of latent tuberculosis infection and its treatment. *Inflamm Allergy Drug Targets* 6:27-39.
11. Neyrolles, O., R. Hernandez-Pando, F. Pietri-Rouxel, P. Fornes, L. Tailleux, J. A. Barrios Payan, E. Pivert, Y. Bordat, D. Aguilar, M. C. Prevost, C. Petit, and B. Gicquel. 2006. Is adipose tissue a place for *Mycobacterium tuberculosis* persistence? *PLoS ONE* 1:e43.
12. Szeles, L., D. Torocsik, and L. Nagy. 2007. PPARgamma in immunity and inflammation: cell types and diseases. *Biochim Biophys Acta* 1771:1014-30.
13. Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen, and R. M. Evans. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93:229-40.
14. Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy, and R. M. Evans. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-52.
15. Ricote, M., A. C. Li, T. M. Willson, C. J. Kelly, and C. K. Glass. 1998. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 391:79-82.
16. Chawla, A., Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, and R. M. Evans. 2001. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med* 7:48-52.

17. Chawla, A., J. J. Repa, R. M. Evans, and D. J. Mangelsdorf. 2001. Nuclear receptors and lipid physiology: opening the X-files. *Science* 294:1866-70.
18. Keller, H., C. Dreyer, J. Medin, A. Mahfoudi, K. Ozato, and W. Wahli. 1993. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2160-4.
19. Gearing, K. L., M. Gottlicher, M. Teboul, E. Widmark, and J. A. Gustafsson. 1993. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1440-4.
20. Szanto, A., and L. Nagy. 2005. Retinoids potentiate peroxisome proliferator-activated receptor gamma action in differentiation, gene expression, and lipid metabolic processes in developing myeloid cells. *Mol Pharmacol* 67:1935-43.
21. Szatmari, I., D. Torocsik, M. Agostini, T. Nagy, M. Gurnell, E. Barta, K. Chatterjee, and L. Nagy. 2007. PPARgamma regulates the function of human dendritic cells primarily by altering lipid metabolism. *Blood* 110:3271-80.
22. Pascual, G., A. L. Fong, S. Ogawa, A. Gamliel, A. C. Li, V. Perissi, D. W. Rose, T. M. Willson, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2005. A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma. *Nature* 437:759-63.
23. Ogawa, S., J. Lozach, C. Benner, G. Pascual, R. K. Tangirala, S. Westin, A. Hoffmann, S. Subramaniam, M. David, M. G. Rosenfeld, and C. K. Glass. 2005. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell* 122:707-21.
24. Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11:443-51.
25. Benévolo-de-Andrade, T. C., R. Monteiro-Maia, C. Cosgrove, and L. R. R. Castello-Branco. 2005. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:459-65.
26. Pacheco, P., F. A. Bozza, R. N. Gomes, M. Bozza, P. F. Weller, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol* 169:6498-506.
27. Pacheco, P., A. Vieira-de-Abreu, R. N. Gomes, G. Barbosa-Lima, L. B. Wermelinger, C. M. Maya-Monteiro, A. R. Silva, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, C. Bandeira-Melo, and P. T. Bozza. 2007. Monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 controls microtubule-driven biogenesis and leukotriene B₄-synthesizing function of macrophage lipid bodies elicited by innate immune response. *J Immunol* 179:8500-8.
28. Yu, W., P. T. Bozza, D. M. Tzizik, J. P. Gray, J. Cassara, A. M. Dvorak, and P. F. Weller. 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A₂ at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol* 152:759-69.
29. Bozza, P. T., and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100:113-20.
30. Cao, F., A. Castrillo, P. Tontonoz, F. Re, and G. I. Byrne. 2007. Chlamydia pneumoniae--induced macrophage foam cell formation is mediated by Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 75:753-9.
31. D'Avila, H., N. R. Roque, R. M. Cardoso, H. C. Castro-Faria-Neto, R. C. Melo, and P. T. Bozza. 2008. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG

- infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and Prostaglandin E production by macrophages. *Cell Microbiol*.
32. Targett-Adams, P., M. J. McElwee, E. Ehrenborg, M. C. Gustafsson, C. N. Palmer, and J. McLauchlan. 2005. A PPAR response element regulates transcription of the gene for human adipose differentiation-related protein. *Biochim Biophys Acta* 1728:95-104.
 33. Chawla, A., C. H. Lee, Y. Barak, W. He, J. Rosenfeld, D. Liao, J. Han, H. Kang, and R. M. Evans. 2003. PPARdelta is a very low-density lipoprotein sensor in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1268-73.
 34. Vosper, H., L. Patel, T. L. Graham, G. A. Khoudoli, A. Hill, C. H. Macphee, I. Pinto, S. A. Smith, K. E. Suckling, C. R. Wolf, and C. N. Palmer. 2001. The peroxisome proliferator-activated receptor delta promotes lipid accumulation in human macrophages. *J Biol Chem* 276:44258-65.
 35. de Assis, E. F., A. R. Silva, L. F. Caiado, G. K. Marathe, G. A. Zimmerman, S. M. Prescott, T. M. McIntyre, P. T. Bozza, and H. C. de Castro-Faria-Neto. 2003. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol* 171:2090-8.
 36. Zhou, M., R. Wu, W. Dong, A. Jacob, and P. Wang. 2008. Endotoxin downregulates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma via the increase in TNF-alpha release. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294:R84-92.
 37. Siddiqui, A. M., X. Cui, R. Wu, W. Dong, M. Zhou, M. Hu, H. H. Simms, and P. Wang. 2006. The anti-inflammatory effect of curcumin in an experimental model of sepsis is mediated by up-regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Crit Care Med* 34:1874-82.
 38. Dubuquoy, L., E. A. Jansson, S. Deeb, S. Rakotobe, M. Karoui, J. F. Colombel, J. Auwerx, S. Pettersson, and P. Desreumaux. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 124:1265-76.
 39. Jo, E. K., C. S. Yang, C. H. Choi, and C. V. Harding. 2007. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol* 9:1087-98.
 40. Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R. L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 169:10-4.
 41. Means, T. K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D. T. Golenbock, and M. J. Fenton. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 163:3920-7.
 42. Means, T. K., B. W. Jones, A. B. Schromm, B. A. Shurtleff, J. A. Smith, J. Keane, D. T. Golenbock, S. N. Vogel, and M. J. Fenton. 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J Immunol* 166:4074-82.
 43. Hoebe, K., P. Georgel, S. Rutschmann, X. Du, S. Mudd, K. Crozat, S. Sovath, L. Shamel, T. Hartung, U. Zahringer, and B. Beutler. 2005. CD36 is a sensor of diacylglycerides. *Nature* 433:523-7.
 44. Ozinsky, A., D. M. Underhill, J. D. Fontenot, A. M. Hajjar, K. D. Smith, C. B. Wilson, L. Schroeder, and A. Aderem. 2000. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13766-71.

45. Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, B. J. Kullberg, M. G. Netea, and G. J. Adema. 2008. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol* 10:2058-66.
46. Triantafilou, M., F. G. Gamper, R. M. Haston, M. A. Mouratis, S. Morath, T. Hartung, and K. Triantafilou. 2006. Membrane sorting of toll-like receptor (TLR)-2/6 and TLR2/1 heterodimers at the cell surface determines heterotypic associations with CD36 and intracellular targeting. *J Biol Chem* 281:31002-11.
47. Desreumaux, P., L. Dubuquoy, S. Nutten, M. Peuchmaur, W. Englaro, K. Schoonjans, B. Derijard, B. Desvergne, W. Wahli, P. Chambon, M. D. Leibowitz, J. F. Colombel, and J. Auwerx. 2001. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 193:827-38.
48. Gallardo-Soler, A., C. Gomez-Nieto, M. L. Campo, C. Marathe, P. Tontonoz, A. Castrillo, and I. Corraliza. 2008. Arginase I induction by modified lipoproteins in macrophages: a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma/delta-mediated effect that links lipid metabolism and immunity. *Mol Endocrinol* 22:1394-402.
49. Odegaard, J. I., R. R. Ricardo-Gonzalez, M. H. Goforth, C. R. Morel, V. Subramanian, L. Mukundan, A. R. Eagle, D. Vats, F. Brombacher, A. W. Ferrante, and A. Chawla. 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature* 447:1116-20.

Legends

Figure 1. Kinetics of *Mycobacterium bovis* BCG induced PPAR γ expression, lipid body formation and PGE $_2$ production. Mouse peritoneal macrophages obtained from mice C57BL/6 (A, C, D) or monocytes obtained from human volunteers (B) were infected *in vitro* by BCG (MOI 1:1). (A) total macrophage cell lysates (4×10^6 cells/lane) were separated by SDS-PAGE (10%) and submitted to western blotting for anti-PPAR γ or β -actin. The *image* is representative of at least two different blots. The *graph* represents the densitometric analysis (arbitrary units (A.U.)) of the Western blotting bands. (B) PPAR γ immunofluorescent staining of human macrophages non-infected (upper panel) or infected with GFP-mycobacteria. As opposed to non-infected cells predominantly showing blue nuclear counterstain, there is an increase in the number of PPAR γ -specific red nuclear fluorescence mainly associated with the presence of the engulfed mycobacteria (green fluorescence). *IF, original magnification: 40x.* (C) lipid body enumeration in peritoneal macrophages non-infected or infected by BCG (MOI 1:1) was performed by osmium staining. (D) PGE $_2$ production was measured in the supernatants by an enzyme immunoassay. Each bar represents the mean \pm SEM from 3 independent pools of 10 animals each in *in vitro* experiments. Statistically significant ($p < 0.05$) difference between control and infected groups are indicated by asterisks.

Figure 2. Effect of PPAR γ agonist BRL49653 and PPAR γ antagonist GW9662 on BCG-induced induced lipid body biogenesis and PGE $_2$ production. Peritoneal macrophage were treated with vehicle, BRL 49653 (5 μ M) or GW 9662 (1 μ M) 30 min before infection by BCG. A) lipid body counting in peritoneal macrophages treated with vehicle or BRL or infected by BCG (MOI 0.05:1 bacterium/macrophage) in the presence of BRL B) parallel enhancement of PGE $_2$ production. C) lipid body counting in peritoneal macrophage alone, treated with GW or infected by BCG (MOI 1:1) in the presence of GW, D) parallel inhibition of PGE $_2$ production, Each bar represents the mean \pm SEM from 3 independent pools of 10 animals each in *in vitro* experiments. Differences between control and infected with treatments groups are indicated by asterisks ($p < 0.05$). + represents differences between BCG and BCG in the presence of BRL or GW. E) Representative images of macrophages treated

with vehicle or GW followed by infection by BCG after osmium staining observed by light microscopy, (100X).

Figure 3. Cytokines production during BCG infection is independent on PPAR γ activation. Analysis of cytokines synthesis macrophages alone, treated with GW9662 (1 μ M), infected by BCG (MOI 1:1) in the presence of GW9662. Cytokines production was analyzed using luminex technology, at 24h of infection. Each bar represents the mean \pm SEM from 3 independent pools of 10 animals each in *in vitro* experiments. Differences between control and infected with treatments GW9662 groups are indicated by asterisks ($p < 0.05$).

Figure 4. TLR2-dependent is PPAR γ expression, as well as, lipid body formation, PGE $_2$ and TNF- α production in response to infection by *M. bovis*, BCG in peritoneal macrophages *in vitro*. Analysis of PPAR γ expression, lipid body formation, PGE $_2$ synthesis and TNF α production in TLR2 $^{+/+}$ and TLR2 $^{-/-}$ mice (A) PPAR γ expression of macrophages alone or infected *in vitro* by BCG (MOI 1:1). In B) we observed TLR2 dependent PPAR γ expression and nuclear localization 24 h after LAM stimulation as accessed by confocal laser microscopy analysis. In C) peritoneal macrophages from TLR2 $^{+/+}$ and TLR2 $^{-/-}$ mice were *in vitro* infected or not by BCG (MOI 1:1), and lipid body was analyzed, at 24h of infection D) as well as, PGE $_2$ production and E) TNF α synthesis. Each bar represents the mean \pm SEM from n=3 pools of 10 animals in 3 independent experiments. Differences between control and infected groups are indicated by asterisks ($p < 0.05$); + represents differences between wild-type and deficient mice.

Figure 5. Inhibitory effects of TLR2 agonists to induced PPAR γ expression, lipid body formation and PGE $_2$ production, but not TNF- α production.

PPAR γ expression by peritoneal macrophages were stimulated *in vitro* by BCG (MOI 1:1), *M. smegmatis* (1:1), Zymozan (1:1) or vehicle. B) lipid body formation performed 24h after BCG, *M. smegmatis* or zymosan infection. C) parallel with PGE $_2$ production D) TNF α production . Each bar represents the mean \pm SEM from at least 3 pools of 10 animals. Differences between control and infected groups are indicated by asterisks ($p < 0.05$).

Footnotes

¹ This work was supported by Howard Hughes Medical Institute, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil), PRONEX (MCT, Brazil) and PAPES (FIOCRUZ, Brazil).

² Author for correspondence: Patricia T. Bozza, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil - 21045-900
FAX: (5521) 25909490 Phone: (5521) 25984492 ext: 221
E-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br

³ **Abbreviations**
ADRP, adipose differentiation related protein; BCG, Bacillus Calmette Guérin; IL(), interleukin (); PG(), prostaglandin (); PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; TLR, toll-like receptor.

Figure 1

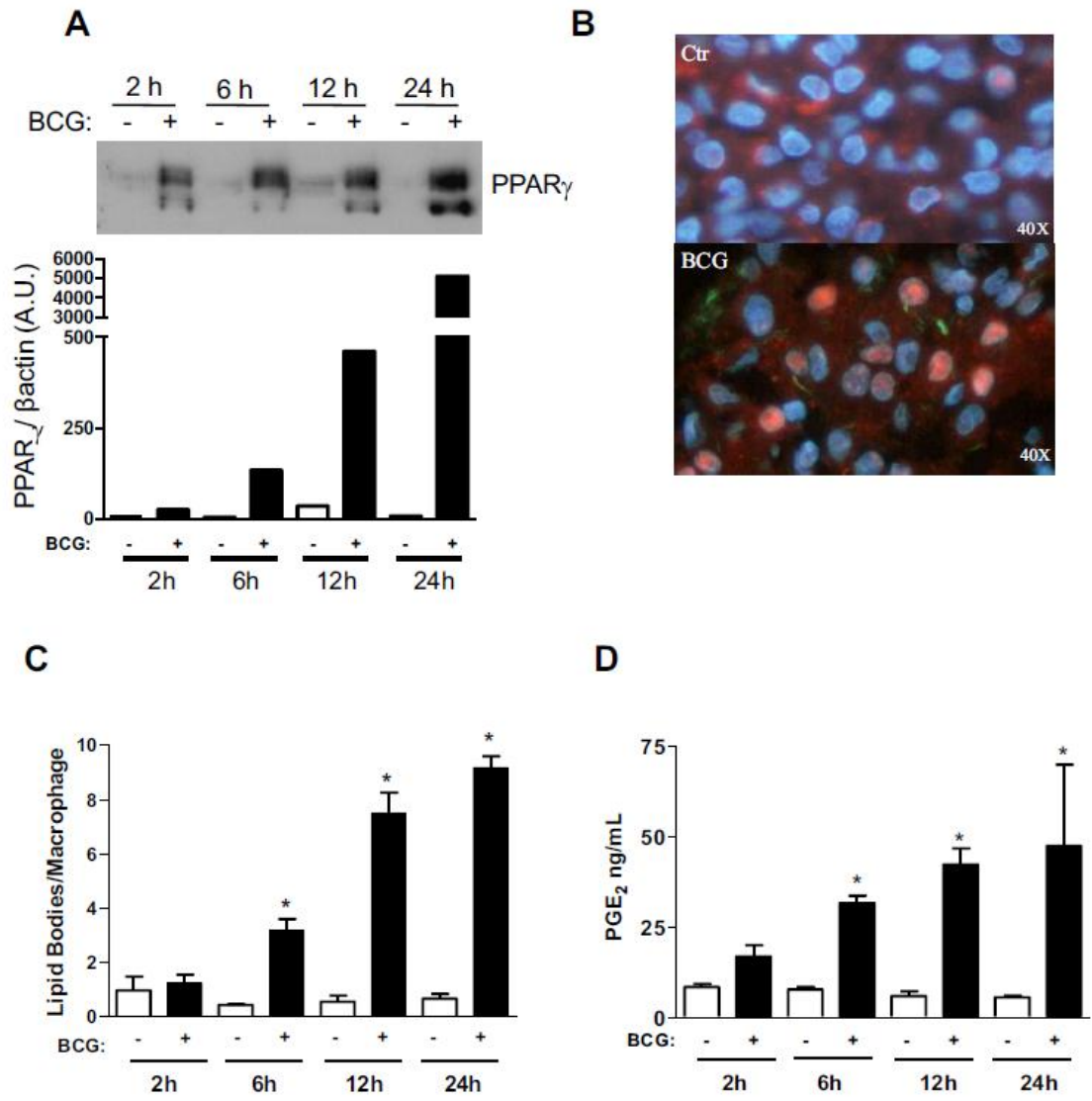


Figure 2

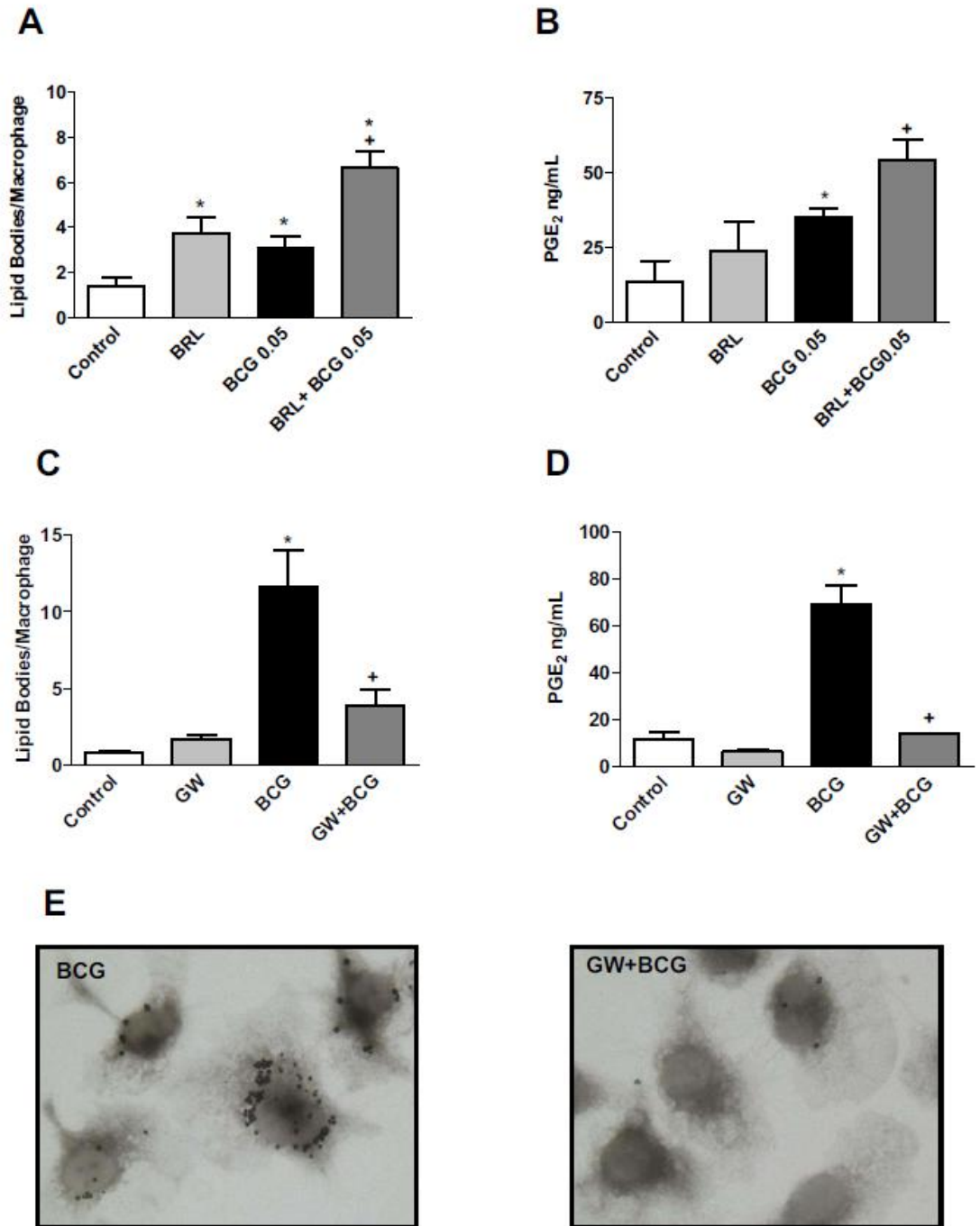


Figure 3

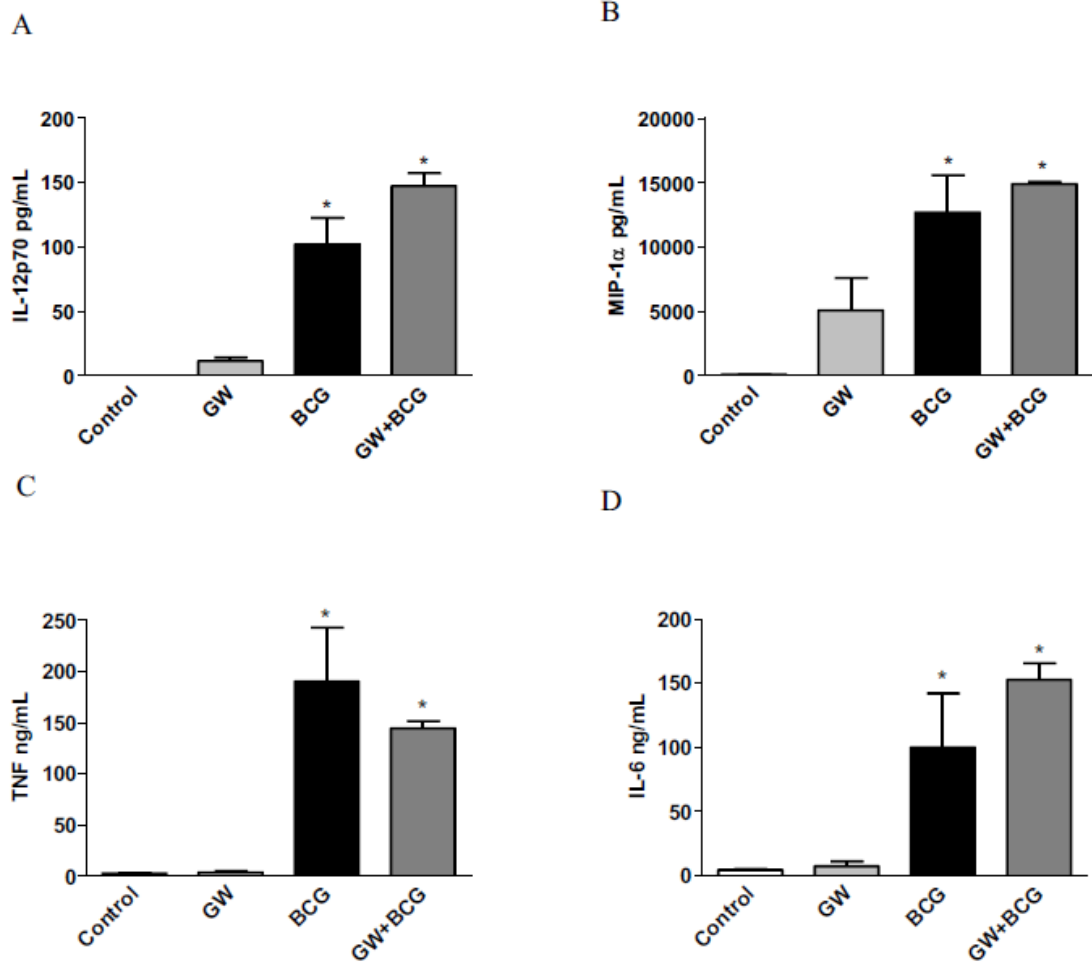


Figure 4

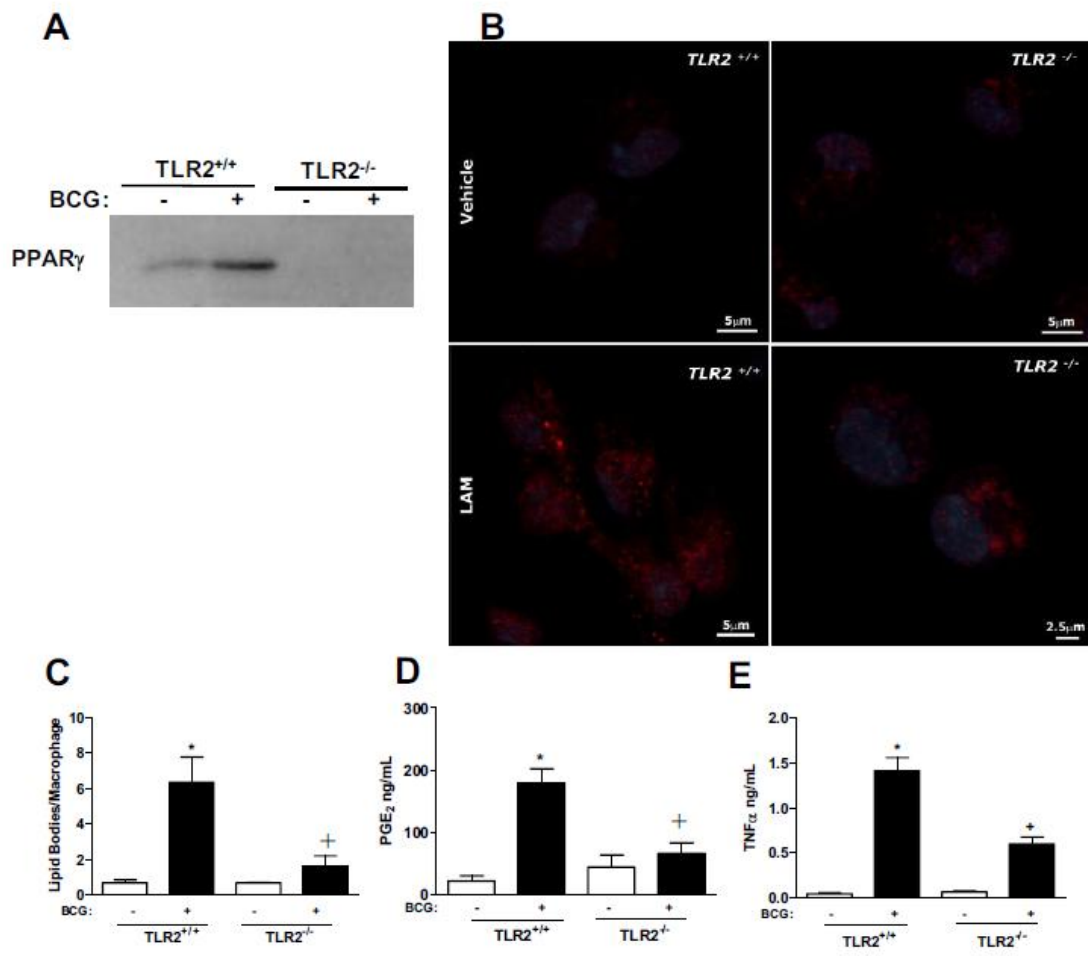


Figure 5

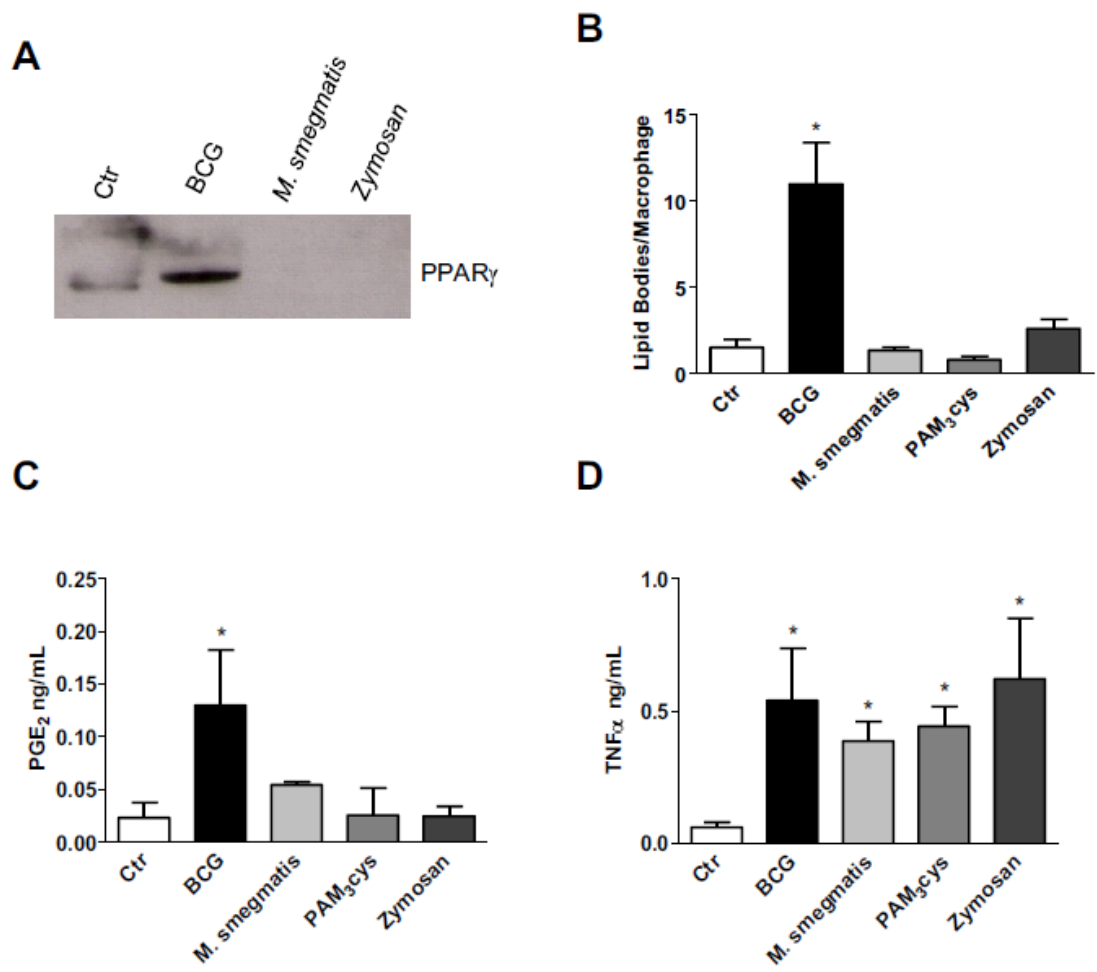


Table 1 – Lipid Body formation, PGE₂ and TNF α synthesis is independent of TLR6 signalling during BCG infection ^a.

Parameters	TLR6 ^{+/+}		TLR6 ^{-/-}	
	Vehicle	BCG	Vehicle	BCG
Lipid Bodies (N ^o /cell)	1.1 ± 0.2 ^b	7.3 ± 0.6 ^b	3.5 ± 0.6 ^c	9.3 ± 0.8 ^c
PGE ₂ (ng/mL)	52.1 ± 0.1 ^b	129.2 ± 0.3 ^b	4.6 ± 0.1 ^c	107.8 ± 0.4 ^c
TNF- α (ng/mL)	1.3 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.05 ^b	1.1 ± 0.09 ^c	4.6 ± 0.2 ^c

a Macrophages isolated from TLR6^{+/+} and TLR6^{-/-} mice were stimulated in vitro with BCG or vehicle for 24 h. Results were expressed as means ± SEM from 3 pools of macrophages from five animals each.

b Value of $p \leq 0.05$ compared to BCG-infected cells isolated from TLR6^{+/+} mice.

c Value of $p \leq 0.05$ compared to BCG-infected cells isolated from TLR6^{-/-} mice.

Toll-Like Receptor-2-Mediated C-C Chemokine Receptor 3 and Eotaxin-Driven Eosinophil Influx Induced by *Mycobacterium bovis* BCG Pleurisy[∇]

Heloisa D'Ávila, Patrícia E. Almeida, Natália R. Roque,
Hugo C. Castro-Faria-Neto, and Patrícia T. Bozza*

Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz,
Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil

Received 18 August 2006/Returned for modification 15 September 2006/Accepted 1 December 2006

An acute and persistent eosinophil infiltration is observed during *Mycobacterium bovis* BCG pleural infection in mice. Eosinophil accumulation, lipid body formation, and eotaxin production were significantly reduced in BCG-infected Toll-like receptor-2 (TLR2)-deficient mice compared to wild-type mice. Neutralization of eotaxin or CCR3 drastically inhibited BCG-induced eosinophil accumulation and lipid body formation, indicating that BCG-induced eosinophil recruitment and activation is largely dependent of TLR2-mediated eotaxin generation.

Eosinophils are fundamentally found in tissues that have an interface with the external environment and its bacterial flora, such as the gastrointestinal and respiratory tracts. Accumulating evidence has established eosinophils as multifunctional leukocytes with varied effector and immunomodulatory functions not only in allergic or helminthic disease but also in the initiation and amplification of numerous inflammatory and infectious responses and as modulators of innate and adaptive immunity (1, 22).

Mycobacterial infections frequently show eosinophil recruitment in both naturally occurring infections in human patients (11, 26) and in animal experimental infections (6, 14, 17, 20, 27). Enhanced eosinophil recruitment to sites of infection has been associated with unrestricted growth of mycobacteria observed in mouse susceptible strains in contrast to resistant ones (27) and in mice deficient in gamma interferon (IFN- $\gamma^{-/-}$) that are highly susceptible to infection with tuberculosis-causing organisms (13). Moreover, eosinophilia has been associated with higher rates of active tuberculosis in human immunodeficiency virus type 1-infected adults (9), suggesting that eosinophils may have roles in pathogenesis and susceptibility to mycobacterial infection. Although different studies have demonstrated that eosinophils accumulate at sites of mycobacterial infection, including celomatic cavities, skin, lungs, and airways, the mechanisms involved in eosinophil trafficking and activation are not well characterized. In the present study, we used a murine model of pleural tuberculosis to investigate the mechanism involved in eosinophil recruitment and activation.

Pleurisy in mice was induced in susceptible C57BL/6 mice by intrapleural injection of live or heat-killed *Mycobacterium bovis* BCG (Moreau strain, Fundação Ataulpho de Paiva, Brazil) at

5×10^6 bacilli/cavity as previously described (7), with protocols approved by the Fundação Oswaldo Cruz animal welfare committee. The first phase of pleural leukocyte accumulation induced by BCG infection was characterized by a marked increase in neutrophil numbers (mean \pm the standard error of the mean [SEM]: from undetected in control animals to $0.12 \pm 0.05 \times 10^6$ /cavity at 1 h and $8.5 \pm 0.67 \times 10^6$ /cavity at 6 h). After 6 h of BCG infection a significant influx of eosinophils, macrophages, and lymphocytes was observed with a peak at 24 h (Fig. 1A to C), and the numbers of these cells remained increased for at least 15 days of infection as previously demonstrated (17, 20) (Fig. 1C). Control mice had no detectable eosinophils in the cavity (Fig. 1A and C). Although heat-killed BCG was capable of recruiting eosinophils to the pleural cavity within 24 h, the intensity of this phenomenon was reduced compared to the same dose of live BCG, suggesting that eosinophil recruitment was partially dependent on the bacterial viability (Fig. 1D).

Pattern recognition receptors involved in recognizing mycobacteria include the mannose receptor, complement receptor, and Toll-like receptors (TLRs) (16). TLR2 and TLR4 and, more recently, TLR6 and TLR1 that heterodimerize with TLR2, have been shown to mediate signaling induced by mycobacteria (5, 15). To investigate the role of TLR-mediated pathogen recognition in the mechanism of eosinophil influx and lipid body formation, we infected TLR2 knockout (KO) mice (in a homogeneous C57BL/6 background) and TLR4-deficient mouse strain C57/BL10 ScCr, along with their wild-type controls. We observed that BCG-induced eosinophil recruitment in TLR2-deficient mice was drastically inhibited compared to wild-type mice (Fig. 2A). In contrast, BCG infection in TLR4-deficient mice could induce pleural eosinophil recruitment at levels comparable to that seen in wild-type mice (Fig. 2B).

We have recently described how intracellular lipid domains, called lipid bodies, are specific sites involved in the synthesis of lipid mediators during BCG infection (7). In limited numbers, lipid bodies are normal constituents of many cells; however,

* Corresponding author. Mailing address: Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro 21045-900, Brazil. Phone: 55-21-2598-4492, x221. Fax: 55-21-2590-9490. E-mail: pbozza@ioc.fiocruz.br.

[∇] Published ahead of print on 11 December 2006.

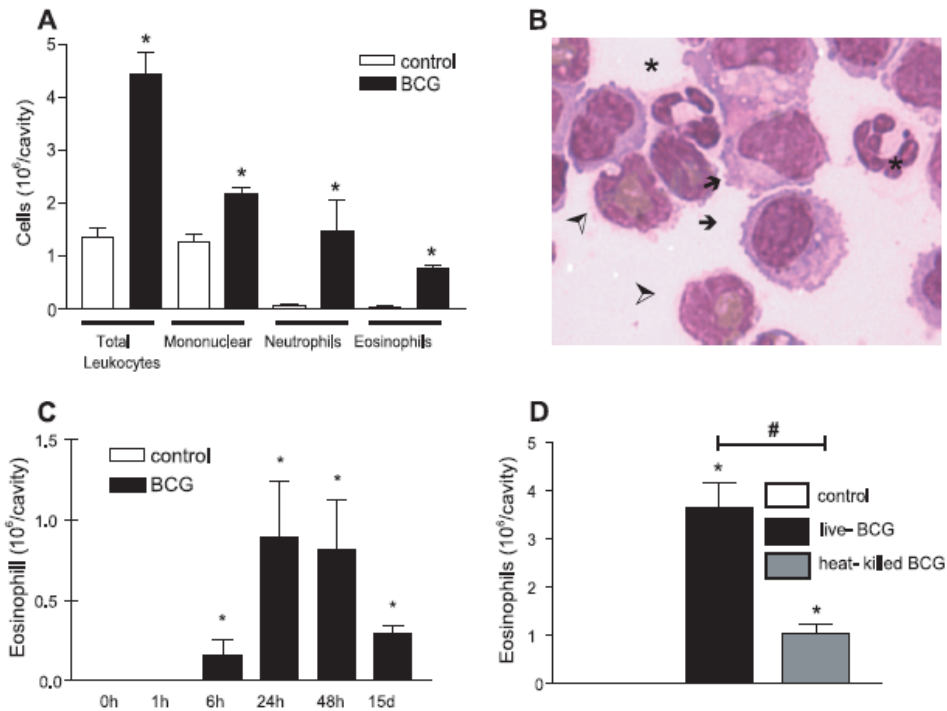


FIG. 1. *M. bovis* BCG-induced eosinophil accumulation in mice. (A) Total and differential recruitment of cells to pleural cavity induced by BCG (5×10^6 bacilli/cavity) within 24 h. (B) Macrophages (arrows), neutrophils (*), and eosinophils (➤) are observed in the pleural cavity from the BCG-infected group within 24 h. (C) Kinetics of BCG-induced eosinophil influx to the pleural cavity. (D) Eosinophil influx induced by the intrapleural injection of live or heat-killed BCG within 24 h. Cells were enumerated after May-Grünwald-Giemsa staining and observed in objective of immersion ($\times 100$). The results are expressed as means \pm the SEM from at least seven animals. *, $P < 0.05$ compared to the control group; #, $P < 0.05$ compared to live BCG.

the numbers and sizes of lipid bodies increase prominently in cells participating in inflammatory responses. It has been demonstrated that the lipid body formation in leukocytes is a highly regulated event that depends on the interaction of cellular receptors with their ligands. Also, these organelles represent specialized intracellular domains whose induced formation is centrally related to activating mechanisms within the cells and are dynamic sites involved in the compartmentalization of proteins (including protein kinases, eicosanoid-forming enzymes, and cytokines), and lipid bodies are markers of leukocyte activation (4). In macrophages, it has been demonstrated that lipopolysaccharide-induced lipid body formation occurs through TLR4 and CD14 recognition, whereas BCG infection in vivo induced lipid body formation in a TLR2-dependent process (7, 18). In vivo the ability of BCG to induce eosinophil activation, as assessed by lipid body formation, through a TLR2-dependent pathway was observed. As shown in Fig. 2C and D, BCG significantly induced lipid body formation in C57BL/6, C57BL/10, and C57BL/10 ScCr eosinophils but not in TLR2^{-/-} eosinophils. These results demonstrate an essential role for TLR2 receptors in BCG recognition and signaling to induce eosinophil recruitment and lipid body formation in eosinophils.

It has been demonstrated that eosinophils do not to express TLR2, TLR4, or CD14, and consequently are not able to

directly respond to TLR2 or TLR4 ligands (23). Indeed, it has been demonstrated that the TLR4 ligand lipopolysaccharide induces eosinophil accumulation in vivo through mechanisms that are largely dependent on monocyte/macrophage- and lymphocyte-derived cytokine production (3, 19). Similar monocyte/macrophage-derived cytokine dependent mechanisms could be involved in TLR2-dependent eosinophil recruitment induced by BCG. Mycobacterial infections up-regulate genes encoding proteins involved in cell migration and homing (21). Furthermore, it has been demonstrated that mice deficient in IFN- γ or tumor necrosis factor alpha are extremely susceptible to infection by tuberculosis-causing organisms (reviewed in reference 12). The roles of three cytokine/chemokines relevant to cell activation in *Mycobacterium*-induced responses were evaluated with regard to their involvement in BCG-induced eosinophil influx. In order to determine the involvement of endogenously generated proinflammatory cytokines in eosinophil recruitment induced by BCG, MCP-1/CCL2-deficient mice, TNFR1 (p55)-deficient mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), and IFN- γ -deficient mice were infected intrapleurally by BCG.

As shown in Fig. 2E, no inhibition in eosinophil recruitment was observed 24 h after infection when each respective wild-type animal was compared to MCP-1/CCL2-deficient mice. In

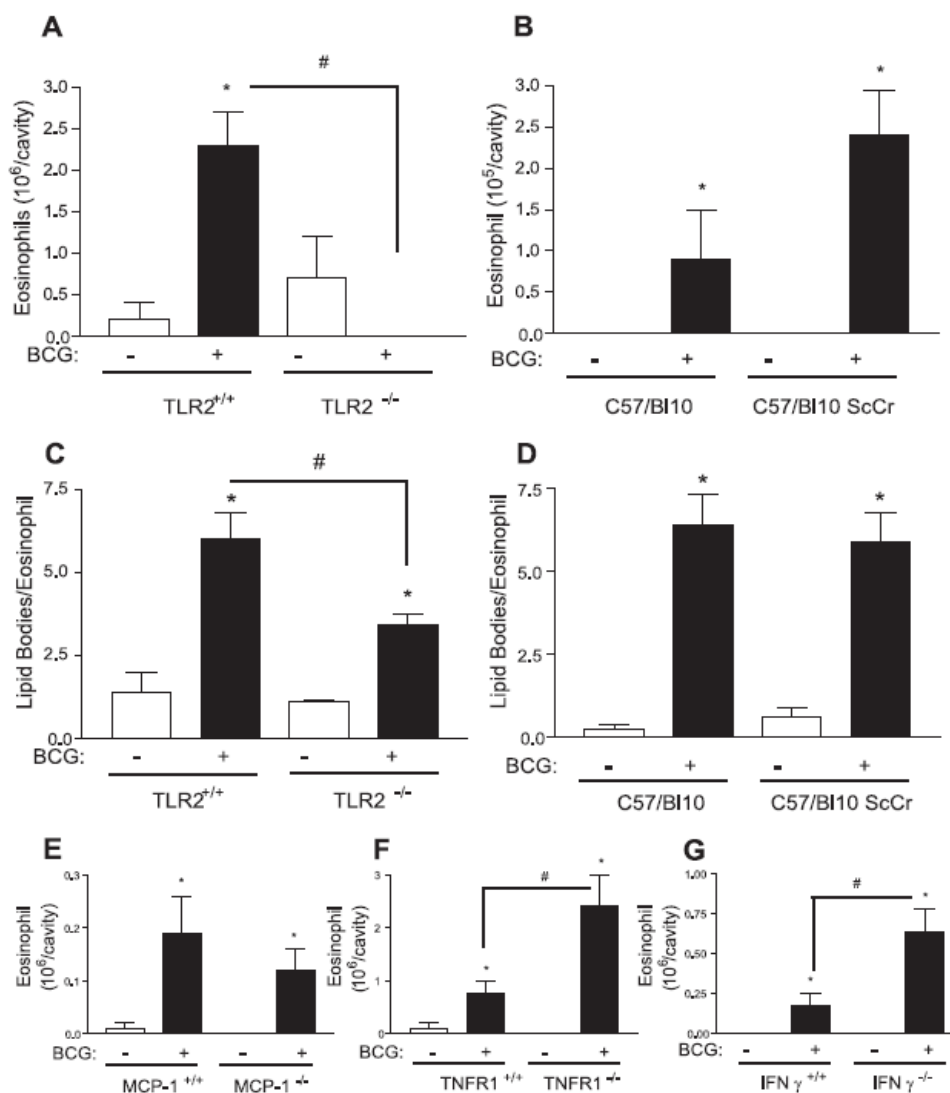


FIG. 2. Mechanisms involved in eosinophil recruitment and activation induced by BCG infection. An analysis of pleural eosinophil accumulation and lipid body formation in wild-type (TLR2^{+/+}) and TLR2 KO (TLR2^{-/-}) mice (A and C) and in C57BL/10 ScCr (TLR4^{+/+}) and C57BL/10 ScCr (TLR4^{-/-}) mice (B and D) 24 h after BCG infection (5×10^6 bacilli/cavity) was carried out. Eosinophil influx was analyzed in wild-type (MCP-1^{+/+}) and MCP-1 KO (MCP-1^{-/-}) mice (E), wild-type (TNFR1^{+/+}) and TNFR1 knockout (TNFR1^{-/-}) mice (F), and wild-type (IFN-γ^{+/+}) and IFN-γ knockout (IFN-γ^{-/-}) mice (G) 24 h after BCG infection (5×10^6 bacilli/cavity). Lipid body formation was enumerated after osmium staining. Each bar represents the mean \pm the SEM from at least eight animals. Differences between control and infected groups are indicated by asterisks ($P < 0.05$); a “#” symbol indicates differences between BCG-infected wild-type and BCG-deficient mice.

agreement with previous findings (13), in IFN-γ KO mice (Fig. 2G) and also in tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) (Fig. 2F)-deficient animals, we observed an increased influx of eosinophils compared to wild-type mice.

Previous findings have described the role of interleukin-5 (IL-5) in eosinophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG in wild-type and in IFN-γ-deficient mice (13, 17). The involvement of TLR2 in IL-5 synthesis after BCG infection was analyzed. TLR2 KO mice produced reduced amounts of IL-5 in the pleural

fluid compared to wild-type mice at 24 h after infection (Fig. 3A). Similarly, peritoneal cells from TLR-2 KO mice were unable to produce IL-5 when infected in vitro by BCG under conditions in which cells from wild-type mice produced significant levels of IL-5 when infected (from 7.6 ± 1.35 pg/ml in BCG-infected wild-type mice to undetectable levels in TLR2-deficient mice), indicating that IL-5 production induced by BCG is largely dependent on TLR2.

Eotaxin is a key mediator in the eosinophil trafficking into

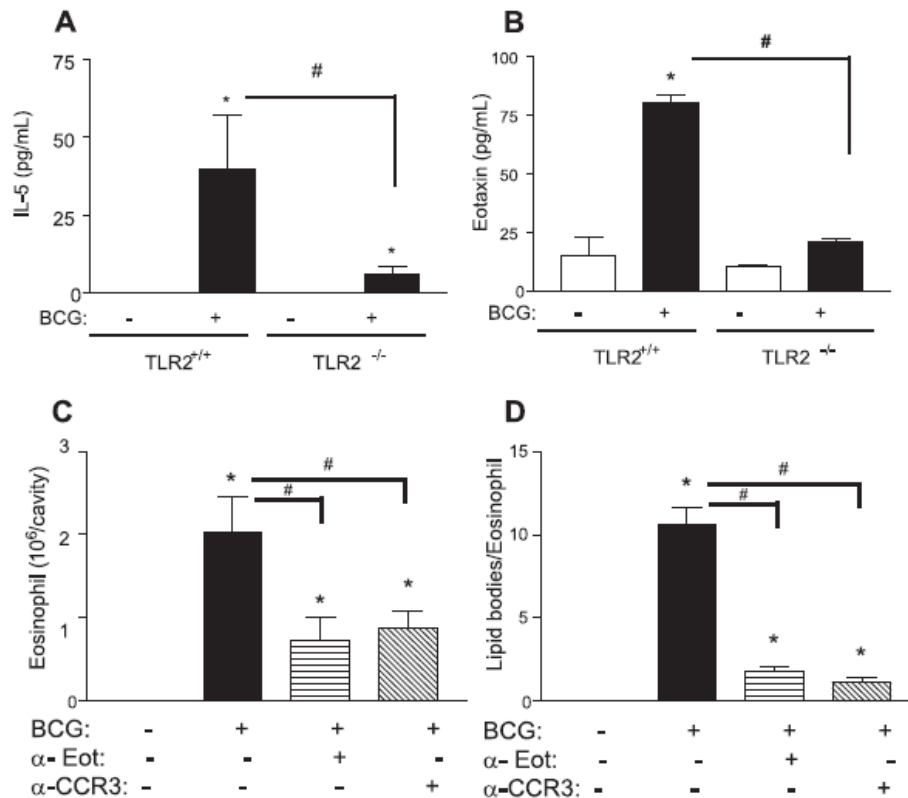


FIG. 3. TLR2-mediated endogenous IL-5 and eotaxin production are involved in eosinophil recruitment and activation induced by BCG. IL-5 (A) or eotaxin (B) production were evaluated in the pleural wash from TLR2^{+/+} and TLR2^{-/-} mice stimulated in vivo by BCG (5×10^6 bacilli/cavity) or vehicle within 24 h by enzyme-linked immunosorbent assay (Duo set kit; R&D Systems, Minneapolis, MN). The effect of neutralization of eotaxin or CCR3 on pleural eosinophil accumulation (C) and lipid body formation (D) induced by BCG infection was also analyzed. Treatments (neutralizing antibodies at 10 μ g/animal; R&D Systems) were administered intraperitoneally 30 min before intrapleural injection of BCG (5×10^6 bacilli/cavity), and eosinophil analysis was performed within 24 h. Each bar represents the mean \pm the SEM from at least four animals. Differences between control and infected groups are indicated by asterisks ($P < 0.05$); an “#” symbol represents differences between treated and untreated BCG-infected groups or between wild-type and BCG-deficient mice.

inflamed tissues (22). In addition, eotaxin-mediated CCR3 activation is a potent inducer of lipid body formation in eosinophils (2, 25). As shown in Fig. 3B, BCG significantly induced eotaxin production in vivo detected in the pleural fluid of TLR2^{+/+} mice but not in TLR2^{-/-} mice (Fig. 3B). Accordingly, eotaxin upregulation has been observed by transcriptome gene array analysis of the macrophage cell line THP-1 infected by *M. tuberculosis* (21). To investigate the in vivo role of eotaxin activation on BCG-induced lipid body formation and eosinophil recruitment, we pretreated mice with neutralizing antibodies to eotaxin or CCR3 (10 μ g/cavity [intraperitoneal] 30 min before infection). Both BCG-induced eosinophil influx and lipid body formation were dramatically inhibited by the pretreatment with neutralizing antibodies (Fig. 3C and D), indicating that endogenous eotaxin, acting via CCR3, elicited in vivo lipid body formation within infiltrating eosinophils. Neutrophil and monocyte recruitment, as well as lipid body formation within these infiltrating cells, were not affected by pretreatment with anti-CCR3 or with anti-eotaxin.

The role of eosinophils in mycobacterial pathogenesis is still

not well defined. The bactericidal potential of eosinophils has been demonstrated by their ability to phagocytize, mount a respiratory burst, and mobilize cytotoxic proteins from specific granules after bacterial infection (8, 24), suggesting a protective role of eosinophils in bacterial infections. However, increased numbers of eosinophils at sites of mycobacterial infection has been associated with unrestricted growth of mycobacteria in animals susceptible to infection with tuberculosis-causing organisms (10), suggesting that eosinophils may exaggerate disease severity because eosinophils, which have been shown to phagocytose mycobacteria (6), may provide an intracellular environment in which mycobacteria could proliferate in an unrestricted manner and may also contribute to mycobacteria dissemination (13). Therefore, the role of eosinophils in the host immune response to mycobacterial infection in experimental and clinical tuberculosis remains to be established. The demonstration that eotaxin acting through CCR3 is critically involved in eosinophil recruitment during mycobacterial infection suggests that antibody neutralization or genetically deficient animals to eotaxin and/or CCR3 would be use-

ful tools to address the role of eosinophils in mycobacterial pathogenesis in future studies.

The present findings demonstrate that BCG infection induces pleural eosinophil accumulation in a process requisitely dependent on TLR2 signaling. In addition, our results indicate that BCG-induced eosinophil recruitment and activation is mediated through TLR2-dependent endogenous eotaxin generation and signaling through CCR3.

This study was supported by the Howard Hughes Medical Institute (P.T.B.), PRONEX-MCT, CNPq, and FAPERJ.

We thank Bandeira-Melo for helpful comments on this study and the manuscript. We are thank S. Akira, R. Gazzinelli, J. Viola, and C. Gerard for kindly providing the animals used in this study.

REFERENCES

- Adamko, D. J., S. O. Odemuyiwa, M. Vethanayagam, and R. Moqbel. 2005. The rise of the phoenix: the expanding role of the eosinophil in health and disease. *Allergy* **60**:13–22.
- Bandeira-Melo, C., M. Phofofo, and P. F. Weller. 2001. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C₄ production in eosinophils and basophils. *J. Biol. Chem.* **276**:22779–22787.
- Bozza, P. T., H. C. Castro-Faria-Neto, C. Penido, A. P. Larangeira, M. das Gracas, M. O. Henriques, P. M. Silva, M. A. Martins, R. R. dos Santos, and R. S. Cordeiro. 1994. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. *J. Leukoc. Biol.* **56**:151–158.
- Bozza, P. T., R. C. N. Melo, and C. Bandeira-Melo. 2007. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacol. Ther.* **113**:30–49.
- Bulut, Y., E. Faure, L. Thomas, O. Equils, and M. Arliti. 2001. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J. Immunol.* **167**:987–994.
- Castro, A. G., N. Esaguy, P. M. Macedo, A. P. Aguas, and M. T. Silva. 1991. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect. Immun.* **59**:3009–3014.
- D'Avila, H., R. C. Melo, G. G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H. C. Castro Faria Neto, and P. T. Bozza. 2006. *Mycobacterium bovis* BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J. Immunol.* **176**:3087–3097.
- DeChatelet, L. R., P. S. Shirley, L. C. McPhail, C. C. Huntley, H. B. Muss, and D. A. Bass. 1977. Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood* **50**:525–535.
- Elliott, A. M., J. Kyosimire, M. A. Quigley, J. Nakiyingi, C. Watera, M. Brown, S. Joseph, N. French, C. F. Gilks, and J. A. Whitworth. 2003. Eosinophilia and progression to active tuberculosis in HIV-1-infected Ugandans. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **97**:477–480.
- Erb, K. J., J. Kirman, B. Delahunt, H. Moll, and G. Le Gros. 1999. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon-gamma signalling. *Eur. Cytokine Network* **10**:147–154.
- Flores, M., J. Merino-Angulo, J. G. Tanago, and C. Aquirre. 1983. Late generalized tuberculosis and eosinophilia. *Arch. Intern. Med.* **143**:182.
- Flynn, J. L. 2006. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes Infect.* **8**:1179–1188.
- Kirman, J., Z. Zakaria, K. McCoy, B. Delahunt, and G. Le Gros. 2000. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. *Infect. Immun.* **68**:2976–2978.
- Lasco, T. M., O. C. Turner, L. Cassone, I. Sugawara, H. Yamada, D. N. McMurray, and I. M. Orme. 2004. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* **72**:1147–1149.
- Means, T. K., B. W. Jones, A. B. Schromm, B. A. Shurtleff, J. A. Smith, J. Keane, D. T. Golenbock, S. N. Vogel, and M. J. Fenton. 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J. Immunol.* **166**:4074–4082.
- Medzhitov, R. 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:135–145.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R. S. Cordeiro, and M. G. Henriques. 1997. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy. *J. Leukoc. Biol.* **62**:778–785.
- Pacheco, P., F. A. Bozza, R. N. Gomes, M. Bozza, P. F. Weller, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J. Immunol.* **169**:6498–6506.
- Penido, C., H. C. Castro-Faria-Neto, A. Vieira-de-Abreu, R. T. Figueiredo, A. Pelled, M. A. Martins, P. J. Jose, T. J. Williams, and P. T. Bozza. 2001. LPS induced eosinophils migration via CCR3 signaling through a mechanism independent of Rantes and Eotaxin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **25**:707–716.
- Penido, C., A. Vieira-de-Abreu, M. T. Bozza, H. C. Castro-Faria-Neto, and P. T. Bozza. 2003. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin. *J. Immunol.* **171**:6788–6794.
- Ragno, S., M. Romano, S. Howell, D. J. Pappin, P. J. Jenner, and M. J. Colston. 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology* **104**:99–108.
- Rothenberg, M. E., and S. P. Hogan. 2006. The eosinophil. *Annu. Rev. Immunol.* **24**:147–174.
- Sabroe, I., E. C. Jones, L. R. Usher, M. K. Whyte, and S. K. Dower. 2002. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J. Immunol.* **168**:4701–4710.
- Svensson, L., and C. Wenneras. 2005. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect.* **7**:720–728.
- Vieira-de-Abreu, A., E. F. Assis, G. S. Gomes, H. C. Castro-Faria-Neto, P. F. Weller, C. Bandeira-Melo, and P. T. Bozza. 2005. Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C₄ synthesis within eosinophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **33**:254–261.
- Vijayan, V. K., A. M. Reetha, M. S. Jawahar, K. Sankaran, and R. Prabhakar. 1992. Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis. *Chest* **101**:1708–1709.
- Werneck-Barroso, E., A. C. Moura, M. M. Monteiro, O. Menezes de Lima Junior, M. N. de Meirelles, and M. G. Henriques. 2000. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm. Res.* **49**:206–213.

Editor: J. L. Flynn

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](#)