

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado Em Biologia Celular e Molecular

### **Impacto da Formação e da Função dos Corpúsculos Lipídicos na Resposta Imune na Infecção Experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

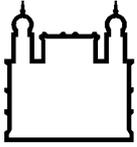
**Rafael Marques Cardoso**

**Rio de Janeiro**  
**Setembro de 2008**

# **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**

*Rafael Marques Cardoso*

**Impacto da Formação e da Função dos Corpúsculos Lipídicos na Resposta Imune na  
Infecção Experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

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

**Orientadora:** Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

**RIO DE JANEIRO**  
Setembro de 2008

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C268

Cardoso, Rafael Marques

Impacto da formação e da função dos corpúsculos lipídicos na resposta imune na infecção experimental por *Mycobacterium bovis* BCG/ Rafael Marques Cardoso. – Rio de Janeiro, 2008.

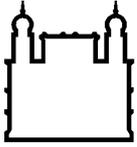
x, 90 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 73-90

1. Corpúsculos lipídicos. 2. *M. bovis* BCG. 3. Prostaglandina E2. 4. Sobrevivência e multiplicação micobacterianas. I. Título.

CDD 616.01



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: Rafael Marques Cardoso**

**Impacto da Formação e da Função dos Corpúsculos Lipídicos na Resposta Imune na Infecção Experimental por *Mycobacterium bovis* BCG**

**ORIENTADORA: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza**

**Aprovada em 03 / 09 / 2008**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra.** Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins (presidente)  
**Prof. Dra.** Maria Cristina Vidal Pessolani  
**Prof. Dr.** Renato Augusto DaMatta  
**Prof. Dra.** Carmen Penido (revisor e suplente)  
**Prof. Dra.** Cecília Jacques Gonçalves de Almeida (suplente)

Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2008.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais e meu irmão, por todos os ensinamentos, por todos os exemplos infindáveis de caráter, honra, respeito e amor que torna o cerne familiar um recanto de sentido neste mundo cada vez mais desorientado.

Às minhas queridas avós Hermínia (*in memorium*) e Belém, avós Daniel (*in memorium*) e Manuel por terem feito de suas casas “refúgios” onde sempre podia brincar, fazer bastante bagunça, dormir no sofá até tarde para depois ir pra casa carregado ainda dormindo.

À minha tia Silvana, por inundar as vidas de todas as pessoas que a cercam de alegria, alto astral, espírito batalhador.

À minha namorada, Cynthia, simplesmente por me amar, me apoiar, me compreender, fazer de mim o homem mais feliz do mundo e, ao permitir que a ame de uma maneira indescritível, me torne uma pessoa melhor.

Às novas pessoas que ingressaram mais recentemente na minha família, Thiago, Doquinha, Francisco e Tereza pela paciência de me agüentarem chato e falante que sou e só me exigirem em contrapartida fazer uma única pessoa feliz.

Às minhas orientadoras, Dra. Patrícia Torres Bozza e Dra. Heloisa D`Avila pela condução majestosa dos projetos de pesquisa dos quais participei e da orientação precisa e conselhos valorosos no tocante a tese que desenvolvi. Vocês são exemplos de dedicação, empenho, ética, discernimento e, sobretudo, humildade.

À Dra. Carmen Penido, pela atenção que me foi dada e pela revisão cuidadosa e esmerada.

À Dra. Cynthia S. Horn, assim como uma mãe, me ensinou a dar os primeiros passos na jornada experimental, dando início à minha vida de amor pela carreira científica, sempre com seus conselhos estatisticamente significativos, elevados níveis de compreensão, além de seu discernimento e ética irretocáveis.

A todas as pessoas que integram a equipe do Laboratório de Imunofarmacologia, que me acompanharam em todos os momentos nestes últimos 2 anos. Na conversa essencial dos tempos de incubação, especialmente naqueles experimentos que saímos mais tarde que o planejado; na correria dos envios de resumos para os congressos, dos términos de relatórios, preparações de apresentações, no dia a dia, mas, acima de tudo isso, das palavras amigas nos momentos difíceis, de motivação quando os experimentos não ficavam bons, de

ouvir pacientemente a declamação de problemas pessoais. Realmente muito obrigado.

Aos meus amigos eternos Fernando e Luiz que por mais de 10 anos têm sido presença valorosa e constante, nos momentos de descontração, farrá, mas também apoio e força na transposição dos obstáculos que a vida nos insiste impor.

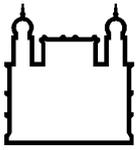
Aos meus grandes amigos que encontrei na faculdade, especialmente Eduardo, Tarcizio, Jaime, Monique e Fernanda com os quais passei inúmeras horas diárias durante cinco anos e que tiveram a habilidade de tornar este tempo agradabilíssimo, engraçado e ao mesmo tempo muito sério e cujas estórias por nós produzidas estarão para sempre marcadas, até porque sempre são lembradas em nossos encontros.

A Deus, por me permitir a sorte infinita ou destino sabiamente traçado de ter, em tão pouco tempo de vida, encontrado pessoas tão maravilhosamente especiais quanto as que eu acabo de descrever.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia e seus chefes, Dr. Hugo Caire de Castro-Faria-Neto e Dra. Patrícia Torres Bozza por fornecerem as condições necessárias ao desenvolvimento deste estudo e todo o apoio. Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERJ, PAPES-FIOCRUZ. Ao suporte financeiro concedido pelo Instituto Oswaldo Cruz.

## Sumário:

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
1) Introdução.....	1
1.1) Tuberculose.....	1
1.1.1) Aspectos Históricos.....	1
1.1.2) Caracterização Epidemiológica.....	1
1.1.3) Fisiopatologia da Infecção e Resposta Imune na Tuberculose.....	3
1.1.4) Mecanismos de Evasão da Resposta Imune e Sobrevivência.....	10
1.2) Apoptose Neutrófila.....	14
1.2.1) Processo Apoptótico: Início e “Fim” da Participação de Neutrófilos na Resposta Aguda nas Infecções Micobacterianas.....	14
1.2.2) Influência Dicotômica da Apoptose na Resposta Inflamatória.....	16
1.3) Corpúsculos Lipídicos.....	18
1.3.1) Aspectos Iniciais.....	18
1.3.2) Composição e Formação.....	20
1.3.3) Mecanismos de Biogênese de Corpúsculos Lipídicos.....	24
1.3.4) Envolvimento dos Corpúsculos Lipídicos na Síntese de Mediadores Inflamatórios.....	27
1.3.5) Envolvimento dos Corpúsculos Lipídicos na Modulação da Resposta Imune Inata.....	31
2) Objetivo Geral.....	36
2.1) Objetivos Específicos.....	36
3) Material e Metodologias.....	37
3.1) Animais.....	37
3.2) BCG.....	37
3.3) Cultura e Infecção de Macrófagos Peritoneais.....	37
3.4) Tratamentos por Inibidores da Formação de Corpúsculos Lipídicos.....	38
3.5) Obtenção de Neutrófilos Apoptóticos.....	39
3.6) Coloração de Corpúsculos Lipídicos.....	40
3.7) Avaliação de Crescimento Micobacteriano.....	41
3.8) Quantificação de Mediadores Lipídicos e Citocinas.....	41
3.8.1) Dosagem de PGE <sub>2</sub> .....	41
3.8.2) Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-10 (ELISA).....	42
3.8.3) Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-10 (Luminex).....	43
3.9) Análises Estatísticas.....	44
4) Resultados.....	45
4.1) Avaliação da Formação de Corpúsculos lipídicos.....	45
4.2) Análise da Produção de PGE <sub>2</sub> nas Culturas de Macrófagos Infectados por <i>M. bovis</i> BCG.....	47
4.3) Quantificação de Citocinas nos Sobrenadantes de Cultura de Macrófagos Infectados por <i>M. bovis</i> BCG.....	49
4.4) Efeito de Neutrófilos Apoptóticos sobre a Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e Síntese de PGE <sub>2</sub> .....	52
4.5) Avaliação do Impacto da Formação de Corpúsculos Lipídicos na Sobrevivência e na Multiplicação Micobacterianas.....	58
5) Discussão.....	60
6) Conclusão.....	71
7) Referências Bibliográficas.....	73



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Impacto da Formação e da Função dos Corpúsculos Lipídicos na Resposta Imune na Infecção Experimental por *M. bovis* BCG

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafael Marques Cardoso

Corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas que aumentam em tamanho e número em leucócitos envolvidos em grande variedade de processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos *in vivo* e *in vitro*, incluindo infecções micobacterianas. Sua morfologia, constituição proteica e lipídica e capacidade de interagir com outras organelas pode variar de acordo com o tipo de célula e com as vias específicas de biogênese estimuladas. Estas estruturas contêm uma série de proteínas, incluindo pequenas GTPases, proteínas da família Rab e quinases indicando possível participação destas organelas na sinalização intracelular, na comunicação intercelular e no metabolismo lipídico. Os corpúsculos lipídicos também compartimentalizam enzimas e moléculas envolvidas na produção de eicosanóides, além de funcionarem como regiões de armazenamento de citocinas em leucócitos inflamatórios, sugerindo sua participação como plataformas intracelulares induzíveis e altamente reguladas para a produção e/ou secreção de mediadores lipídicos e citocinas em resposta a condições inflamatórias, incluindo infecções por patógenos intracelulares. Dados recentes do nosso grupo indicam a participação importante destas organelas na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), um conhecido desativador de resposta citotóxica contra patógenos intracelulares, viabilizando a sobrevivência micobacteriana pela modulação negativa da atividade de macrófagos. A infecção por micobactérias patogênicas induz a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de forma dependente de dose e tempo, além de induzirem processo de apoptose em neutrófilos no sítio da infecção. Células apoptóticas, por sua vez, têm mostrado papel na modulação da resposta imune contra patógenos intracelulares. Neste estudo, investigamos a participação e função de corpúsculos lipídicos de macrófagos em modelo murino de tuberculose e sua relação com a sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas.

Para esse propósito, macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* com *Mycobacterium bovis* BCG na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos e tratados com ácido acetilsalicílico (AAS, 5 µM), NS-398 (1 µM) (inibidores de ciclooxigenases) ou C75 (5 µg/mL) (inibidor de ácido graxo sintase). O número de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub> foram analisados 24 h após a infecção, assim como o perfil de produção de citocinas e a sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas.

Foi observado que a infecção por BCG e neutrófilos apoptóticos induziram aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE<sub>2</sub> por macrófagos. De forma interessante, ASA, NS-398 e C75 modularam negativamente a formação de corpúsculos lipídicos e a formação PGE<sub>2</sub> induzida pelo BCG. Além disso, estes tratamentos aumentaram os níveis de TNF-α e reduziram a produção de IL-10, mostrando ainda redução na sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas avaliadas pela contagem de unidades formadoras de colônias.

Como conclusão, corpúsculos lipídicos induzidos por BCG em macrófagos funcionam como plataformas de sinalizações intracelulares de produção de mediadores inflamatórios. Eles estão envolvidos na capacidade de leucócitos ativados em gerar um aumento dos níveis de PGE<sub>2</sub> durante a infecção experimental por BCG, estando implicada na replicação e sobrevivência micobacteriana. Estes resultados incluem os corpúsculos lipídicos como alvos para futuras intervenções terapêuticas no sentido de influenciar o balanço das interações entre patógeno e hospedeiro.

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafael Marques Cardoso

Lipid bodies are cytoplasmic organelles that increase in size and number in leukocytes involved in inflammatory, infectious and neoplastic processes *in vivo* e *in vitro*, including mycobacterial infections. Their morphology, protein and lipid constituents and ability to interact with other organelles may vary according with cell type and specific biogenesis pathways stimulated. They show diverse protein and lipid constitution, including small GTPases, Rab proteins and protein kinases, indicating participation of these organelles in intracellular signaling, cell to cell communication and lipid metabolism. They also compartmentalize enzymes and molecules related to eicosanoid production and act as sites for cytokine storage in inflammatory leukocytes, suggesting that lipid bodies function as inducible organized intracellular platforms for lipid mediators and cytokine production and/or secretion in response to inflammatory conditions, including infection by intracellular pathogens. Recent data from our group indicate important participation of this organelle in the synthesis of prostaglandin E<sub>2</sub>, a well-known deactivator of cytotoxic response against intracellular pathogens, allowing mycobacterial survival and down-regulation of macrophage function. Infection by pathogenic mycobacteria induces lipid body formation in a dose and time dependent manner and mycobacterial infection also induces neutrophil apoptosis at site of infection. These apoptotic cells have shown a role in immune response modulation to intracellular pathogens. In this study, we investigated the involvement and function of lipid-laden macrophages in a murine model of tuberculosis and its relationship with pathogen survival and/or multiplication.

For this purpose, peritoneal macrophages from C57BL/6 mice were infected *in vitro* with *M. bovis* BCG in presence or absence of neutrophil apoptotic cells and treated with acetylsalicylic acid (ASA, 5 µM), NS-398 (1 µM) (COX inhibitors) or C75 (5 µg/mL) (fatty acid synthase inhibitor). Lipid body numbers and PGE<sub>2</sub> production were analyzed 24 h after infection, as well as cytokine production profile and mycobacterial survival and/or multiplication.

We observed that BCG infection and apoptotic neutrophils induced significant increase in lipid body number and PGE<sub>2</sub> synthesis by macrophages. Interestingly, ASA, NS-398 (COX inhibitors) and C75 (fatty acid synthase inhibitor) down-regulated lipid body formation and PGE<sub>2</sub> synthesis induced by BCG. These treatments were also able to enhance TNF-α and inhibit the IL-10 production and are related to down-modulation of mycobacterial survival and growth assessed by colony-forming units count.

As conclusion, BCG-induced lipid bodies function as intracellular signaling platforms in inflammatory mediator production. They are involved in the capacity of activated leukocytes to generate increased amounts of PGE<sub>2</sub> during experimental infection by BCG, being implicated in mycobacterial survival and replication. These results include lipid bodies as future targets for therapeutic interventions in order to influence pathogen-host interactions.

## Lista de Abreviaturas:

ADRP	Proteína relacionada à diferenciação de adipócitos - do inglês adipocyte differentiation-related protein
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida - do inglês acquired immunodeficiency syndrome
ATP	Trifosfato de adenosina - do inglês adenosine triphosphate
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
CCL	Quimiocina CC
CD	Grupo de diferenciação - do inglês cluster of differentiation
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor de complemento - do inglês complement receptor
CXCL	Quimiocina CXC
DC-SIGN	Molécula de adesão intercelular específica de célula dendrítica - do inglês - dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin
DNA	Ácido desoxirribonucleico - do inglês desoxyribonucleic acid
EEA1	Antígeno de endossomo precoce 1 - do inglês early endosome antigen 1
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular - do inglês extracellular signal-regulated kinase
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos - do inglês fibroblast growth factor
G-CSF	Fator de crescimento de colônias para granulócitos - do inglês granulocyte colony growth factor
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias para granulócitos / monócitos - do inglês granulocyte / monocyte colony growth factor
GTP	Trifosfato de guanosina - do inglês guanosin triphosphate
HETE	Ácido 5-(S)-hidroxi-eicosatetraenoico - do inglês 5-(S)-hydroxieicosatetraenoic acid
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida - do inglês human immunodeficiency virus
IFN- $\gamma$	Interferon do tipo $\gamma$
IL	Interleucina
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
KDa	Quilodaltons - do inglês kilodaltons
LAM	Lipoarabinomanana
LAMP	Proteína de membrana associada ao lisossomo - do inglês lysosomal associated membrane protein
LDL	Lipoproteína de baixa densidade - do inglês low density lipoprotein
LO	Lipoxigenase
Lpr	Lipoproteína
LPS	Lipopolissacarídeo

LT(C <sub>4</sub> )	Leucotrieno (C <sub>4</sub> )
MAP	Proteína-quinases ativadas por mitógenos - do inglês mitogen-activated protein kinases
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade - do inglês major histocompatibility complex
MOI	Multiplicidade de infecção – do inglês multiplicity of infection
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-κB	Factor nuclear κB - do inglês nuclear factor κB
PAF	Fator de ativação de plaquetas - do inglês platelet activating factor
PAT	Família composta por perilipina, ADRP e TIP47
PG(E <sub>2</sub> )	Prostaglandina (E <sub>2</sub> )
pH	Potencial hidrogeníon
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase - do inglês phosphoinositide-3 kinase
PIM	Fosfatidilinositol manosídeo - do inglês phosphatidylinositol mannoside
PIP3	Fosfatidilinositol 3-fosfato - do inglês phosphatidyl inositol 3-phosphate
PK(C)	Proteína-quinase (C) - do inglês protein kinase (C)
PPAR	Receptores ativados de proliferação de peroxissomos - do inglês peroxisome proliferator-activated receptors
RANTES	Reguladas sob ativação, normalmente expressa e secretada por células T – do inglês regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted
TCR	Receptor da célula T – do inglês T cell receptor
TGF-β	Fator de crescimento tumoral do tipo β – do inglês tumoral growth factor β
TIP47	Proteína de interação de porção terminal de 47 quilodaltons - do inglês Tail interacting protein 47 KDa
TIR	Receptor ou domínio Toll/Interleucina-1 – do inglês Toll/Interleukin-1 Receptor
TLR	Receptores semelhantes a Toll - do inglês Toll-like receptors
TNFR	Receptor de fator de necrose tumoral – do inglês tumoral necrosis factor receptor
TNF-α	Fator de necrose tumoral do tipo α – do inglês tumoral necrosis factor α
TRAM	Molécula adaptadora relacionada a TRIF – do inglês TRIF-related adaptor molecule
TRIF	Domínio TIR contendo adaptador indutor de interferon do tipo β – do inglês TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
UFC	Unidade formadora de colônias
UV	Ultra-violeta
WHO	Organização Mundial da Saúde – do inglês World Health Organization

## **1) Introdução**

### **1.1) Tuberculose**

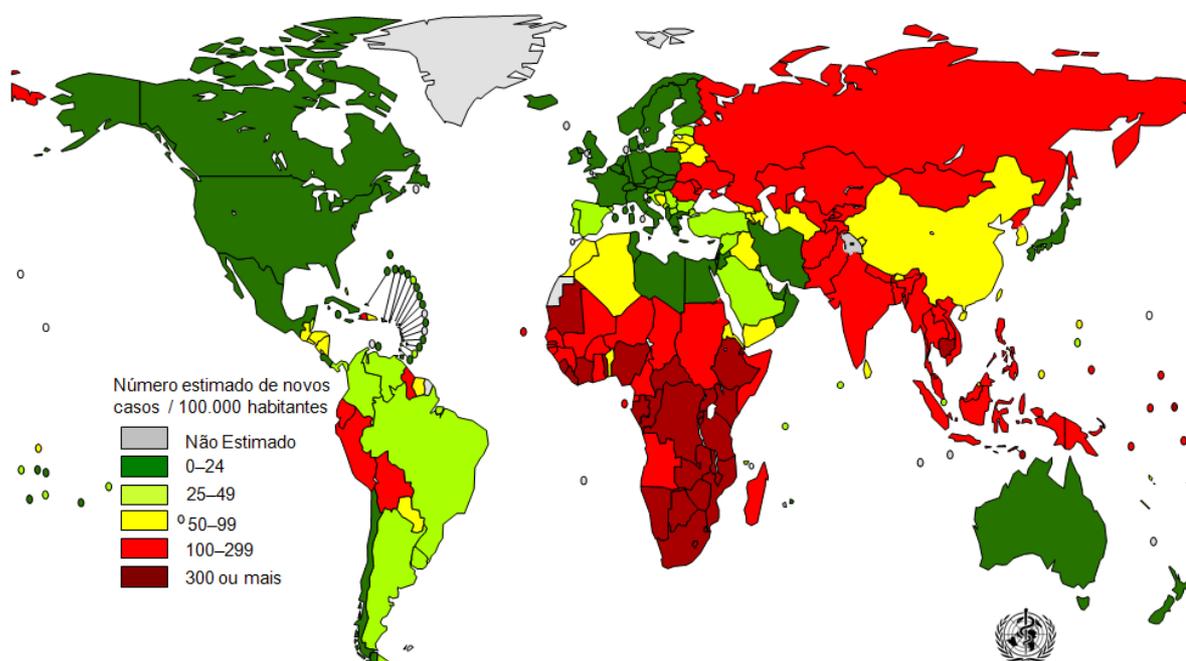
#### **1.1.1) Aspectos Históricos**

A tuberculose acompanha a espécie humana desde tempos remotos. A primeira detecção inequívoca da presença do principal agente etiológico da tuberculose, o *Mycobacterium tuberculosis*, ocorreu nos restos mortais de um bisão de aproximadamente 17.000 anos (Rothschild e cols., 2001). Exames em esqueletos pré-históricos constataam a ocorrência de tuberculose em humanos 4.000 anos antes de Cristo e sinais em múmias no período de 2.400 a 3.000 anos antes de Cristo (Zink e cols., 2003). Hipócrates, por volta do ano de 460 antes de Cristo, descreveu a ocorrência de uma doença de grande transmissibilidade, com sinais e sintomas característicos de febre, tosse com projeções sanguíneas e elevados índices de letalidade, a tuberculose, descrita na época como fitíase. Konomi e cols. (2002) descreveram a presença de DNA micobacteriano em múmias andinas, sugerindo a presença de tuberculose na América do Sul por volta de 2.000 anos atrás, sendo a primeira evidência significativa no período de 160 antes de Cristo (Allison & Pezia, 1973), seguida de outros achados por demais pesquisadores (Salo e cols., 1994; Arriaza e cols., 1995).

#### **1.1.2) Caracterização Epidemiológica**

A tuberculose é um agravo da saúde de distribuição cosmopolita, contando com aproximadamente dois bilhões de indivíduos infectados no mundo atualmente, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (Who, Global Tuberculosis Control Report, 2008). A mesma publicação remete aos 9,2 milhões de novos casos no ano de 2006, sendo 709 mil casos em pacientes portadores do vírus HIV, sendo a tuberculose a maior causa de morte nestes pacientes. Cabe ainda observar que esta doença causou 1,7 milhões de óbitos no ano de 2006, número tão alarmante quanto 4.500 mortes diárias decorrentes desta patologia, representando 7% dos óbitos e 26% das mortes evitáveis em adultos nos países em desenvolvimento (Murray & Salomon, 1998). Apesar de ter sido observada redução na incidência desta doença, quarenta por cento dos casos ainda não são corretamente

diagnosticados e tratados. Além disso, o surgimento de cepas resistentes a múltiplas drogas e o aumento significativo da co-infecção tuberculose-HIV têm possibilitado o recrudescimento desta doença. O Brasil ocupa a 15ª colocação na classificação dos 22 países com maiores índices de incidência de tuberculose no mundo, com 50 casos por 100.000 habitantes (WHO, 2008). Cabe ainda ressaltar que a tuberculose é uma doença que além de remeter a graves indicadores de morbi-mortalidade, é um agravo econômico-social, já que a faixa etária mais afetada está entre 20 e 59 anos, que representa maior parte da população economicamente ativa (SINAN / MS - sistema nacional de agravos de notificação do ministério da saúde do Brasil). A figura 01 mostra um diagrama da distribuição mundial de tuberculose, sendo o sudeste africano e norte asiático as áreas com maior incidência desta doença.



**Fig. 01 Painel de distribuição de novos casos de tuberculose no mundo no ano de 2006** (Figura adaptada de “WHO Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing: WHO report 2008”. World Health Organization WHO/HTM/TB/2008.393)

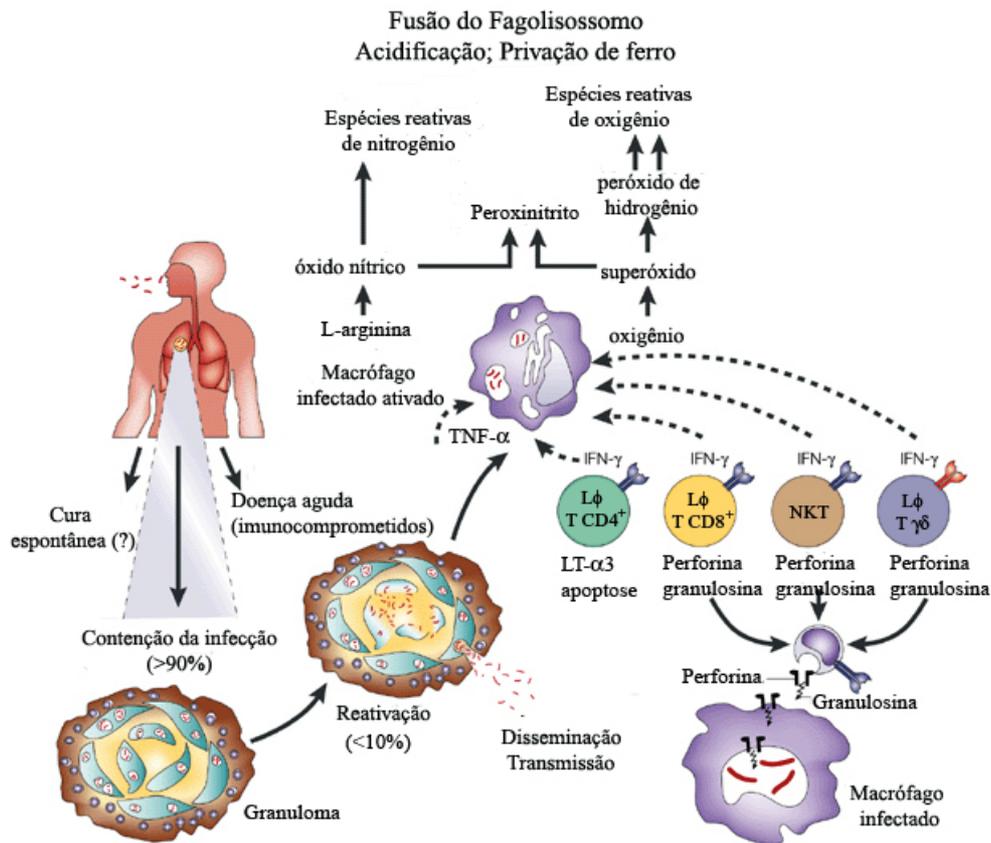
A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa cujo principal agente etiológico em humanos é o *Mycobacterium tuberculosis*, um bacilo aeróbio estrito de crescimento lento, intracelular facultativo e imóvel. O gênero *Mycobacterium* compreende em sua maioria microorganismo saprófitas que habitam o solo, tendo somente alguns deles desenvolvido habilidade de estabelecer interações patogênicas. Embora somente alguns membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* sejam capazes de ocasionar doença em adultos, outras micobactérias são capazes de fazê-lo, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos.

A única vacina disponível para a tuberculose é o BCG (Bacille-Calmette-Guérin) obtido a partir de cepa virulenta do *M. bovis* após repicagens sucessivas. Esta vacina apresenta grande eficácia na prevenção das formas mais graves da doença na infância, a miliar e meningo-encefálica, apesar de sua baixa e variável proteção em adultos (Fine, 1995), além de apresentar problemas para administração a indivíduos imunocomprometidos por se tratar de uma vacina viva. A ausência de vacina eficaz para adultos e o abandono de tratamento, com conseqüente aumento nos índices de resistência a múltiplas drogas, associados à epidemia da AIDS, proporcionou um ambiente favorável ao aumento do número de casos e mortes provocados por esta doença nas últimas décadas do século XX.

### **1.1.3) Fisiopatologia da Infecção e Resposta Imune na Tuberculose**

A instalação do processo infeccioso na tuberculose tem início na inalação de perdigotos e aerossóis contendo bacilos viáveis, que são carreados até os alvéolos pulmonares, onde as micobactérias são reconhecidas por receptores na superfície celular e endocitados por macrófagos alveolares residentes, células dendríticas e por monócitos recrutados ao local primário de infecção.

A infecção primária pelo *M. tuberculosis* apresenta três possibilidades clínicas distintas. Em alguns indivíduos, a resposta imune é capaz de debelar os agentes infecciosos adquiridos pela via respiratória, embora a causa e freqüência desta cura espontânea ainda não sejam elucidadas. Na grande maioria dos casos, uma combinação da resposta inata e adaptativa, com participação de citocinas Th1, confere imunidade protetora, estabelecendo um equilíbrio dinâmico entre a resposta imune e a sobrevivência e multiplicação micobacterianas. Este estado de infecção latente pode ser reativado mediante decréscimos transitórios no status imunológico dos indivíduos ou ainda por patologias que comprometam as respostas do sistema imune, incluindo AIDS, alguns tipos de câncer e doenças auto-imunes. Em uma parcela reduzida dos indivíduos primariamente infectados há desenvolvimento de tuberculose primária e estabelecimento do quadro clínico da doença (Bhatt & Salgame, 2007; Kaufmann, 2004). A rota de infecção do *M. tuberculosis* está ilustrada na figura 02, com as respectivas possibilidades clínicas e principais células envolvidas na resposta imune para este patógeno.



**Fig. 02 Possibilidades clínicas na infecção tuberculosa.** Um pequeno número de indivíduos apresenta cura espontânea após contato inicial com o agente etiológico da tuberculose humana (motivo desta cura ainda não está esclarecido). Em indivíduos imunocomprometidos, pode ser observado desenvolvimento da doença imediatamente após a infecção aguda. Na grande maioria dos casos (>90%), há contenção da infecção inicial e a doença se manifesta após período de tempo variável resultante de reativação. No sítio de infecção, a formação do granuloma é uma observação da patobiologia da tuberculose, onde há participação principalmente de macrófagos, células dendríticas e linfócitos T. A produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  participa de forma decisiva na ativação dos macrófagos, maturação fagossomal e produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. (Figura adaptada de Kaufmann e cols., 2001).

Macrófagos representam uma das primeiras linhas de defesa contra patógenos invasores, cuja função envolve internalização destes agentes e confinamento no ambiente fagossomal com conseqüente acidificação e atividade hidrolítica, culminando na eliminação do patógeno. Apesar da descrição simplista, macrófagos possuem uma série de moléculas envolvidas no reconhecimento, endocitose e eventos subseqüentes que determinam o desfecho da interação patógeno-hospedeiro (Bhatt & Salgame, 2007).

O processo de fagocitose do *M. tuberculosis* por macrófagos alveolares é mediado por diversos receptores de superfície, incluindo o receptor de complemento 3 (CR3), considerado o principal receptor que medeia internalização desta bactéria (Schelesinger e cols, 1990), bem como CR1, CR4, receptores de manose, CD14 e receptores "scavenger" (Ernst, 1998). Além destes elementos inerentes ao sistema imune, outros componentes, como a proteína surfactante pulmonar e a distribuição

diferenciada de colesterol nas regiões de entrada do *M. tuberculosis* potencializam o processo fagocítico (Beharka e cols., 2002; Gaynor e cols., 1995; Gatfield e cols., 2000).

Além das moléculas descritas acima, os receptores semelhantes a Toll (do inglês *Toll-like Receptors* - TLR) estão relacionados ao reconhecimento de padrões moleculares existentes em patógenos e participam de processos de fagocitose e ativação celular (Medzhitov & Janeway, 2000; Takeda, Kaisho & Akira, 2003). Estes receptores exercem importante ligação entre a resposta inata e subsequente ativação do sistema imune adaptativo frente aos processos infecciosos. Foram descritos 13 receptores TLR em mamíferos, recebendo designação de TLR1 até TLR13. Estes receptores apresentam domínio extracelular com fragmentos ricos em leucina, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático Toll/IL-1 (TIR). Este último é capaz de realizar interações com proteínas adaptadoras, dando início a cascatas de sinalizações intracelulares que ativam vias, como a do NF- $\kappa$ B e produção de citocinas e quimiocinas (Aderem & Ulevitch, 2000), participando de forma decisiva no estabelecimento do elo entre a resposta imune inata e adaptativa.

Os receptores Toll-like participam dos eventos primários de interação entre o *M. tuberculosis* e a célula hospedeira. Nas infecções micobacterianas, o TLR2 exerce papel de destaque, uma vez que vários componentes deste patógeno são capazes de atividade agonista sobre este receptor. Dentre eles, estão a lipoproteína de 19 KDa, cuja secreção pela micobactéria induz produção de TNF- $\alpha$  e óxido nítrico por macrófagos murinos e humanos, e de IL-12 por monócitos (Brightbill e cols., 1999) e outras lipoproteínas, como LprA e LprG (Pecora e cols., 2006; Gehring e cols., 2004). Além destes, lipomananos e fosfatidilinositol manosídeo (PIM) são capazes de promover ativação celular mediante reconhecimento por este mesmo receptor (Quesnioux e cols., 2004; Gilleron e cols., 1997, 2006; Jones e cols., 2001). PIM ainda é capaz de interação com receptores TLR4, com translocação de NF- $\kappa$ B (Abel e cols., 2002), mostrando a capacidade degenerada de reconhecimento de uma mesma molécula por diferentes receptores desta família.

Os TLR participam ainda dos processos de maturação fagossomal. Animais geneticamente deficientes de receptores TLR, especialmente TLR2, ou de moléculas adaptadoras destes receptores, apresentam atraso na maturação fagossomal (Blander e cols., 2004, 2006). De forma aditiva, camundongos geneticamente deficientes do fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), uma molécula adaptadora de TLR, são extremamente susceptíveis às infecções por *M. tuberculosis* (Scanga e

cols., 2004; Fremond e cols., 2004). Nestes animais foi observada produção reduzida de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12, menor expressão de óxido nítrico sintase induzível e aumento na carga bacteriana (Scanga e cols., 2004; Fremond e cols., 2004). O índice de mortalidade de camundongos geneticamente deficientes de MyD88, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  é comparável, mostrando a participação conjunta destes componentes da resposta imune na infecção por *M. tuberculosis* (Scanga e cols., 2004; Cooper e cols., 1993; Flynn e cols., 1993).

De forma controversa, foi descrito que, na ausência de sinalização via TLR2, a produção de IL-10 por macrófagos e células dendríticas em resposta à infecção pelo *M. tuberculosis* é completamente suprimida (Jang e cols., 2004). Cabe ainda salientar que camundongos geneticamente deficientes de TLR2 são acometidos de maior grau de imunopatologia (Reiling e cols., 2002; Sugawara e cols., 2003) e apresentam maiores índices de letalidade decorrentes de resposta inflamatória exagerada (Drennan e cols., 2004). A sinalização via TLR2 pela lipoproteína de 19 KDa é capaz ainda de promover redução da capacidade de apresentação antigênica por macrófagos via MHC de classe II (Noss e cols., 2001) e responsividade destas células ao IFN- $\gamma$  (Fortune e cols., 2004). Estas observações experimentais sugerem que esta resposta antagônica aos efeitos pró-inflamatórios relacionados à infecção por *M. tuberculosis* poderia representar um mecanismo de controle de possíveis lesões teciduais promovidas por resposta imunes exacerbadas ou ainda de mecanismos de manipulação da resposta imune do hospedeiro pela micobactéria.

No sítio das infecções tuberculosas ocorre a formação de um importante marcador imunopatológico na resposta imune do hospedeiro, o granuloma. Estudo de modelos experimentais mostrou que esta estrutura é formada por macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e fibroblastos (Co e cols., 2004). Esta estrutura, uma vez formada, limita a dispersão do patógeno, cria um ambiente de restrição aeróbia e reduz a área inflamatória, restringindo as possíveis lesões teciduais, especialmente pulmonares. As células que compõem o granuloma estabelecem interações através de receptores de superfície e secreção de citocinas e quimiocinas, com decorrentes processos de ativação celular e desencadeamento dos mecanismos microbicidas necessários à contenção da infecção pelo agente etiológico da tuberculose. Neste ambiente, os macrófagos, ativados por fatores de crescimento, moléculas estimulatórias dos TLR, assim como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Shi e cols., 1996; Chitu e cols., 2006; Twigg e cols., 2004) elevam a expressão de moléculas de MHC de classe II na superfície e a capacidade de apresentação

antigênica. Além disso, ocorre aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (MacMicking e cols., 1997; Nathan e cols., 2002) e componentes do complexo oxidativo de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Forman & Torres, 2002), que participam do processo de geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio envolvidos na erradicação de patógenos no compartimento fagossomal. A ativação das células presentes no sítio inflamatório promove a produção de citocinas e quimiocinas que regulam a formação do processo granulomatoso, sendo integrantes fundamentais na condução do estabelecimento da resposta imune adaptativa ao *M. tuberculosis*.

A aquisição de imunidade protetora na tuberculose requer a participação de células linfóides, estando os linfócitos T CD4<sup>+</sup> diretamente implicados nos mecanismos de proteção em camundongos (Orme & Roberts, 1998). O processo de ativação de linfócitos T por antígenos micobacterianos ocorre nos linfonodos proximais drenantes e está relacionada à atividade de células dendríticas. Estas células capturam antígenos e os levam aos linfonodos onde irão expressar uma série de moléculas relacionadas ao processo de apresentação antigênica, como MHC de classe I e II, além de moléculas co-estimulatórias, como CD80 e CD86 (Mellman & Steinman, 2001), e ainda citocinas, como IL-12, IL-18 e IL-23. Os complexos formados por peptídeos e MHC da superfície de células dendríticas são reconhecidos por células T não-primadas com TCR específico, resultando na formação de uma sinapse imunológica que, com auxílio das moléculas co-estimulatórias citadas acima, resulta na ativação e proliferação clonal destas células T responsivas aos antígenos apresentados. Foi demonstrado que o *M. tuberculosis* ganha acesso às células dendríticas após ligação específica ao receptor DC-SIGN (do inglês – *dendritic cell specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*), sendo a lipoarabinomanano o principal ligante deste receptor, ao passo que CR3 e o receptor de manose, que são os principais receptores para *M. tuberculosis* em macrófagos, aparentemente exercem papel secundário ou nulo na interação entre micobactérias e células dendríticas (Tailleux e cols., 2003).

Guiadas por gradientes de agentes quimioatrativos, as células T migram ao local da infecção, reconhecem peptídeos na superfície de macrófagos infectados e promovem ativação destes, aumentando a capacidade dos macrófagos em exercer suas atividades microbicidas. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos para determinantes antigênicos de *M. tuberculosis* produzem primariamente citocinas Th1, incluindo IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ , que são críticas no processo de eliminação do patógeno (Zhang e

cols., 1994; Giacomini e cols., 2001; Hickman e cols., 2002; Verreck e cols., 2004). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são também aptos à secreção destas citocinas, mas sua principal ação no controle da tuberculose está relacionada à sua função citotóxica, promovendo a morte celular dos macrófagos infectados por micobactérias pela ação de perforina e granzimas, que geram zonas de continuidade através da membrana citoplasmática, e granzosina, que entra nos macrófagos e induz efeitos tóxicos sobre as micobactérias endocitadas (Kaufmann e cols., 1995; Munk & Emoto, 1995; Rivas-Santiago e cols., 2005).

A participação de citocinas na resposta imune é decisiva na construção de imunidade protetora na tuberculose. Em modelos murinos desta doença, foi demonstrada a participação de IL-12 na condução de respostas Th1 e o IFN- $\gamma$ , como citocina efetora dos mecanismos microbicidas. Camundongos deficientes do componente p40 de IL-12 ou de IFN- $\gamma$  apresentam maior susceptibilidade ao adoecimento. De forma aditiva, a suplementação de IL-12 em camundongos Balb/c, relativamente susceptíveis a esta patologia, promoveu redução na carga bacteriana e diminuição da progressão da doença pulmonar (Flynn e cols., 1995), embora o mesmo efeito não tenha sido observado em camundongos geneticamente deficientes de IFN- $\gamma$  (Castro e cols., 1995).

Outro componente-chave na resposta às infecções micobacterianas é o TNF- $\alpha$ , produzido por células dendríticas, linfócitos T CD4<sup>+</sup> e macrófagos. Em macrófagos, junto com IFN- $\gamma$ , induz produção de intermediários reativos de nitrogênio e morte micobacteriana (Flynn & Chan, 2001; Chan e cols., 1992). Esta citocina está relacionada com a indução de apoptose em macrófagos alveolares infectados por *M. tuberculosis*, sendo importante para eliminação do microambiente de sobrevivência micobacteriana, além da possível relação desta função com a apresentação cruzada de antígenos micobacterianos a linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Keane e cols., 1997; Winau e cols., 2006). Balcewicz-Sablinska e cols. (1998) demonstraram a capacidade da forma virulenta de *M. tuberculosis* (H37Rv) de liberar TNFR2 solúvel e assim reduzir a atividade pró-inflamatória desempenhada por TNF- $\alpha$ , evento não observado para a forma avirulenta H37Ra. Esta citocina participa ainda da construção arquitetada dos granulomas observados nos sítios inflamatórios tuberculosos, uma vez que em camundongos infectados por BCG ou *M. tuberculosis*, a neutralização por anticorpos anti-TNF- $\alpha$  gerou aumento de susceptibilidade e formação de granulomas desordenados (Kindler e cols., 1989), efeito observado também em animais geneticamente deficientes do receptor de

TNF- $\alpha$  (Flynn e cols., 1995). Nestes últimos, foi constatada menor expressão de quimiocinas nos granulomas pulmonares e menor recrutamento de células T para o sítio de infecção, resultando em falha na indução de proteção (Roach e cols., 2002; Algood e cols., 2003, 2005). Esta capacidade de regulação de produção de quimiocinas pelo TNF- $\alpha$  foi observada para CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 e CXCL13 em macrófagos (Algood e cols., 2003; Peters & Ernst, 2003; Tessier e cols., 1997). Estas participam ativamente de processos de recrutamento, maturação celular, produção de citocinas, organização da arquitetura do granuloma tuberculoso (Peters e cols., 2001, Seiler e cols., 2003). Além de sua participação nas fases iniciais da infecção por *M. tuberculosis*, a utilização de anticorpos neutralizantes anti-TNF- $\alpha$  promoveu aumento na carga bacteriana pulmonar e na expressão de IL-10 e redução na expressão da enzima óxido nítrico sintase nas fases latente e crônica (Tufariello e cols., 2003; Mohan e cols., 2001). Estes dados corroboram a constatação de que o tratamento de indivíduos com artrite reumatóide com anticorpos anti-TNF- $\alpha$  teve como resultado reativação de tuberculose latente nos pacientes infectados (Gardam e cols., 2003; Peters & Ernst, 2003), reforçando o papel desta citocina no controle da tuberculose.

Outra citocina que participa ativamente do controle da multiplicação micobacteriana em macrófagos é o IFN- $\gamma$ . Esta citocina, juntamente com TNF- $\alpha$ , induz aumento da expressão de óxido nítrico sintase e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que resultam na morte micobacteriana (Flynn & Chan, 2003). Em pacientes com mutações no receptor de IFN- $\gamma$ , foi observada maior susceptibilidade a esta infecção (Rosenzweig & Holland, 2005). O IFN- $\gamma$  teria ainda outro papel importante sobre a capacidade de apresentação antigênica. O processo de acidificação fagossomal representa um componente essencial na eliminação de patógenos fagocitados e na apresentação antigênica. Todavia, o processo proteolítico extremo poderia ser prejudicial à geração de epítomos para apresentação via MHC de classe II (Delamarre e cols., 2005, 2006). A ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  seria importante na apresentação antigênica por regular positivamente a expressão de moléculas de MHC de classe II, além de exercer papel de ajuste fino no processo de proteólise e geração de epítomos.

Nas infecções por *M. tuberculosis* é necessário um ajuste fino na resposta imune na infecção que evite tanto a multiplicação e a disseminação bacterianas, como uma resposta exacerbada que possa ocasionar destruição tecidual e comprometimento de função orgânica. Em resposta a esta infecção, macrófagos e

células dendríticas produzem IL-10 e IL-12 (Hickman e cols., 2002; Jang e cols., 2004). Esta produção de citocinas com ações antagônicas é também observada no sítio da infecção por *M. tuberculosis*, onde são encontrados linfócitos T expressando IFN- $\gamma$  e IL-10 (Gerosa e cols., 1999). A IL-10 está relacionada a efeitos imunossupressores da resposta imune na tuberculose e sua produção por células T reguladoras está relacionada ao aumento de susceptibilidade a esta infecção (Sullivan e cols., 2005). Esta citocina modula negativamente a produção de IL-12 por monócitos infectados *in vitro* (Fulton e cols., 1998), reduz a expressão de moléculas coestimulatórias em macrófagos e minimiza a capacidade de resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (De La Barrera e cols., 2004), além de reduzir a proliferação de células T produtoras de IFN- $\gamma$ , função compartilhada com o TGF- $\beta$  (Rojas e cols., 1999). Em animais transgênicos que superexpressam IL-10, foi observada reativação da doença crônica, com redução na capacidade micobactericida em macrófagos (Turner e cols., 2002; Feng e cols., 2002).

As descrições da produção de citocinas que possuem ações antagônicas na resposta imune frente às infecções micobacterianas no mesmo microambiente inflamatório sugere que o balanço entre citocinas pró- e antiinflamatórias determina o equilíbrio cujos extremos são a proliferação micobacteriana descontrolada e instalação da doença ou resposta imune exacerbada com danos teciduais importantes.

#### **1.1.4) Mecanismos de Evasão da Resposta Imune e Sobrevivência**

A resposta imune inata representa um mecanismo inicial de reconhecimento de patógenos e envolve participação de vários subtipos celulares, exercendo papel importante no acesso para a resposta imune adaptativa frente a condições potencialmente deletérias. Apesar de todos os elegantes mecanismos desenvolvidos pelo sistema imune para bloquear invasão por patógenos, estes também lograram êxito em projetar diferentes vias de escape ao maquinário letal do sistema imune e assim, sobreviver e proliferar no hospedeiro.

Patógenos intracelulares desenvolveram mecanismos de adaptação biológica no sentido de manipular eventos celulares regidos pelo sistema imune e assim viabilizar sua sobrevivência e proliferação no ambiente celular. Entre os mecanismos gerais descritos, estão o escape do fagossomo para o ambiente citoplasmático (Finlay & Falkow, 1997), o bloqueio da maturação do fagossomo (Joiner e cols.,

1990; Hackstadt e cols., 1995), a capacidade de resistir em compartimentos moderadamente acidificados (Barnewall e cols., 1997) ou no fagolisossomo (Baca e cols., 1994; Mosser & Rosental, 1993).

O *M. tuberculosis*, além do *M. bovis* e *M. avium*, são patógenos intracelulares facultativos, aeróbios estritos cujo ambiente de sobrevivência e multiplicação é o interior de fagócitos mononucleares, particularmente macrófagos do hospedeiro. Uma das características principais da infecção micobacteriana que é essencial para o desfecho da interação patógeno-hospedeiro é sua habilidade de sobreviver e multiplicar no interior destas células, dada em parte pela habilidade de micobactérias patogênicas em burlar o mecanismo de maturação fagossomal. Os mecanismos que viabilizam esta sobrevivência são extremamente complexos e diversos grupos de pesquisa concentram seus esforços em determinar quais fatores e moléculas estão envolvidos na sobrevivência no ambiente intracelular por estes patógenos (Russell, 2001; Russell e cols., 1996; Colston, 1996).

O fagossomo micobacteriano tem sua maturação bloqueada, apresentando características de fagossomos recém formados pós-internalização (Deretic e cols., 2006; Vergne e cols., 2004; Russell e cols., 2003). É caracterizado pelo pH sustentadamente elevado, em torno de 6,4 pela exclusão de ATPases vacuolares (Pethe e cols., 2004; Sturgill-Koszycki e cols., 1994), manutenção de moléculas características do estágio inicial de maturação, como Rab5, transferrina e receptor de transferrina e ausência de marcadores de endossomos tardios e lisossomos, como Rab7 e LAMP1 (Sturgill-Koszycki e cols., 1994; Chua e cols., 2004; Via e cols., 1997; Clemens e cols., 2000).

Apesar dos mecanismos de progressão e maturação serem inibidos, os fagossomos micobacterianos são dinamicamente ativos, sendo acessíveis aos endossomos da via endocítica (Russell e cols., 1996) e ao tráfego de receptores de transferrina. Este último representa um evento favorável à micobactéria, uma vez que o ferro, apesar de sua limitada disponibilidade intracelular, é um componente essencial para o crescimento deste patógeno, sendo obtido a partir do ferro ligado à transferrina (Clemens & Horwitz, 1996; Sturgill-Koszycki e cols., 1996; Schaible & Kaufmann, 2004; Wagner e cols., 2005).

Diversos componentes micobacterianos foram descritos como responsáveis pelo processo de bloqueio da maturação fagossomal, dentre eles o lipoarabinomanano (Fratti e cols., 2003; Hmama e cols., 2004; Vergne e cols., 2003), o dimicolato de trealose (Indrigo e cols., 2003), sulfolípidos (Goren e cols., 1976), a

fosfatase ácida secretada M (Vergne e cols., 2005) e uma serino-treonina quinase, PknG (Cowley e cols., 2004).

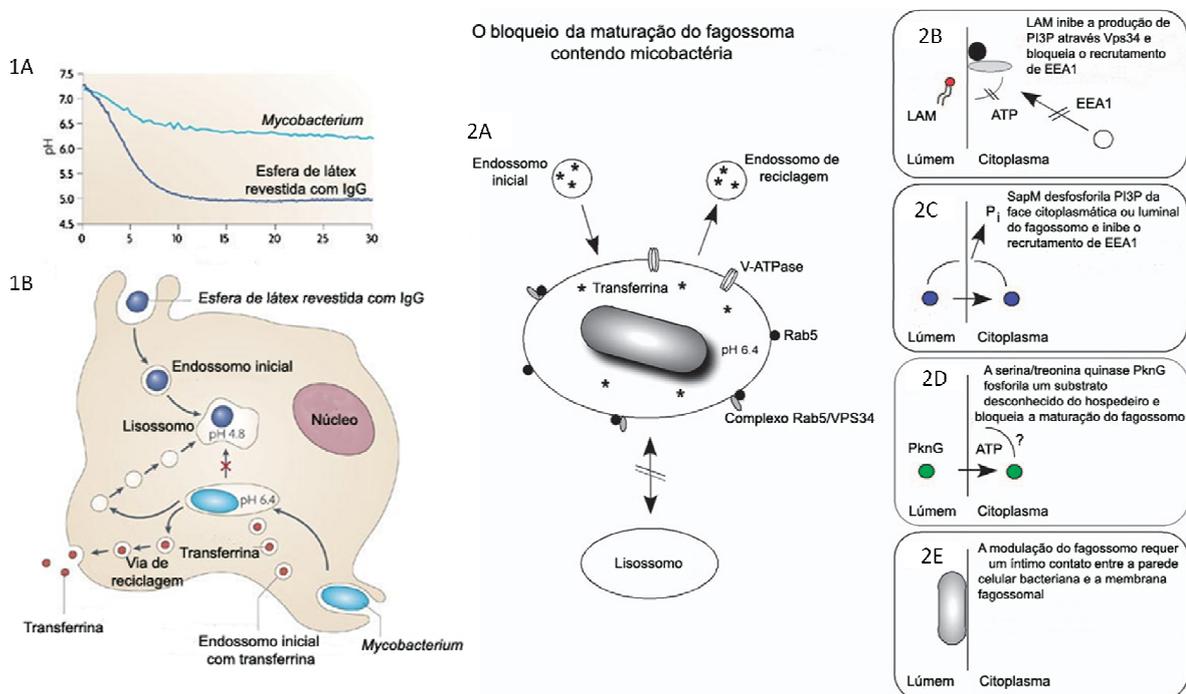
A participação de lipídeos no processo de bloqueio de maturação fagossomal torna-se clara pela observação que micobactérias delipidadas perdem essa capacidade, sustentando o envolvimento destas moléculas no processo (Indrigo e cols., 2003), possivelmente pela similaridade físico-química destas moléculas com o fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) e por competir com lipídeos da membrana fagossomal pela ligação do antígeno de endossomo precoce-1 (EEA1) (Fratti e cols., 2003; Vergne e cols., 2003, 2004).

O lipoglicano (lipoarabinomanano) manosilado (ManLAM) da parede celular *M. tuberculosis* é um importante componente de virulência deste patógeno, destacando-se como molécula mediadora da capacidade de inibição da formação de fagossomos maduros. O ManLAM está relacionado, em macrófagos murinos e células de linhagem monocítica humana (Chua e cols., 2004; Hmama e cols., 2004), ao bloqueio do aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, impedindo as interações entre fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), hVPS34 (fosfatidilinositol 3-quinase da classe III), e calmodulina. Esta etapa é necessária na síntese de PI3P que está envolvido no recrutamento e manutenção de EEA-1 para o fagossomo. Este último é necessário para o envio de componente lisossomais da rede trans-Golgi para o fagossomo, além de participar do processo de fusão vesicular (Fratti e cols., 2003). Desta forma, um mecanismo que impede o recrutamento e manutenção de PI3P na membrana do fagossomo pode ser decisivo no processo de maturação (Vergne e cols., 2005; Kelley & Schorey, 2004; Purdy e cols., 2005). Foi demonstrado ainda que a interação de glicolipídeos manosilados da superfície micobacteriana, como LAM e PIM, com receptores de manose direciona o patógeno para endossomos primários que são ineficazes em avançar no processo de maturação (Kang e cols., 2005).

O dimicolato de trealose, componente de virulência micobacteriana, apresenta capacidade de modular eventos de fusão de vesículas, uma vez que fagossomos que contém partículas de látex revestidas com esta molécula não executaram os procesos de fusão e acidificação (Axelrod e cols., 2008; Indrigo e cols., 2003), efeitos que podem ser revertidos pela ativação de macrófagos por IFN- $\gamma$  ou LPS, envolvendo a enzima óxido nítrico sintase e intermediários reativos de nitrogênio (Axelrod e cols., 2008).

Além destas moléculas, outros mecanismos, como o tamponamento do pH fagossomal por amônia derivada da micobactéria (Gordon e cols., 1980) e a

clivagem de PI3P da membrana fagossomal pela ação de fosfatase lipídica micobacteriana SapM (Vergne e cols., 2005) tomam parte da inibição da conversão do vacúolo parasitóforo em um ambiente ácido e hidrolítico. Outro mecanismo envolve a capacidade da micobactéria de inibir a atividade da esfingosina-quinase e subsequentemente da sinalização mediada por  $Ca^{2+}$ , bloqueando a via da calmodulina, hVPS34 e EEA-1, todos relacionados ao processo de maturação fagossomal (Kusner e cols., 2005; Thompson e cols., 2005; Malik e cols., 2003). A figura 03 aborda ilustrativamente o decréscimo inconsistente do pH do vacúolo parasitóforo contendo *M. tuberculosis* e alguns mecanismos propostos de manipulação da resposta imune por este agente.



**Fig. 03 Vias diferenciais intracelulares após a fagocitose.** Na internalização de esferas de látex revestidas com IgG, os fagossomos que as contêm experimentam rápida acidificação (1A) e as partículas são direcionadas aos lisossomos (1B). Por outro lado, fagossomos que contêm *M. tuberculosis* apresentam decréscimo discreto no pH (1A) e não sofrem fusão com os lisossomos (1B). (Figura adaptada de Russell, 2007).

Os fagossomos micobacterianos mantêm características de endossomos primários e mantêm acesso as vias de reciclagem da via endocítica, maneira pela qual as micobactérias conseguem adquirir ferro intracelular, apesar de sua restrita disponibilidade. O esquema mostra o fagossomo micobacteriano com seu pH mantido em 6,4, acesso às vias de reciclagem endocíticas, manutenção da GTPase Rab5 e fosfatidilinositol 3-quinase – Vps34 (adquisição reduzida de moléculas de PIP3 e, assim, inabilidade de acumular EEA1 (2A). O quadro lateral ilustra alguns dados relacionados à capacidade de modulação do fagossomo pela micobactéria (2B-2E). LAM micobacteriana bloqueia o recrutamento de EEA1 pela inibição da formação de PIP3 pela Vps34 (2B). Em (2C), a fosfatase micobacteriana SapM desfosforila PIP3, novamente bloqueando o recrutamento de EEA1. O bloqueio da maturação do fagossomo tem participação da serina-treonina quinase, PknG, através de mecanismo ainda não elucidado (2D). Em (2E), dados indicam necessidade de contato íntimo entre a parede celular micobacteriana e a membrana do fagossomo para a manutenção do fagossomo estacionário na rota de maturação (Figura adaptada de Rohde e cols., 2007).

Apesar das estratégias de subjugar os mecanismos exercidos por macrófagos para eliminação de patógenos, foi descrito que a ativação prévia destas células por IFN- $\gamma$  capacita-as a contornar os mecanismos de escape micobacterianos e conduzir os patógenos a compartimentos de ambiente ácido e hidrolítico (Schaible e cols., 1998; Via e cols., 1998). Mecanismos de erradicação micobacterianos documentados (St John e cols., 2001; Darwin e cols., 2003) remetem ao envolvimento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que inferem alterações a componentes micobacterianos, reduzindo sua capacidade de infectividade e proliferação. Outros processos descritos mais recentemente envolvem mecanismos de autofagia de macrófagos infectados (Gutierrez e cols., 2004) e ainda ação de peptídeos derivados de ubiquitina (Alonso e cols., 2007; Kieffer e cols., 2003).

A complexidade de interações estabelecidas entre micobactérias e os macrófagos que as contém descritas acima tornam evidente a necessidade de expansão das abordagens de estudo desta interação no sentido de ampliar a compreensão do processo.

## **1.2) Apoptose Neutrofílica**

### **1.2.1) Processo Apoptótico: Início e “Fim” da Participação de Neutrófilos na Resposta Aguda nas Infecções Micobacterianas**

Nas fases iniciais da infecção pulmonar tuberculosa, os neutrófilos migram pela ação de fatores quimiotáticos através dos capilares para o interstício e finalmente para os espaços alveolares. Apesar da predominante migração de células mononucleares para o sítio de infecção, a resposta precoce da tuberculose envolve influxo de neutrófilos, que detém papel significativo na fase aguda desta doença (Appelberg, 1992; Condos et al., 1998).

Nas infecções por *M. tuberculosis*, os neutrófilos liberam citocinas e quimiocinas que participam do processo de recrutamento de outros subtipos celulares para o sítio de infecção (Cassatela, 1995; Riedel & Kaufmann, 1997; Kasahara e cols., 1998; Scapini e cols., 2000). Eles exercem atividade regulatória no granuloma via quimiocinas (Seiler e cols., 2003), e participam de forma importante no controle da infecção por micobactérias de crescimento lento, como o *M. tuberculosis* (Seiler e cols., 2000).

O papel protetor dos neutrófilos nas infecções micobacterianas torna-se claro mediante observações clínicas nas quais pacientes neutropênicos são mais sujeitos ao crescimento de *M. avium* e que a depleção destas células pelo uso de anticorpos promove aumento da carga bacteriana pulmonar nas infecções por *M. tuberculosis* (Appelberg e cols., 1995; Pedrosa e cols., 2000).

Foi demonstrado que estas células exercem funções bactericidas, incluindo fagocitose, geração de espécies reativas de oxigênio, exocitose de grânulos específicos, gerando morte micobacteriana (Jones e cols., 1990; May & Spagnuolo, 1987; Brown e cols., 1987). Estes mesmos mediadores são capazes de induzir lesão tecidual (Babior, 1978; Cox e cols., 1995), motivo pelo qual a cinética da resposta inflamatória deve incluir em seu plano a remoção tempo-espacial destas células do sítio inflamatório, evitando assim processos crônicos de agressão tecidual. Este processo é feito por apoptose destes neutrófilos, sendo removidos por células do sistema fagocítico, particularmente macrófagos.

Ao longo do estabelecimento dos quadros inflamatórios e infecciosos, neutrófilos entram em apoptose, expõem fosfatidilserina em sua superfície e regulam negativamente a expressão de CD16 (receptor de IgG de baixa afinidade) (Homburg e cols., 1995), com a constatação de sinais característicos de necrose secundária em tempos mais prolongados. Alguns mediadores inflamatórios são capazes de modular negativamente a cinética do evento apoptótico *in vitro*, incluindo LPS, IL-1, IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-8, ao passo que outros, como TNF- $\alpha$  e espécies reativas de oxigênio aceleram o processo (Takeda e cols., 1993; Watson e cols., 1996).

Foi observado aumento da apoptose espontânea *in vitro* em neutrófilos provenientes de pacientes portadores de tuberculose, um processo relacionado ao estado de ativação destas células. A infecção por *M. tuberculosis* é capaz ainda de acelerar o processo não somente em neutrófilos provenientes de pacientes, mas também de indivíduos saudáveis (Alemán e cols., 2001, 2002). Foi demonstrado que neutrófilos isolados de pacientes portadores de tuberculose pulmonar apresentam maior expressão de Fas e menor percentual de células Bcl-2 (fenótipos congruentes à entrada na via apoptótica), quando comparados a neutrófilos de indivíduos saudáveis (Alemán e cols., 2002).

Na infecção *in vitro* por *M. tuberculosis*, o processo de apoptose de neutrófilos é dependente da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio e ativação de caspase-3 (Perskvist e cols., 2002). Caspases são uma família de aspartases cisteinadas que medeiam a execução da via apoptótica, sendo as caspases 3 e 8 as

principais relacionadas ao processo em neutrófilos (Fadeel e cols., 1998; Nicholson, 1999; Yamashita e cols., 1999; Suziki e cols., 2001). Neutrófilos apresentam ainda uma série de proteínas da família Bcl-2, que participam do controle do processo apoptótico pelo balanço de seus componentes pró e anti-apoptóticos tendo ação sobre a atividade das caspases (Akgul e cols., 2001; Kroemer, 1997). Neste subtipo celular, foi demonstrado que o balanço entre a expressão dos membros desta família determina a deflagração ou supressão do processo apoptótico (Weinmann e cols., 1999; Dibbert e cols., 1999; Moulding e cols., 1998). A infecção por *M. tuberculosis* é capaz de promover aumento na relação entre a expressão da proteína Bax e Bcl-x<sub>L</sub> (Perskvist e cols., 2002), proteínas com atividade pró-apoptótica e anti-apoptótica, respectivamente (Kroemer, 1997; Weinmann e cols., 1999; Dibbert, 1999), indicando ser este um possível mecanismo envolvido na apoptose de neutrófilos induzida por *M. tuberculosis*.

O *M. tuberculosis* é capaz ainda de ativar elementos da família das MAP quinases, entre eles p38 em neutrófilos provenientes de pacientes com tuberculose e indivíduos saudáveis. Neutrófilos circulantes de pacientes com tuberculose exibiram maior expressão de p38 fosforilada do que indivíduos saudáveis (Nick e cols., 2000; Perskvist e cols., 2000, 2002; Alemán e cols., 2004).

A análise da participação de receptores de superfície na apoptose revelou a participação do receptor TLR2, uma vez que seu bloqueio por anticorpos neutralizantes promoveu decréscimo nos níveis de apoptose (Alemán e cols., 2004).

O grande número de componentes envolvidos no processo de apoptose neutrofílica demonstra a complexa rede de interações celulares envolvidas no desencadeamento deste evento.

### **1.2.2) Influência Dicotômica da Apoptose na Resposta Inflamatória**

Um grande número de patógenos, incluindo as micobactérias, vem sendo descrito como indutores de processo apoptótico em células do hospedeiro, representando um possível mecanismo de eliminação de células do sistema imune no sentido de lograr êxito na evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Fratuzzi e cols., 1999; Gao & Kwai, 2000; Weinrauch & Zychlinsky, 1999). Todavia, outra corrente inclui este processo como uma estratégia desenvolvida pelo hospedeiro como forma de evitar a instalação do processo infeccioso pela eliminação do microambiente de sobrevivência do patógeno (Gao & Kwai, 2000;

Weinrauch & Zychlinsky, 1999; Keane e cols., 2000). O evento apoptótico induzido pelas infecções micobacterianas é permissivo às duas correntes descritas acima. Enquanto grupos de pesquisadores endossam a participação benéfica da apoptose de neutrófilos no sentido da eliminação da carga bacteriana presente nos tecidos, outros suportam a idéia que este processo resultaria da manipulação exercida pelo patógeno no sentido de promover desativação do sistema imune, propiciando a proliferação do agente agressor.

Uma das linhas que reforça o papel de apoptose de neutrófilos como mecanismo fortalecedor da resposta imune remete ao fornecimento de componentes de neutrófilos como munição aos macrófagos que os fagocitam. O processo de remoção de neutrófilos apoptóticos em sítios inflamatórios pela fagocitose mediada por macrófagos, além de exercer papel chave na limitação do processo inflamatório (Newman e cols., 1982; Voll e cols., 1997), pode estar relacionado à aquisição de componentes antimicrobianos estocados em grânulos de neutrófilos, aumentando a capacidade microbicida dos macrófagos (Heifets e cols., 1980; Silva e cols., 1989).

Nas infecções por micobactérias, os patógenos têm como ambiente de sobrevivência o interior de macrófagos. Apesar da ação de granulosina proveniente de grânulos citotóxicos de células T CD8<sup>+</sup> e a indução de catelicidina mediada por TLR2 em via dependente de vitamina D nos macrófagos (Stenger e cols., 1998; Ochoa e cols., 2001; Liu e cols., 2006), os macrófagos não possuem quantidades significativas de mediadores antimicrobianos em grânulos pré-formados.

Os neutrófilos apresentam grânulos que contêm moléculas com atividade microbicida em concentrações tão elevadas quanto mg/mL (Ganz, 2003). Dos quatro subtipos de grânulos neutrofílicos, dois abrigam substâncias com atividades antimicrobianas. Grânulos primários azurofílicos detêm  $\alpha$ -defensinas, mieloperoxidase e serprocidinas, enquanto os secundários contêm lactoferrina, catelicidina e lipocalina associada à gelatinase, além da presença de lisozima nos grânulos terciários.

Durante a fase final do tempo de vida celular, os neutrófilos têm o número de moléculas de adesão reduzido e se tornam menos responsivos aos estímulos degranulatórios (Whyte e cols., 1993; Kobayashi e cols., 2003; Clemens & Horwitz, 1995), sendo observado que estas células mantêm seus grânulos íntegros após processo apoptótico. Nas infecções por micobactérias, estes grânulos foram identificados nos endossomos primários de macrófagos que fagocitaram neutrófilos apoptóticos, inclusive nos fagossomos contendo micobactérias (Tan e cols., 2006). Dados experimentais relatam que a adição de neutrófilos apoptóticos em culturas de

macrófagos alveolares infectados por *M. tuberculosis* reduz a viabilidade das micobactérias intracelulares de forma dependente da dose, efeito não observado para o controle experimental feito com células B apoptóticas que não detêm grânulos com componentes antimicrobianos (Tan e cols., 2006), fortalecendo a teoria do aumento da capacidade microbicida do macrófago pela aquisição de componentes citotóxicos dos grânulos de neutrófilos através da fagocitose dos restos apoptóticos destas células.

É interessante observar que a capacidade de induzir apoptose em macrófagos alveolares humanos é inversamente proporcional à virulência das diferentes cepas de *M. tuberculosis* (Keane e cols., 2000), concordando com a demonstração que a apoptose de macrófagos limita o crescimento intracelular de micobactérias (Fratazzi e cols., 1999).

O processo de fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos pode promover sinalizações estimulatórias distintas que variam de acordo com o estímulo apoptótico. Quando este processo é induzido pela infecção por *M. tuberculosis*, há aumento na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos, efeito oposto ao observado para fagocitose de neutrófilos cuja apoptose foi induzida por radiação UV, onde além da redução da produção de TNF- $\alpha$ , há aumento da produção de TGF- $\beta$ 1 (Perskvist e cols., 2002).

A influência da via de sinalização ativada pela fagocitose de neutrófilos apoptóticos sobre o balanço entre a resposta imune e o crescimento micobacteriano é endossado pela observação que o processo de fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos induz a produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (Fadok e cols., 1998), estando estes mediadores envolvidos na desativação de macrófagos propiciando, pois, a replicação de patógenos intracelulares (Freire-de-Lima e cols., 2000; Ribeiro-Gomes e cols., 2005).

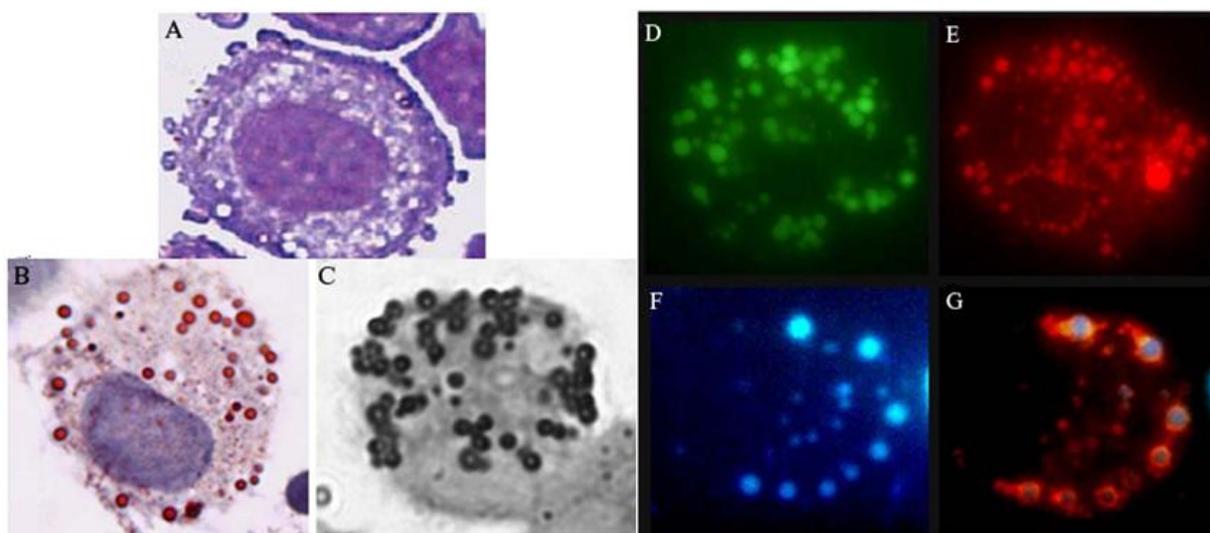
### **1.3) Corpúsculos Lipídicos**

#### **1.3.1) Aspectos Iniciais**

Durante muito tempo, os ácidos graxos tiveram seus papéis bastante limitados às condições específicas de fornecimento energético e como constituintes de membranas celulares. Todavia, estudos mais recentes descreveram a importância da compartimentalização de constituintes lipídicos em sítios específicos

e determinados no citoplasma de células envolvidas em processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos. Ácidos graxos exercem funções como moléculas sinalizadoras, como precursores da síntese de eicosanóides, agem como ligantes para receptores nucleares que regulam respostas imunológicas, além de influenciarem a estabilidade de microdomínios de membrana envolvidos em mecanismos de sinalização intracelular (Yaqoob & Calder, 2007).

Em leucócitos e outras células envolvidas na resposta inflamatória, esses componentes lipídicos estão organizados de forma discreta em pequenas inclusões citoplasmáticas denominadas corpúsculos lipídicos. Apesar de terem sido por muito tempo resignados à condição de organelas de armazenamento e transporte lipídico, de pouca importância do ponto de vista imunológico, os corpúsculos lipídicos são estruturas extremamente dinâmicas e funcionalmente ativas que contribuem de forma decisiva ao estabelecimento de quadros inflamatórios (Bozza e cols., 2007). A figura a seguir mostra as técnicas comumente empregadas para evidenciação dos corpúsculos lipídicos, bem como ilustra a impossibilidade do emprego de métodos que empregam solventes lipídicos para observação destas estruturas.



**Fig. 04 Visualização de Corpúsculos Lipídicos sob Microscopia Ótica (A-C) e Fluorescência (D-G).** Em (A), coloração por May-Grunwald-Giemsa, Oil Red O (B) e Tetróxido de Ósmio (C). As marcações fluorescentes que evidenciam os corpúsculos lipídicos são BODIPY™493/503 (D), Nile Red (E), P96 (F). Em (G) imagem sobreposta de imunolocalização de ADRP (proteína amplamente distribuída nos corpúsculos lipídicos) e P96. As colorações que empregam solventes a base de álcool promovem dissolução dos corpúsculos lipídicos, deixando espaços citoplasmáticos (A). Macrófagos ativados *in vivo* pela infecção intrapleural por *M. bovis* BCG ( $5 \times 10^6$ /cavidade - 24h) (A) (Bozza e cols., 2007). Macrófagos ativados *in vivo* após injeção intrapleural de LPS (500ng/cavidade - 6h) (B-G) (D'Avila e cols., 2008).

Avanços consideráveis mostram que corpúsculos lipídicos de leucócitos são domínios intracelulares induzíveis e especializados e tomam parte em processos de regulação e tráfego do metabolismo lipídico, na síntese de mediadores inflamatórios, na resposta frente a infecções patogênicas e na inflamação de natureza alérgica, conforme revisto recentemente (Bozza e cols., 2007).

Durante processos de estimulação de natureza inflamatória, estes corpúsculos lipídicos aumentam em número e tamanho e se tornam sítios de importância significativa na condução do processo inflamatório em diversos subtipos celulares já estudados, incluindo macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos (Dvorak e cols., 1983; Weller e cols., 1994, 1999; Bozza e cols., 2005).

### **1.3.2) Composição e Formação**

Corpúsculos lipídicos são organelas citoplasmáticas ricas em conteúdo lipídico, sendo encontradas em diferentes organismos, incluindo bactérias, fungos, plantas e células animais (Murphy e cols., 2001; Waltermann e cols., 2005). A composição destas estruturas engloba um cerne rico em di e triacilgliceróis, ésteres de retinol, além de colesterol livre e esterificado (Zweytick e cols., 2000; Murphy e cols., 2001), envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos de constituição particular de ácidos graxos (Tauchi-Sato e cols., 2002). O envoltório dos corpúsculos lipídicos é particularmente abundante em fosfatidilcolina com duas cadeias acil mono-insaturadas e presença de ácidos graxos não-saturados na liso-fosfatidilcolina (Tauchi-Sato e cols., 2002), diferindo dos padrões fosfolipídicos observados para as membranas do retículo endoplasmático rugoso e microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídeos.

É interessante observar que diferentes subtipos celulares apresentam composições lipídicas distintas. Enquanto macrófagos e neutrófilos envolvidos em reações inflamatórias mostram constituição rica em triglicerídeos (Triggiani e cols., 1995; Johnson e cols., 1999), eosinófilos contém maiores proporções de fosfolipídeos (Weller e cols., 1991). A comparação entre estas células mostra ainda que o ácido araquidônico, molécula importante na síntese de diversos mediadores inflamatórios, também apresenta distribuição diferenciada, sendo encontrado incorporado predominantemente da fração fosfolipídica nos eosinófilos e em lipídeos neutros em monócitos e macrófagos (Weller e cols., 1991; Triggiani e cols., 1995; Yu e cols., 1998).

A compartimentalização de lipídeos nestas estruturas parece ser essencial para o direcionamento destas moléculas para regiões específicas no interior da célula onde sejam necessárias em rotas de metabolização ou em vias de sinalização. A coordenação da biogênese e metabolização dos corpúsculos lipídicos é controlada, em parte, por uma família de proteínas que responde pela composição majoritária do conteúdo proteico dos corpúsculos lipídicos. Esta família, denominada PAT, engloba a perilipina, a adipofilina (descrita também como proteína relacionada à diferenciação de adipócitos - do inglês *adipocyte differentiation-related protein* - ADRP) e a proteína de interação de porção terminal de 47 kilodaltons - do inglês *tail interacting protein of 47 kilodaltons* – TIP47). São caracterizadas por compartilharem seqüências similares e participam não só como componentes estruturais do envoltório dos corpúsculos lipídicos, mas estão relacionadas aos processos de biogênese e organização estrutural dos corpúsculos lipídicos (Londos e cols., 2005; Heid e cols., 1998; Brasaemle e cols., 1997, 2007).

O conteúdo protéico desta organela, não se restringe aos componentes da família PAT, tendo sido observadas uma série de enzimas envolvidas em processos de metabolismo lipídico (Yu e cols., 1998; Fujimoto e cols., 2004; Brasaemle e cols., 2004), enzimas relacionadas com a formação de eicosanóides (Dvorak e cols., 1993; Bozza e cols., 1997; Pacheco e cols., 2002), além de proteínas envolvidas em cascatas de sinalização, tráfego de vesículas, comunicação célula-célula, incluindo caveolina e estomatina, proteínas da família Rab, PI3K (fosfatidilinositol 3-quinase), MAP quinases e PKC (proteína quinase C) (Yu e cols., 1998, 2000; Liu e cols., 2004; Wan e cols., 2007; Martin e cols., 2005; Ozeki e cols., 2005; Fujimoto e cols., 2001; Pol e cols., 2001, 2004; Chen e cols., 2002; Umlauf e cols., 2004; Ostermeyer e cols., 2001). Enzimas como esqualeno epoxidase, hidroxí-esteróide desidrogenase e lanosterol sintase, envolvidas no metabolismo de colesterol, e acetil coenzima A carboxilase, NADH b<sub>5</sub> citocromo redutase, envolvidas na síntese de ácidos graxos, já foram descritas em corpúsculos lipídicos em diferentes subtipos celulares (Brasaemle e cols., 2004; Fujimoto e cols., 2001; Wan e cols., 2007; Liu e cols., 2004).

As alterações morfológicas observadas por microscopia eletrônica entre corpúsculos lipídicos gerados por diferentes estímulos e em vários subtipos celulares são decorrentes das alterações na composição e mobilização lipídica ou ainda da razão diferenciada entre lipídeos neutros e fosfolipídeos (Weller e cols., 1989; Guo e cols., 2008).

Os corpúsculos lipídicos estabelecem interações com outras organelas, sendo melhor caracterizadas aquelas com as cisternas do retículo endoplasmático liso (Dvorak e cols., 1991; Bozza e cols., 1997; Ozeki e cols., 2005), mas também com ribossomos em mastócitos, neutrófilos e eosinófilos (Dvorak e cols., 2003; Wan e cols., 2007), fagossomos em macrófagos e neutrófilos (van Manen e cols., 2005; D`Avila e cols., 2006; Melo e cols., 2003), mitocôndrias em mastócitos e células U937 (Dvorak e cols., 1991; Wan e cols., 2007) e peroxissomos em células COS-7 (Schrader e cols., 2001). A interação destas organelas com os filamentos do citoesqueleto apresenta importantes implicações, com ênfase na motilidade de corpúsculos lipídicos dependente de microtúbulos (Pol e cols., 2004), permitindo rápida realocação frente aos processos de ativação celular. Estes eventos foram observados na polarização induzida por eotaxina em eosinófilos (Bandeira-Melo e cols., 2001) e pelo evento fagocítico em macrófagos e neutrófilos (Dvorak e cols., 1983; van Manen e cols., 2005). Moléculas que estabilizam a rede de microtúbulos, como taxol e colchicina, inibem a formação de corpúsculos lipídicos e produção de LTB<sub>4</sub> induzidos *in vitro* por LPS, mostrando que a associação de microtúbulos e corpúsculos lipídicos pode não estar relacionada somente com a movimentação intracelular desta organela, mas também aos processos de compartimentalização de moléculas essenciais ao desempenho de suas funções no contexto inflamatório (Pacheco e cols., 2004).

Análises de proteômica mostraram presença de pequenas GTPases da família Rab nos corpúsculos lipídicos (Brasaemle e cols., 2004; Liu e cols., 2004; Umlauf e cols., 2004; Ozeki e cols., 2005). Este dado reforça a ocorrência de interações entre corpúsculos lipídicos e demais organelas, uma vez que as Rab são reguladoras críticas do transporte vesicular e interação entre organelas.

Especificamente no contexto de processos infecciosos e de especial interesse para este estudo, a localização dos corpúsculos lipídicos junto aos fagossomos contendo micobactérias (D`Avila e cols., 2006) levanta a suposição de que o tráfego de moléculas entre estas duas organelas pode influenciar o processo de maturação do fagossomo.

A interação com retículo endoplasmático fortalece o modelo atual da formação de corpúsculos lipídicos a partir desta organela. Esta origem seria compatível com a organização dos corpúsculos lipídicos, com cerne rico em lipídeos neutros envolvidos por monocamada de fosfolipídeos (Brown e cols., 2001; Murphy e cols., 2001; Tauchi-Sato e cols., 2002). O acúmulo de lipídeos neutros (provenientes

de ácidos graxos e colesterol), resultantes da atividade enzimática do retículo endoplasmático, ocorre entre as duas folhas da membrana do retículo até alcançar determinado volume e concentração sendo, a seguir, lançados no citoplasma carregando uma hemi-membrana proveniente da face citosólica da membrana do retículo endoplasmático. Estudos que corroboram esta hipótese mostram a presença de proteínas do retículo nos corpúsculos lipídicos (Yu e cols., 2000; Brasaemle e cols., 2004; Liu e cols., 2004; Umlauf e cols., 2004), assim como a dispersão de caveolina marcada nos corpúsculos lipídicos citoplasmáticos após estimulação das células com ácido oleico, ao contrário de sua localização confinada ao retículo endoplasmático em células mantidas sem soro e sem corpúsculos lipídicos detectáveis (Pol e cols., 2004). Coletivamente estes dados conduzem ao entendimento que os corpúsculos lipídicos são gerados no retículo endoplasmático e envolvidos pela maquinaria do citoesqueleto celular, possibilitando a movimentação destas estruturas e interação com outras organelas de forma dinâmica e regulada.

Especificamente nos leucócitos, os corpúsculos lipídicos estão presentes em situações normais, embora em pequeno número e tamanho. Estas estruturas sofrem modificações morfológicas e funcionais notórias quando estes leucócitos são submetidos a diferentes processos que induzem ativação celular. Estudos demonstraram aumento no número e tamanho dos corpúsculos lipídicos de leucócitos obtidos de pacientes com distúrbios inflamatórios, como síndrome hipereosinofílica (Bozza e cols., 1998), síndrome da angústia respiratória aguda (Triggiani e cols., 1995), doença de Chron (Beil e cols., 1995) e nos aspirados de junções sinoviais de pacientes com artrite (Weinstein e cols., 1980), além dos estudos conduzidos em camundongos *in vivo* e *in vitro* com estímulos variados, como ácidos graxos, LPS e PAF (Weller e cols., 1991; Pacheco e cols., 2002; Bozza e cols., 1996) e nas infecções por vários agentes patogênicos, entre eles *T. cruzi*, *M. bovis* BCG e *T. gondii* (D`Avila e cols., 2006; Melo e cols., 2003; Charron e cols., 2002)

Apesar das alterações morfológicas nitidamente observadas nos processos inflamatórios, somente nas últimas décadas os corpúsculos lipídicos passaram a ocupar papel de destaque no estudo de processos fisiopatológicos. A biogênese destas estruturas, embora ainda não completamente elucidada, envolve eventos específicos e complexos decorrentes de diversos agentes estimulatórios, sendo alvo de descrição pormenorizada a seguir.

### 1.3.3) Mecanismos de Biogênese de Corpúsculos Lipídicos

A formação de corpúsculos lipídicos foi atribuída durante muito tempo ao simples processo de aquisição de ácido graxos exógenos. Quando ácidos graxos insaturados na posição *cis* são adicionados às culturas de células, eles podem ser incorporados aos esqueletos de glicerol e contribuir para a formação de novos corpúsculos lipídicos ou para aumento dos já existentes. Apesar disso, a presença de fontes lipídica não é uma requisição essencial para estes processos. O evento celular de formação destas organelas envolve mecanismos complexos de regulação de metabolismo celular, reconhecimentos envolvendo receptores específicos e processos de ativação celular, alguns dos quais serão descritos a seguir.

A oferta de moléculas de ácidos graxos que diferem entre si pelo grau de insaturações ou posicionamento das insaturações mostra que a indução é estritamente regulada, uma vez que alguns são capazes de induzir a formação *de novo* de corpúsculos lipídicos ao passo que outros não (Bozza e cols., 2001; Weller e cols., 1991). O uso de um análogo de araquidonato não passível de esterificação (araquidonil trifluorometilcetona) é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza & Weller, 2001). No mesmo contexto, a oferta de ácidos graxos saturados não é capaz de induzir a formação destas organelas (Weller e cols., 1991; Bozza e cols., 1991), ao passo que estímulos de natureza protéica, como citocinas e quimiocinas, são capazes de induzir sua formação (Bozza e cols., 1998; Bartemes e cols., 1999; Bandeira-Melo e cols., 2001, 2002; Maya-Monteiro e cols., 2008; Pacheco e cols., 2007). Incluem-se entre os estímulos capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, ácido graxos insaturados, fator de ativação de plaquetas (do inglês - *platelet activating factor* - PAF), lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram negativas e ativadores de proteínas quinase C (PKC) (Bozza e cols., 1996; Pacheco e cols., 2002; Weller e cols., 1991). Publicação recente mostrou o papel coordenado de vários genes envolvidos em vias metabólicas e imunológicas distintas na biogênese dos corpúsculos lipídicos (Guo e cols., 2008).

Um notório estímulo para formação de corpúsculos lipídicos é a lipoproteína de baixa densidade (LDL - do inglês *low density lipoprotein*). Apesar da forma nativa desta molécula não induzir a formação de corpúsculos lipídicos, sua forma oxidada é um forte indutor de tal evento. A LDL oxidada contém uma série de componentes inflamatórios, entre eles fragmentos fosfolipídicos oxidados capazes de ativar o receptor de PAF. Estes constituintes são capazes de induzir migração e acúmulo de

neutrófilos, monócitos e eosinófilos e formação de corpúsculos lipídicos nestas células quando injetados na cavidade pleural (Silva e cols., 2002). A utilização de antagonistas de PAF inibe a formação destas organelas induzida por LPS e LDL oxidada mostrando a presumível participação de PAF e lipídeos relacionados no processo (Pacheco e cols., 2002; Silva e cols., 2002). Corroborando com estes dados, o tratamento de células estimuladas com LPS ou LDL oxidada com PAF-acetilhidrolase inibe a formação de corpúsculos lipídicos (Silva e cols., 2002).

O fator ativador de plaquetas (PAF) é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1996; de Assis e cols., 2003) ao passo que o Liso-PAF, seu precursor e metabólito, não é capaz de fazê-lo. Cabe observar que o Liso-PAF, apesar da similaridade estrutural, não apresenta atividade agonista (pela destituição de um radical acetato na posição sn2) sobre o receptor de PAF (Prescott e cols., 2000). A estimulação na formação de corpúsculos lipídicos pelo PAF é inibida por antagonistas do receptor de PAF, bem como pela toxina pertussis (inibidor da função de receptores acoplado à proteína G). De forma interessante, outras moléculas que exercem sua ação pela ligação a receptores acoplados à proteína G, como IL-8, C5a e LTB<sub>4</sub> são inábeis em induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1996). Bozza e cols. demonstraram ainda que a formação de corpúsculos lipídicos induzida por PAF é dependente da ativação de 5-lipoxigenase (5-LO) e seu metabólito 5-HETE (do inglês- (5-(S)-hydroxieicosatetraenoic acid - ácido 5-(S)-hidroxieicosatetraenóico), uma vez que a inibição de 5-LO por diferentes mecanismos inibiu a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por PAF, mesmo sendo observado após estimulação de neutrófilos e macrófagos de animais geneticamente deficientes de 5-LO. A formação de corpúsculos lipídicos por este estímulo está relacionada ainda à ativação de fosfolipase C e proteína quinase C (Bozza e cols., 1996).

É interessante ressaltar que a necessidade de utilização da maquinaria de síntese protéica para a geração de corpúsculos lipídicos varia de acordo com o estímulo. Em leucócitos, o pré-tratamento com inibidores da síntese proteica (por actinomicina D ou cicloheximida) promoveu redução significativa na formação de corpúsculos lipídicos *in vitro* induzidos por PAF e ácidos graxos, apesar do mesmo efeito não ter sido constatado para as quimiocinas RANTES e eotaxina, mostrando que a formação dos corpúsculos lipídicos é um evento altamente regulado, que pode ocorrer de forma dependente ou não da síntese proteica *de novo* (Bozza e cols., 1996; Bandeira-Melo e cols., 2001).

Membros da família de receptores nucleares, especialmente os receptores ativadores de proliferação de peroxissomos (PPAR – do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor*), participam dos processos de biogênese de corpúsculos lipídicos, atuando em processos transcricionais, na diferenciação de macrófagos e acúmulo lipídico intracelular (Nagy e cols., 1998; Tontonoz e cols., 1998). Foi demonstrado que agonistas específicos de PPAR $\gamma$ , apesar de não induzirem por si só a formação de corpúsculos lipídicos, potencializam sua formação induzida por LDL oxidada, agonistas semelhantes ao PAF e G-CSF, demonstrando a participação destes receptores na formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos (de Assis e cols., 2003; Inazawa e cols., 2003; Almeida e cols., em preparação).

O envolvimento dos receptores TLR foi investigado em várias vias de formação de corpúsculos lipídicos. A indução destas estruturas por LPS de bactérias Gram negativas mostrou ser dependente da sinalização mediada pelo TLR-4 (Pacheco e cols., 2002), conjugados ou não a outras moléculas acessórias de grande importância para o processo de ativação e resposta celular, destacando-se entre elas o CD14, CD11b/CD18 e MD-2.

As infecções por *T. cruzi*, *Chlamydia pneumoniae*, assim como por *M. bovis* BCG, ativam vias de sinalização que envolvem a participação de vários receptores da família Toll-like, tendo sido demonstrada participação do TLR-2 na formação de corpúsculos lipídicos por estes agentes infecciosos (D`Avila e cols., 2006; Takeuchi e cols., 2002; Sugawara e cols., 2003; Wieland e cols., 2004; Joyee & Yang, 2008; Cao e cols., 2007). Na infecção micobacteriana, foi demonstrada a participação decisiva deste receptor no reconhecimento e indução de corpúsculos lipídicos, embora para animais geneticamente deficientes de TLR-4 não tivesse sido constatada diferença na formação de corpúsculos lipídicos induzidos por *M. bovis* BCG quando comparados a animais controle. Apesar da dependência de reconhecimento por TLR2, outros eventos estão relacionados à formação regulada de corpúsculos lipídicos, uma vez que a estimulação *in vitro* com um potente ativador de TLR2, zimosan, não é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos (D`Avila e cols., 2006).

Nos modelos de pleurisia, foi demonstrado que o mecanismo de migração, ativação e formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos envolve geração de eotaxina e ação via receptor CCR3, evento dependente de reconhecimento via TLR-2, mas não TLR-4 (D`Avila e cols., 2007). A sinalização via TLR-2 ainda é capaz de alterar a produção de IL-5, uma citocina envolvida no influxo de eosinófilos induzido

pela infecção por *M. bovis* BCG em animais geneticamente deficientes de IFN- $\gamma$  e animais selvagens (D'Avila e cols., 2007; Menezes-de-Lima-Junior e cols., 1997).

Apesar de componentes de superfície de patógenos, como LPS de bactérias Gram negativas (Pacheco e cols., 2002) e lipoarabinomanano de *M. bovis* (D'Avila e cols., 2006) serem capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente de dose e tempo através de moléculas de reconhecimento de superfície diferentes, o processo não apresenta dependência do evento fagocítico, uma vez que o percentual de células infectadas é bem menor que aquelas que tiveram indução da formação destas organelas e a fagocitose de partículas inertes de látex ou mesmo de micobactérias não-patogênicas foram incapazes de tal indução (D'Avila e cols., 2006). Da mesma forma, a formação de corpúsculos lipídicos independe de eventos de migração celular, uma vez que a estimulação com LPS é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos pleurais no tempo de 6 horas, quando o número de macrófagos não sofreu qualquer aumento significativo, mostrando indução nos macrófagos residentes (Pacheco e cols., 2002). De forma aditiva, a comparação entre pacientes com sepse (Pacheco e cols., 2002) ou doença de Chagas (Melo e cols., 2003) com indivíduos saudáveis, mostra que há aumento importante no número de corpúsculos lipídicos nos leucócitos circulantes e, mais recentemente, foi observado que a infecção por *Mycobacterium smegmatis*, apesar de induzir intenso influxo leucocítico, não é capaz de estimular a formação de corpúsculos lipídicos (D'Ávila e cols., 2006). Apesar da formação de corpúsculos lipídicos não depender de eventos de migração celular, a PGD<sub>2</sub>, um potente agente quimiotático para leucócitos em sítios inflamatórios, é capaz de induzir a formação destas organelas em eosinófilos (Mesquita-Santos e cols., 2006).

#### **1.3.4) Envolvimento dos Corpúsculos Lipídicos na Síntese de Mediadores Inflamatórios**

Prostaglandinas e leucotrienos são mediadores lipídicos que desempenham funções autócrinas e parácrinas, estando envolvidos em um amplo espectro de atividades biológicas na fisiologia bem como em processos patológicos (Funk e cols., 2001; Henderson e cols., 1994).

A biossíntese desses mediadores tem início na disponibilização de ácido araquidônico de membranas biológicas, sendo encontrados freqüentemente na forma esterificada em fosfolipídeos, e metabolização por duas enzimas-chave que

iniciam as vias de formação de leucotrienos e prostaglandinas, a 5-lipoxigenase (5-LO) e as ciclooxigenases (COX), respectivamente. As COX têm sua distribuição classicamente associadas às membranas biológicas do retículo endoplasmático e envoltório nuclear, ao passo que a 5-LO teve localização descrita no citoplasma, membrana perinuclear e eucromatina (Morita e cols., 1995; Otto e cols., 1994; Brock e cols., 1994; Woods e cols., 1993, 1995; Rouzer e cols., 1988), sendo esta distribuição influenciada pelo grau de ativação da célula.

Os corpúsculos lipídicos de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos são regiões intracelulares de acúmulo de lipídeos neutros, como colesterol e triacilgliceróis, grande variedade de fosfolipídeos, além de ácido araquidônico (Johnson e cols., 1999; Weller e cols., 1991; Yu e cols., 1998). Além destes componentes lipídicos, foi demonstrada a presença de enzimas relacionadas ao metabolismo do ácido araquidônico, entre elas a fosfolipase (PL) A<sub>2</sub> e quinases envolvidas na rota da mobilização do ácido araquidônico, entre elas ERK1/2, p85 e p38 (Yu e cols., 1998) em frações purificadas de corpúsculos lipídicos isentas de citoplasma e demais organelas. A presença de todos esses componentes capacita os corpúsculos lipídicos a funcionarem como sítios intracelulares capazes de rápida disponibilização de ácido araquidônico para produção de prostaglandinas e leucotrienos. Para tanto, haveria necessidade da presença das principais enzimas metabolizadoras de ácido araquidônico, a 5-lipoxigenase e as ciclooxigenases, além das enzimas que atuem em etapas subseqüentes desta via metabólica. Estas enzimas já foram descritas e identificadas em corpúsculos lipídicos de diferentes subtipos celulares submetidos a diversos estímulos inflamatórios (Dvorak e cols., 1992, 1993; Bozza e cols., 1997, 1998). A importância dos corpúsculos lipídicos na síntese de mediadores inflamatórios já foi demonstrada em diversos processos inflamatórios, infecciosos e neoplásicos de ocorrência natural ou experimentalmente induzidos (Bozza e cols., 1998; Triggiani e cols., 1995; Beil e cols., 1995; Weinstein e cols., 1980).

A compartimentalização de substratos e enzimas necessárias à formação de prostaglandinas e leucotrienos no mesmo espaço subcelular representado pelos corpúsculos lipídicos, confere uma vantagem clara nos parâmetros de velocidade e eficiência na formação de diversos mediadores inflamatórios, apoiando a idéia da participação destas organelas na formação de eicosanóides e participação em processos inflamatórios de diferentes naturezas. Diversos estudos mostram que os mesmos estímulos, tais como ativadores de PKC, ácido araquidônico e PAF, que promovem a geração de eicosanóides em leucócitos ativados são também aqueles

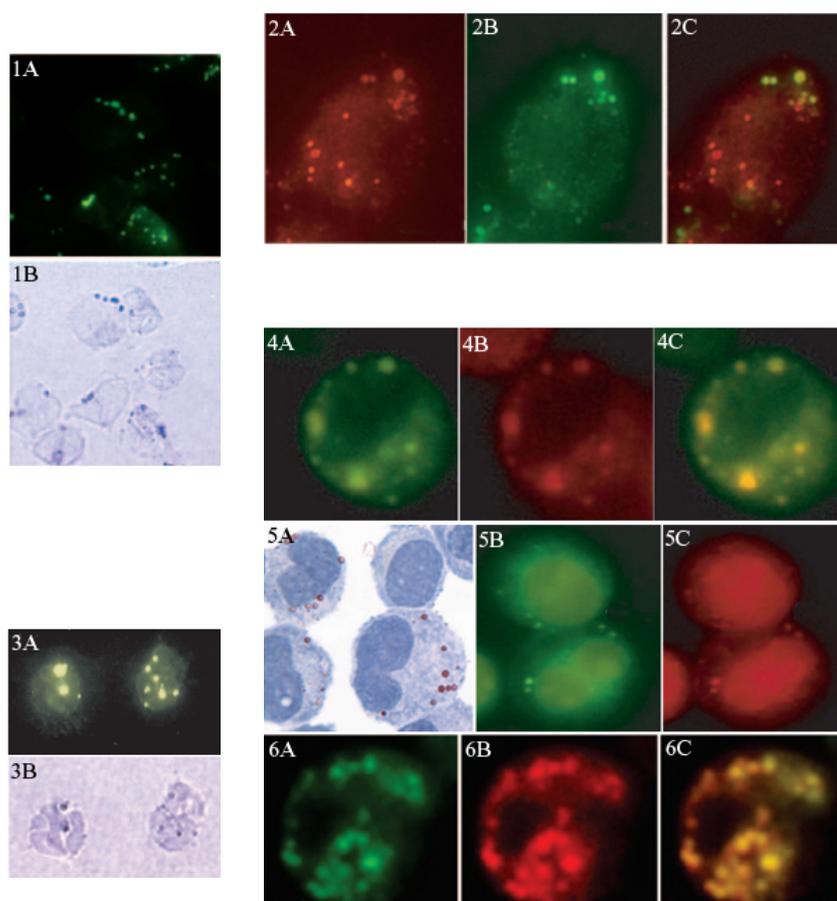
capazes de induzir a formação corpúsculos lipídicos, demonstrando a correlação entre a formação destas estruturas e a geração de eicosanóides *in vitro* (Bozza e cols., 1996, 1997; Batmenes e cols., 1999) e *in vivo* (Pacheco e cols., 2002; Silva e cols., 2002; Melo e cols., 2003).

Mais recentemente, foi descrita a participação dos corpúsculos lipídicos na produção de eicosanóides por neutrófilos e macrófagos em resposta às infecções bacterianas. Experimentos em modelos de inflamação induzida por LDL oxidada (de Assis e cols., 2003) ou LPS ou em amostras clínicas obtidas de pacientes com sepse (Pacheco e cols., 2002) mostraram presença de 5-LO e COX-2 em corpúsculos lipídicos de leucócitos envolvidos na resposta inflamatória. Bozza e cols, trabalhando com citoplasmas de eosinófilos anucleados mostraram que a geração de LTC<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> ocorre em paralelo com a formação de corpúsculos lipídicos induzidos por PAF (Bozza e cols., 1997), indicando a participação importante dessas estruturas na formação de eicosanóides de forma independente da maquinaria metabólica nuclear. De fato, o LTC<sub>4</sub> é o principal produto da via da lipoxigenase em eosinófilos ativados (Bandeira-Melo e cols., 2002).

Ainda no contexto inflamatório, corpúsculos lipídicos de leucócitos ativados por diferentes vias em diferentes subtipos celulares compartimentalizam quimiocinas, citocinas, e fatores de crescimento. Foi demonstrada presença de TNF- $\alpha$  nos corpúsculos lipídicos de fibroblastos, eosinófilos, macrófagos, mastócitos e em neutrófilos e células epiteliais de biópsias do cólon de pacientes com doença de Chron (Beil e cols., 1995). A mesma citocina está presente em corpúsculos lipídicos de leucócitos estimulados por LPS *in vivo* e em neutrófilos e monócitos sanguíneos de pacientes com sepse (Pacheco e cols., 2002). Dvorak e cols. mostraram a presença de fator de crescimento de fibroblastos (FGF – do inglês *fibroblast growth factor*) em corpúsculos lipídicos, bem como nos grânulos de mastócitos humanos (Dvorak e cols., 2002). De forma interessante, substâncias envolvidas em processos de ativação e degranulação de leucócitos, como RANTES e IL-16, estão presentes nos corpúsculos lipídicos de eosinófilos (Lim e cols., 1996).

Através de estratégia de imobilização dos mediadores lipídicos formados em seu local de síntese, foi demonstrado que os corpúsculos lipídicos são as principais regiões de produção de LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub> e PGE<sub>2</sub> em leucócitos estimulados (Vieira-de-Abreu e cols., 2005; D`Ávila e cols., 2006). Os mediadores produzidos apresentam características funcionais que dependem das condições de estimulação e tipo celular onde foram sintetizados.

A figura 05 exibe imagens de colocalização das enzimas COX e LO nos corpúsculos lipídicos, bem como alguns de seus produtos metabólicos, como PGE<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub> e LTC<sub>4</sub> em diferentes subtipos celulares e em condições estimulatórias distintas.



**Fig. 05 Demonstração da presença de enzimas da cascata do ácido araquidônico nos corpúsculos lipídicos e produção de mediadores inflamatórios nestas organelas.**

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e COX-2. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela marcação com BODIPY™ (1A) e COX-2 por imunomarcação com anticorpo anti COX-2 murina (1B) (D'Avila e cols., 2006).

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e PGE<sub>2</sub>. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela imunomarcação por ADRP (2A) e PGE<sub>2</sub> por imunomarcação com anticorpo anti-PGE<sub>2</sub> murina produzido em carneiro (2B). Em (2C), sobreposição das imagens em (2A) e (2B) (D'Avila e cols., 2006).

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e 5-LO. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela marcação com BODIPY™ (3A) e 5-LO por imunomarcação com anticorpo anti 5-LO murina (3B) (Pacheco e cols., 2002).

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e LTB<sub>4</sub>. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela imunomarcação por ADRP (4B) e LTB<sub>4</sub> por imunomarcação com anticorpo anti-LTB<sub>4</sub> murino (4A). Em (4C), sobreposição das imagens em (4A) e (4B) (Pacheco e cols., 2007).

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e LTB<sub>4</sub>. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela marcação com Oil Red (5A), marcação por BODIPY™ (5B) e LTB<sub>4</sub> por imunomarcação com anticorpo anti-LTB<sub>4</sub> murino (5C) (Pacheco e cols., 2007).

Colocalização entre corpúsculos lipídicos e LTC<sub>4</sub>. Corpúsculos lipídicos são evidenciados pela imunomarcação por ADRP (6B) e LTC<sub>4</sub> por imunomarcação com anticorpo anti-LTC<sub>4</sub> murino (6A). Em (6C), sobreposição das imagens em (6A) e (6B) (Mesquita-Santos e cols., 2006).

Em (1 e 2), macrófagos ativados *in vivo* pela infecção intrapleural por *M. bovis* BCG (5 x 10<sup>6</sup>/cavidade-24h). Em (3 e 4), leucócitos ativados *in vivo* após injeção intrapleural de LPS (500ng/cavidade-6h). Em (5), macrófagos peritoneais murinos estimulados *in vitro* com MCP-1 recombinante (100nM). Em (6), eosinófilos da cavidade pleural de camundongos sensibilizados por injeção subcutânea de OVA (50µg) e Al(OH)<sub>3</sub> (5mg) em salina nos dias 1 e 7 seguido de desafio por injeção intrapleural de PGD<sub>2</sub> (35pmol/cavidade).

A soma destes dados indica que os corpúsculos lipídicos são regiões citoplasmáticas que participam ativamente de processos inflamatórios, funcionando como plataformas que proporcionam vínculo espaço-temporal otimizado para a geração de eicosanóides, além da presença de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e moléculas capazes de regular diversas vias metabólicas e de transdução de sinais e processos de ativação de leucócitos submetidos a diferentes condições inflamatórias *in vivo* e *in vitro*.

### **1.3.5) Envolvimento dos Corpúsculos Lipídicos na Modulação da Resposta Imune Inata**

O sistema imune inato desempenha papel fundamental na resposta do hospedeiro contra agentes potencialmente deletérios ao exercício das funções fisiológicas. Em vários processos infecciosos, a ativação precoce da resposta inata exerce papel importante no deslocamento do equilíbrio estabelecido entre a capacidade de infectividade do patógeno e o sistema de defesa do organismo, determinando o epílogo desta interação.

O estudo da participação de corpúsculos lipídicos nos eventos inflamatórios e infecciosos tomou grande impulso com a observação de que leucócitos obtidos de pacientes nas mais variadas condições clínicas ou ativados experimentalmente apresentam número e tamanho de corpúsculos lipídicos aumentados. No caso de processos infecciosos, evidências sugerem que os corpúsculos lipídicos poderiam estar relacionados aos mecanismos de patogênese, sobrevivência e multiplicação do agente invasor. Os motivos pelos quais estes patógenos induzem a formação de corpúsculos lipídicos, apesar de extensamente estudados em uma série de agentes etiológicos, não estão completamente elucidados (Bozza e cols., 2007, D'Avila e cols., 2006; Rangel-Moreno e cols., 2002; Freire-de-Lima e cols., 2000).

De especial interesse está a participação de corpúsculos lipídicos na síntese de derivados da via de metabolização do ácido araquidônico. Os derivados da cascata enzimática deste substrato são capazes de exercer funções importantes na modulação da resposta de leucócitos frente a processos inflamatórios e infecciosos.

O ácido araquidônico e seus metabólitos participam ativamente da resposta imune do hospedeiro frente às infecções micobacterianas. Ácido araquidônico livre é capaz de estimular processos de reorganização de actina, além da maturação de fagossomos e apoptose de macrófagos infectados por micobactérias em células

infectadas, mecanismos envolvidos na resposta protetora nas infecções micobacterianas (Anes e cols., 2003; Duan e cols., 2001). A infecção micobacteriana é capaz de induzir ativação de fosfolipase A<sub>2</sub> citosólica, que aumenta os níveis de ácido araquidônico livre, potencializando a atividade micobactericida e apoptose. Estes eventos podem ser reproduzidos experimentalmente pela oferta de ácido araquidônico exógeno a culturas de macrófagos. Cabe ressaltar que a liberação de ácido araquidônico de membranas biológicas, função exercida principalmente pela fosfolipase A<sub>2</sub>, pode desencadear uma resposta dicotômica. Como mencionado, o ácido araquidônico livre exerce efeitos micobactericidas. Todavia, os produtos metabólicos da cascata do ácido araquidônico, como prostaglandinas e lipoxinas, exercem efeitos de redução da capacidade de resposta de macrófagos para patógenos intracelulares, viabilizando o crescimento e multiplicação de patógenos, permitindo o estabelecimento da infecção (Moreno e cols., 2002; Bafica e cols., 2005; Freire-de-Lima e cols., 2000). Esta dicotomização de efeitos a partir de uma mesma molécula enfatiza a necessidade de compreensão profunda dos eventos que conduzem os processos de metabolismo lipídico em células envolvidas em processos inflamatórios.

Macrófagos de animais infectados apresentam aumento significativo no número e tamanho de corpúsculos lipídicos citoplasmáticos. A diferenciação de macrófagos em células espumosas é observada em condições clínicas e experimentais nos sítios periféricos à formação de granulomas tuberculóides, refletindo acúmulo e mobilização de lipídeos intracelulares (Ridley e cols., 1987; Cardona e cols., 2000; Hernandez-Pando e cols., 1997). Infecções *in vivo* de camundongos com *M. bovis* BCG induzem a formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente de dose e tempo. As cinéticas experimentais mostram que a formação destas estruturas ocorre precocemente, sendo observados uma hora após a infecção e mantidos até tempos relativamente prolongados, como quinze dias após a infecção e pico no tempo de vinte e quatro horas (D`Avila e cols., 2006).

Outra particularidade na infecção de macrófagos por *M. bovis* BCG é a constatação de que micobactérias vivas são capazes de manter níveis mais elevados de corpúsculos lipídicos 24 horas após a infecção do que as que foram mortas por aquecimento (D`Avila e cols., 2006), sugerindo pois que as micobactérias vivas e metabolicamente ativas são eficientes na indução e manutenção da formação de corpúsculos lipídicos. De forma interessante, foi descrito que a infecção *in vitro* de macrófagos murinos por *M. smegmatis*, micobactéria não-patogênica, é

incapaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos nas mesmas condições de dose de infecção e tempo experimental em que *M. bovis* BCG, que apresenta maior grau de patogenicidade, é capaz de fazê-lo. O mesmo perfil de falha na indução de corpúsculos lipídicos foi observado para a infecção *in vivo* de *M. smegmatis* intrapleural para todos os tempos avaliados (D`Avila e cols., 2006).

Na infecção intrapleural com *M. bovis* BCG, foi observada marcação para COX-2 e 5-LO colocalizada nos corpúsculos lipídicos gerados 24 horas após a infecção. No mesmo tempo, houve aumento significativo de síntese de PGE<sub>2</sub>, como resultado da ação da enzima COX-2 sobre o ácido araquidônico nos corpúsculos lipídicos, sendo estes os principais sítios no macrófago de produção deste mediador lipídico (D`Avila e cols., 2006). Este mediador lipídico modula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, reduz a capacidade de apresentação antigênica e diminui a capacidade de produção de radicais oxidativos de nitrogênio e oxigênio. A prostaglandina E<sub>2</sub> pode ser capaz de promover redução de citocinas pró-inflamatórias (TNF) e aumento de citocinas antiinflamatórias (IL-10) no contexto da infecção experimental pelo BCG, efeito que é parcialmente revertido pelo uso de fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (Rangel-Moreno e cols., 2002; D`Ávila e cols., 2006). Coletivamente estes dados sugerem que os corpúsculos lipídicos, agindo como sítios intracelulares de síntese de PGE<sub>2</sub> podem desempenhar importante função na modulação da resposta imune de leucócitos, particularmente macrófagos, frente à infecção micobacteriana.

Experimentos conduzidos em camundongos submetidos à infecção micobacteriana ou choque por endotoxina mostraram a compartimentalização de COX-2 e 5-LO nos corpúsculos lipídicos e que a produção de PGE<sub>2</sub> e LTB<sub>4</sub> está correlacionada à geração de corpúsculos lipídicos em vários modelos experimentais de infecção *in vivo* (Pacheco e cols., 2002, 2007; D`Ávila e cols., 2006; Leite e cols., 2005), ratificando o papel destas organelas no contexto da resposta inflamatória.

A importante demonstração de que os corpúsculos lipídicos são os principais sítios produtores de PGE<sub>2</sub> suscita a hipótese de que patógenos intracelulares podem ter desenvolvido métodos de induzir a síntese deste mediador lipídico como um mecanismo elegante de modulação da resposta imune do hospedeiro no contexto de favorecer a sobrevivência e multiplicação patogênica.

Além das infecções bacterianas, parasitos, incluindo *Trypanossoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum* e *Plasmodium berguei* (Melo e cols., 2003; Charron e cols., 2002; Jackson e cols., 2004) são capazes de induzir a

formação de corpúsculos lipídicos. A infecção pelo *T. cruzi* é capaz de promover a produção de eicosanóides (Celentano e cols., 1995; Borges e cols., 1998; Talvani e cols., 2002; Melo e cols., 2003), incluindo PGE<sub>2</sub>, de forma similar aos dados anteriormente citados para outros eventos estimulatórios. Experimentos *in vitro* mostraram que este mediador lipídico produzido por macrófagos envolvidos na fagocitose de células apoptóticas poderia criar um microambiente favorável ao desenvolvimento da infecção por *T. cruzi* (Freire de Lima e cols., 2000). O uso de ácido acetilsalicílico, um fármaco antiinflamatório, apresenta atividade dicotômica, podendo reduzir ou aumentar a mortalidade de camundongos induzida pela infecção por *T. cruzi* dependendo da dose do fármaco e da cepa do parasito utilizada (Celentano e cols., 1995; Freire de Lima e cols., 2000). A participação de macrófagos na resposta imune na infecção pelo *T. cruzi* é determinante no controle do parasitismo, uma vez que ratos depletados destas células apresentam maior carga parasitária no miocárdio (Melo & Machado, 2001), sendo esta carga reduzida nos animais tratados com IFN- $\gamma$  recombinante (Revelli e cols., 1998). Por outro lado, dados sugerem que a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de prostaglandinas poderiam ser decorrentes de um potente evento de ativação dos macrófagos com síntese de eicosanóides não diretamente relacionada à replicação parasitária (Melo e cols., 1999; Melo e Machado, 2001), mostrando ser um erro a análise linear simplista das observações experimentais e que uma rede complexa de eventos relacionados ao desenvolvimento do processo patológico que modulam a capacidade de sobrevivência e replicação parasitária.

Nas infecções por *T. cruzi* e *M. bovis* BCG foi observado íntimo contato entre os corpúsculos lipídicos gerados e os fagossomos (D'Avila e cols., 2006; Melo e cols., 2003), inclusive com constatação da presença de corpúsculos lipídicos no interior de fagossomos para a infecção por *T. cruzi* (Melo e cols., 2003). De forma aditiva, a observação da associação entre corpúsculos lipídicos ricos em araquidonato e fagossomos contendo partículas de látex em neutrófilos revela dado importante, uma vez que o ácido araquidônico está envolvido na ativação de NADPH oxidase e maturação de fagossomos em macrófagos e neutrófilos (van Manen e cols., 2005). Estes dados reforçam a hipótese da ocorrência de interações que poderiam ser determinantes do balanço estabelecido entre patógeno e hospedeiro no âmbito da resposta imune, apesar do significado biológico desta proximidade entre corpúsculos lipídicos e fagossomas ainda não ter sido elucidado.

Além da capacidade de modulação da resposta imune através de alterações no perfil de produção de mediadores inflamatórios via corpúsculos lipídicos, foi descrito que alguns patógenos são capazes de mobilização de componentes dos corpúsculos lipídicos que seriam usados como fonte nutricional, como parte do mecanismo de patogenia. Esta constatação foi observada para a mobilização de ácido araquidônico de corpúsculos lipídicos em células epiteliais respiratórias por *Pseudomonas aeruginosa* (Plotkwoski e cols., 2008) e pelo acúmulo de lipídeos provenientes de corpúsculos lipídicos por micobactérias e capacidade destas em sobreviver em adipócitos (Neyrolles e cols., 2006). Nas infecções micobacterianas, foi observado íntimo contato entre fagossomos contendo micobactérias e os corpúsculos lipídicos (Luo e cols., 2005; D`Ávila e cols., 2006). De forma aditiva, foi descrito que a persistência micobacteriana requer utilização de fontes de colesterol do hospedeiro (Pandey & Sasseti, 2008), de forma que os corpúsculos lipídicos poderiam participar como fonte de tal molécula.

Em conjunto, estas constatações reforçam o papel dos corpúsculos lipídicos como possíveis moduladores da resposta imune em leucócitos tendo assim presumível função no balanço estabelecido entre patógeno-hospedeiro.

No contexto de processos infecciosos, a modulação da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos representaria uma estratégia terapêutica interessante, dada a participação destas organelas na produção de mediadores lipídicos e influência na síntese de citocinas inflamatórias, de forma a reverter o possível mecanismo de modulação da resposta imune desempenhado por bactérias patogênicas sobre a maquinaria dos corpúsculos lipídicos.

Neste sentido, a ampliação da compreensão dos processos de formação e funcionalidade dos corpúsculos lipídicos frente às infecções por patógenos se faz imperativa, representando o principal objetivo deste estudo que teve como foco a infecção *in vitro* por *M. bovis* BCG.

## 2) Objetivo Geral

Avaliar a formação e a função dos corpúsculos lipídicos induzidos nas infecções por patógenos intracelulares e a influência deste evento na sobrevivência e/ou multiplicação destes patógenos, usando como modelo a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais pelo *M. bovis* BCG.

### 2.1) Objetivos Específicos

- 1) Verificar a capacidade da infecção *in vitro* de macrófagos por *M. bovis* BCG em induzir a formação de corpúsculos lipídicos nestas células.
- 2) Analisar a influência do uso de antiinflamatórios não-esteroidais (AAS e NS-398) e do inibidor de ácido graxo sintase (C75) sobre a formação de corpúsculos lipídicos.
- 3) Verificar a relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos infectado *in vitro* por BCG e após os tratamentos com AAS, NS-398 e C75.
- 4) Avaliar a capacidade da formação de corpúsculos lipídicos, assim como o efeito da inibição da formação destas organelas sobre o perfil de citocinas produzidas na infecção por *M. bovis* BCG.
- 5) Analisar a capacidade de neutrófilos apoptóticos de induzir a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub> em culturas de macrófagos *in vitro* infectados ou não por *M. bovis* BCG.
- 6) Avaliar o impacto da formação de corpúsculos lipídicos na sobrevivência e/ou multiplicação micobacteriana.

### **3) Material e Metodologias**

#### **3.1) Animais**

Foram utilizados neste estudo animais susceptíveis à infecção por *M. bovis* BCG da linhagem C57BL/6 com massa corporal variando de 16 a 22 gramas de ambos os sexos obtidos do biotério central da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos em condições de acesso livre à comida e água, temperatura média de 22°C (20-24°C) e ciclos diários alternados de luz e escuro de 12 horas cada no biotério de experimentação do Pavilhão Osório de Almeida do Instituto Oswaldo Cruz. Todos os experimentos realizados e protocolos de testes foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz sob os protocolos 0117-02 e L-0002/08.

#### **3.2) BCG**

Para infecção dos macrófagos peritoneais murinos e macrófagos diferenciados de precursores de medula óssea, foi utilizado *Mycobacterium bovis* BCG cepa vacinal (Fundação Atauilpho de Paiva). As ampolas na apresentação de 40mg (200 x 10<sup>6</sup> bactérias) foram abertas em fluxo laminar vertical e ressuspensas em 4,0 mL de PBS estéril. A seguir, a suspensão bacteriana foi submetida a passagens sucessivas (vinte vezes) em seringa de 5,0 mL com agulha 13 x 0,45 mm 26 G<sub>1/2</sub> para desfazer grumos celulares. Alíquotas da suspensão bacteriana foram observadas ao microscópio para constatação da desagregação dos grumos. A suspensão foi diluída em meio de cultivo celular RPMI 1640 1% penicilina + estreptomicina (100 UI/mL final) até obtenção das concentrações finais de uso.

#### **3.3) Cultura e Infecção de Macrófagos Peritoneais**

Macrófagos peritoneais de camundongos isogênicos C57BL/6 foram obtidos através de coleta de lavado peritoneal com 3,0 mL PBS estéril e recolhidos em tubos de centrífuga de 15 mL estéreis mantidos sob refrigeração em banho de gelo. As células foram centrifugadas a 1200 rpm a 4°C por 10 minutos. Os sobrenadantes obtidos foram descartados e as células ressuspensas e lavadas com PBS estéril, procedimento este repetido duas vezes. Após a última centrifugação, as células

foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (Hyclone) 2% Soro Fetal Bovino (SFB) e 1% penicilina + estreptomicina (100 UI/mL final). Parte do volume desta suspensão celular (10 µL) foi diluída em 390 µL de líquido de Turk (3% ácido acético) e submetidos à contagem em câmara de Neubauer, permitindo o ajuste de concentração da suspensão celular para  $1,0 \times 10^6$  células / mL.

Placas de cultura de 24 poços estéreis tiveram seus poços cobertos por lamínulas de vidro estéreis para o cultivo de células. Em cada um dos poços das placas foi adicionado 1,0 mL da suspensão celular ajustada para  $1,0 \times 10^6$  células / mL e submetidas à incubação a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C por duas horas para permitir adesão das células às lamínulas. A seguir as células foram cuidadosamente lavadas com PBS estéril para remoção das células não-aderentes e então infectadas com *Mycobacterium bovis* BCG (cepa vacinal FAP-Fundação Atauilpho de Paiva) em diferentes multiplicidades de infecção (MOI) (5:1 e 1:1 bactéria:célula) e novamente incubadas por uma hora em estufa nas mesmas condições anteriormente citadas. Após este tempo, foram efetuadas duas lavagens com PBS estéril para remoção das bactérias não-interiorizadas e adicionado meio RPMI 1640 2% SFB 1% penicilina + estreptomicina e gentamicina (NovaFarma) na concentração de 50 µL/mL para eliminação das bactérias não-interiorizadas. Após incubação de duas horas, as células foram novamente lavadas cuidadosamente com PBS estéril e então cultivadas em meio RPMI 1640 2% SFB 1% penicilina + estreptomicina por 24 horas em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C.

Os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -20°C para posterior quantificação de citocinas e mediadores lipídicos.

### **3.4) Tratamentos por Inibidores da Formação de Corpúsculos Lipídicos**

Os tratamentos empregados para inibir a formação de corpúsculos lipídicos foram adicionados separadamente às culturas logo após a última lavagem para remoção da gentamicina, conforme descrito acima.

Antiinflamatórios não-esteroidais foram descritos na bibliografia como fármacos capazes de modular negativamente a formação de corpúsculos lipídicos em diversos modelos experimentais, por mecanismos independentes de seus efeitos sobre as ciclooxigenases (Bozza e cols., 1996, 2002; D`Avila e cols., 2006). Neste estudo foram empregados os antiinflamatórios ácido acetilsalicílico (AAS) e NS-398 nas concentrações finais de 5 µM e 1 µM nas culturas de macrófagos. O AAS

(Sigma-Aldrich) em pó foi preparado no momento da utilização através de pesagem de 18,0 mg em balança de precisão seguido de ressuspensão em 1,0 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído no meio de cultura RPMI até a concentração final de 5  $\mu$ M, sendo utilizado após processo de filtração em seringa com filtro de 0,22  $\mu$ m. O NS-398 (Cayman Chemical) em solução estoque de DMSO na concentração de 20 mM foi diluído no meio de cultura RPMI até a concentração final de 1  $\mu$ M que foi utilizado após processo de filtração em seringa com filtro de 0,22  $\mu$ m.

Para utilização de outra estratégia para inibir a formação de corpúsculos lipídicos por molécula que não envolva inibição de COX, foi utilizado o C75, um inibidor do domínio tioesterase do complexo enzimático ácido graxo sintase, tendo sido descrita sua capacidade em inibir a formação destas organelas (Accioly e cols., 2008; Cheng e cols., 2008).

O C75 (Sigma-Aldrich) foi obtido na forma liofilizada em frasco de 5 mg, e dissolvido em DMSO até a concentração estoque de 10 mg/mL, que foi diluído no meio de cultura RPMI até a concentração final de 5  $\mu$ g/mL, sendo utilizado após processo de filtração em seringa com filtro de 0,22  $\mu$ m.

Para os tratamentos cujo veículo foi o DMSO, foram feitos ensaios de viabilidade (> 90%) e veículo (DMSO 0,01% em RPMI) foi usado como controle.

### **3.5) Obtenção de Neutrófilos Apoptóticos**

Camundongos C57BL/6 foram submetidos à eutanásia em atmosfera controlada de CO<sub>2</sub>. Seus fêmures foram removidos e lavados com 3,0 mL de HBSS livre de cálcio e magnésio. As células obtidas foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C, lavadas e ressuspensas em 5,0 mL de meio de cultura HBSS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>. Esta suspensão celular foi cuidadosamente colocada no topo de gradiente de Percoll descontínuo, com densidades de 40 e 72%. O sistema foi submetido à centrifugação a 3500 rpm durante 60 minutos e então os neutrófilos foram recuperados da interface formada (pureza superior a 95%). Os neutrófilos foram lavados duas vezes com HBSS livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> e centrifugados a 2000 rpm por 10 minutos, sendo ao final ressuspensos em RPMI 1640. Estas células foram submetidas à irradiação U.V. a 254 nm por 10 minutos, sendo a seguir, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> por 4 horas. A avaliação de percentual de células apoptóticas foi feita pelo uso de kit TACS Annexin-V FITC da R&D Systems, conforme instruções

do fabricante. As células foram consideradas apoptóticas quando constatada marcação positiva para anexina-V e negativa para iodeto de propídio no microscópio de fluorescência. O percentual de apoptose avaliado por marcação com Anexina V mostrou percentuais de apoptose superiores a 90%.

Células necróticas foram obtidas sob o mesmo protocolo, substituindo o protocolo de exposição à irradiação U.V. por congelamento três vezes sem quaisquer cuidados preconizados em protocolos de congelamento que visem manutenção de viabilidade celular, como uso de meio de DMSO e soro fetal bovino. As células foram lavadas três vezes para remoção de enzimas citoplasmáticas provenientes de lise celular antes do uso.

Nos experimentos para avaliação da formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub>, os neutrófilos vivos, necróticos, ou apoptóticos foram adicionados às culturas de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG (cepa vacinal FAP-Fundação Ataulpho de Paiva) na proporção de 5 bactérias por macrófago. As culturas de macrófagos foram lavadas com PBS estéril 2 horas após a infecção. Os neutrófilos nas condições acima descritas foram adicionados na proporção de 3 células por macrófago. Nestes experimentos não foi empregado o antibiótico gentamicina pós-infecção pelo BCG, sendo as demais etapas idênticas àquelas descritas no item 3.2.

Os protocolos especificados acima foram adaptados dos protocolos descritos nas seguintes publicações: Fadok e cols., 1998; Griffith e cols., 1996.

### **3.6) Coloração de Corpúsculos Lipídicos**

As células aderidas às lamínulas de vidro foram submetidas à coloração para visualização e contagem dos corpúsculos através de impregnação por tetróxido de ósmio conforme protocolo experimental padrão já estabelecido no laboratório e descrito em Bozza e cols., 1996.

Brevemente, as células aderidas às lamínulas de vidro foram fixadas em formaldeído 3,7% por 30 minutos e lavadas por duas vezes com água MiliQ. A seguir cada um dos poços recebeu 4 gotas de tampão cacodilato e 1 gota de solução de tetróxido de ósmio 1,5% (Sigma-Aldrich) e a placa foi incubada por 30 minutos ao abrigo da luz. A seguir, poços foram lavados com água MiliQ duas vezes e foram adicionados aos poços 3 gotas de tiocarbohidrazida (Sigma-Aldrich), sendo incubada por 5 minutos ao abrigo da luz. Os poços foram novamente lavados com

água MiliQ por três vezes e então foi repetida a etapa de adição de tampão cacodilato e tetróxido de ósmio nas mesmas quantidades empregadas anteriormente e feito novo tempo de incubação de 3 minutos ao abrigo da luz. Os poços foram então lavados duas vezes com água MiliQ e após secagem das lamínulas na capela de exaustão, estas foram montadas sobre lâminas de vidro para visualização e contagem dos corpúsculos lipídicos.

O número de corpúsculos lipídicos foi avaliado por contagem em microscópio de campo claro sob magnificação de 1000 vezes (objetiva 100x em imersão). Foi contado o número de corpúsculos lipídicos em 50 células consecutivas de cada poço testado e os valores representativos de média, desvio e erro padrão foram calculados a partir destas contagens.

### **3.7) Avaliação de Crescimento Micobacteriano**

Para realização de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), macrófagos foram submetidas aos mesmos processos de cultivo descritos acima em placas de 24 poços sem lamínulas de vidro estéreis utilizadas para os ensaios de contagem de corpúsculos. Após o último período de incubação de 24 horas, os sobrenadantes foram descartados e foram adicionados a cada poço 500 µL de saponina 1% estéril, sendo a placa incubada em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C por 20 minutos. Após esse tempo, o conteúdo dos poços foi levemente homogeneizado e 50 µL de cada poço foram dispersos com auxílio de alças bacteriológicas estéreis em placas de petri contendo 20 mL meio de crescimento 7H10 (Difco Middlebrook) suplementado com 10% de OADC (BBL Middlebrook) adicionado previamente e devidamente já solidificado. As placas foram então incubadas em estufa a 5% CO<sub>2</sub> e 37°C por período de 21 a 30 dias e submetidas à contagem de UFC.

### **3.8) Quantificação de Mediadores Lipídicos e Citocinas**

#### **3.8.1) Dosagem de PGE<sub>2</sub>**

A quantificação de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) foi realizada através de ensaio imunoenzimático de competição, seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante do kit (Cayman Chemical). As placas pré-recobertas com IgG anti-camundongo produzida em carneiro receberam quantidades definidas de anticorpo monoclonal

anti-PGE<sub>2</sub>, da amostra experimental dosada (com diferentes concentrações de PGE<sub>2</sub>) e de uma forma de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase. Esta PGE<sub>2</sub> conjugada compete pelos sítios de ligação de PGE<sub>2</sub> nos anticorpos monoclonais com a PGE<sub>2</sub> da amostra experimental de forma a estabelecer um equilíbrio de ligações químicas tais que a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase será menor quanto maior for a concentração de PGE<sub>2</sub> da amostra experimental. A seguir foi dado ao sistema um reagente que contém substrato para a enzima acetilcolinesterase (acetiltiocolina) que ao sofrer o processo enzimático pela acetilcolinesterase gera tiocolina que por sua vez se conjuga ao ácido 2-nitrobenzóico produzindo o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico que tem absorvância ótima a 412 nm.

Assim, a análise dos resultados foi feita de forma inversa à intensidade do sinal de absorvância, já que quanto maior a concentração de PGE<sub>2</sub> na amostra, menor será a ligação de PGE<sub>2</sub> conjugada à acetilcolinesterase e, portanto, menor a intensidade de absorvância. Os resultados de absorvância foram convertidos em concentrações de PGE<sub>2</sub> pela comparação dos dados com os gerados pela curva padrão construída com concentrações conhecidas de PGE<sub>2</sub>.

### **3.8.2) Dosagem de TNF- $\alpha$ e IL-10 por ELISA**

Os protocolos experimentais de quantificação destas duas citocinas apresentam grande similaridade, sendo descritas a seguir em conjunto. A quantificação de TNF- $\alpha$  e IL-10 foi feita pela técnica de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) de acordo com as instruções do kit fornecidas pelo fabricante (R&D Systems). As placas de 96 poços foram submetidas ao processo de “coating” com 100  $\mu$ L de anticorpo de captura (anti-TNF- $\alpha$  murino produzido em cabra - 0,8  $\mu$ g/mL ou anti IL-10 murina produzido em rato - 2  $\mu$ g / mL) pelo período de 18 horas à temperatura ambiente. A seguir, os poços foram lavados com tampão de lavagem (PBS pH 7,2-7,4 contendo 0,05% de Tween 20) por três vezes sendo posteriormente empregados 300  $\mu$ L de tampão de bloqueio (PBS 1% albumina bovina) por 1 hora à temperatura ambiente, quando foram lavadas novamente com tampão de lavagem conforme descrito acima.

As amostras foram adicionadas no volume de 100  $\mu$ L por poço, salvo nos poços reservados para a curva padrão e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Os poços foram então lavados com tampão descrito anteriormente, sendo

a seguir adicionados 100 µL por poço de anticorpos de detecção (anti-TNF- $\alpha$  murino produzido em cabra biotilado - 300 ng / mL ou anti-IL-10 murina produzido em cabra biotilado - 400 ng / mL) e novamente submetido à incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Uma nova etapa de lavagem foi efetuada e foram adicionados 100 µL por poço de estreptavidina conjugada à peroxidase de raiz forte (HRP). Após 20 minutos ao abrigo da luz, os poços foram novamente lavados com tampão e foram adicionados 100 µL por poço de solução substrato (peróxido de hidrogênio 1:1 tetrametilbenzidina). A reação ocorreu à temperatura ambiente ao abrigo da luz sendo, a seguir, adicionados 50 µL de solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) a cada um dos poços e as placas foram submetidas à leitura de densidade ótica a 450 nm e as respectivas densidades óticas foram transformadas em concentrações de TNF- $\alpha$  ou IL-10 pela comparação com os dados obtidos da curva padrão feita com concentrações conhecidas destas citocinas. A curva foi construída a partir de diluições seriadas 1:2 em PBS contendo 1% de albumina bovina e 0,05% de Tween, iniciando em 2000 pg/mL para ambas citocinas.

### **3.8.3) Dosagem de TNF e IL-10 por Luminex**

Kits para a detecção simultânea de citocinas murinas (TNF- $\alpha$  e IL-10) foram obtidos e os ensaios de quantificação foram realizados conforme recomendações do fabricante (Uspstate, Lake placid, NY). Resumidamente, 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, Bredford, MA). As amostras foram incubadas com 50 µl da mistura de microesferas acopladas aos anticorpos específicos (2000 microesferas / poço) à temperatura ambiente por 90 minutos 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) e incubado por 90 minutos à temperatura ambiente no escuro. Findo este tempo, foi adicionada estreptavidina acoplada ao fluoróforo (25 µl/poço) e incubada 10 minutos 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. As amostras foram 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.

### **3.9) Análises Estatísticas**

Os resultados obtidos neste estudo foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão e a análise estatística foi avaliada através dos testes paramétricos ANOVA e Student's t-test. Foram considerados significativos valores de  $p < 0,05$ .

## 4) Resultados

### 4.1) Avaliação da Formação de Corpúsculos Lipídicos

A biogênese de corpúsculos lipídicos pode ser desencadeada por uma série de substâncias envolvidas em processos inflamatórios, como PAF, LPS, ativadores de PKC, quimiocinas (eotaxina e RANTES), interleucinas (IL-5, IL-16), além de vários agentes infecciosos, tendo como exemplo as micobactérias patogênicas e *Trypanossoma cruzi* (Bozza e cols., 2007; D'Avila e cols., 2006, 2008; Melo e cols., 2003).

Nossos resultados mostraram que a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos por *M. bovis* BCG por 24 horas induz nestas células a formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente da dose, sendo esta indução estatisticamente significativa (Fig. 06).

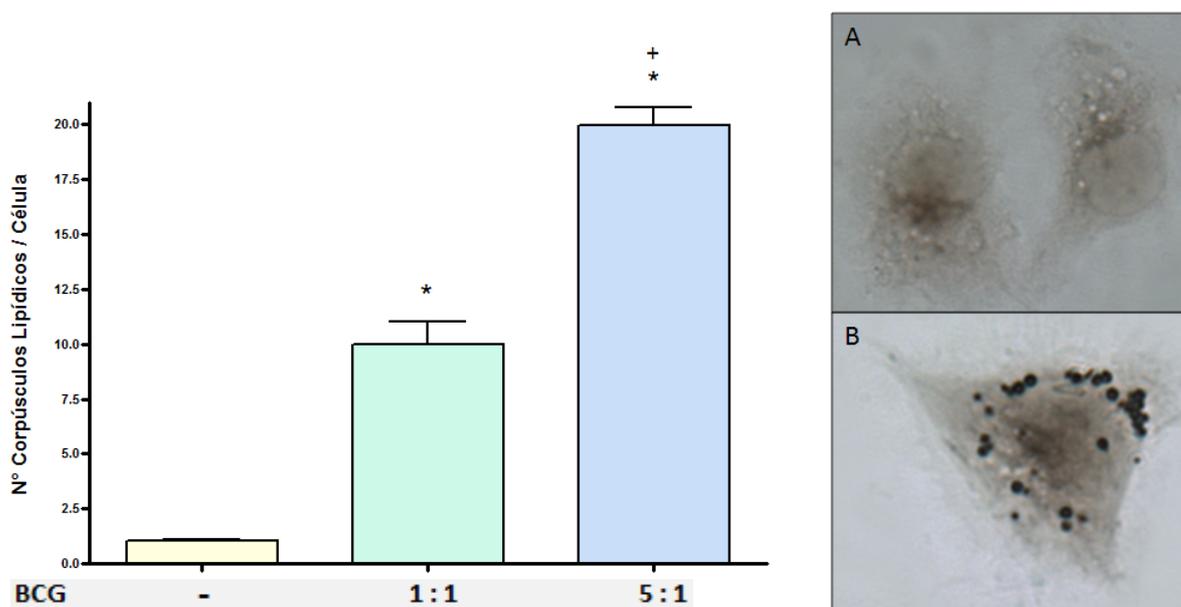


Fig. 06 Biogênese de Corpúsculos Lipídicos em Macrófagos Infectados por *M. bovis* BCG.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 e 5:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas. Para contagem de corpúsculos lipídicos, as células foram submetidas à coloração por tetróxido de ósmio. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos de 3 grupos independentes de 3 animais cada (n=3). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos não-infectados e macrófagos infectados por BCG na proporção de 1:1 (bactéria : célula). (+) indica diferença estatisticamente significativa entre o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados por BCG na proporção de 5:1 (bactéria : célula) e macrófagos infectados por BCG na proporção de 1:1 (bactéria : célula). B) Micrografia de macrófagos peritoneais murinos não-infectados (A) e infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG (MOI 1:1) pelo período de 24 horas (B), sendo evidenciados os corpúsculos lipídicos visualizados sob coloração por tetróxido de ósmio.

A adição de moléculas inibidoras que apresentam efeitos inibitórios sobre as ciclooxigenases (COX), a saber o AAS (inibidor não-seletivo de COX) e NS-398 (inibidor seletivo de COX-2) foram capazes de inibir a biogênese dos corpúsculos lipídicos de forma estatisticamente significativa (Fig. 07).

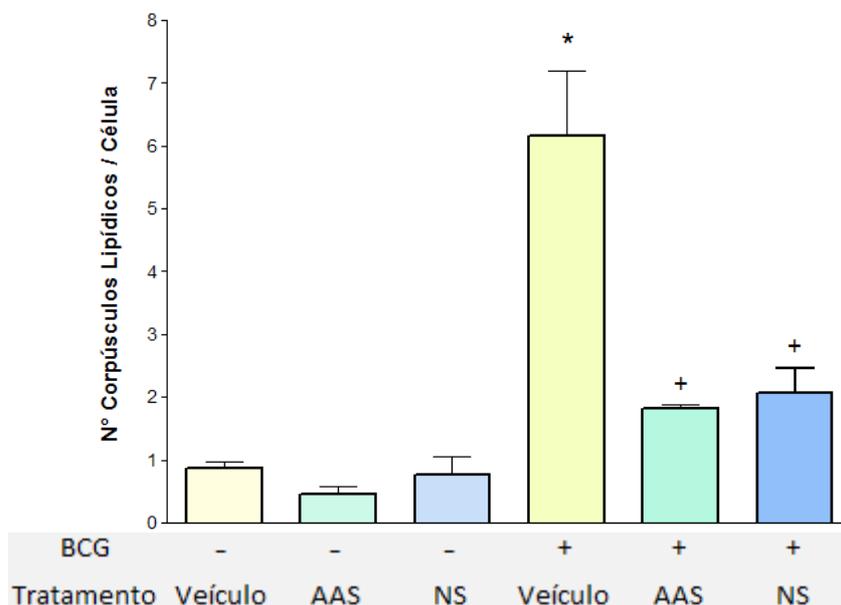


Fig. 07 Modulação da formação de corpúsculos lipídicos por inibidores de ciclooxigenase.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio de cultura mais veículo ou tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). As células foram a seguir submetidas à coloração por tetróxido de ósmio. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos de 6 grupos de 5 animais cada em 2 experimentos independentes, sendo representativos de 7 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa entre o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com AAS ou NS-398.

A seguir, o processo de modulação da formação de corpúsculos lipídicos foi avaliado por uma nova abordagem. O anabolismo lipídico é efetuado em basicamente duas etapas repetitivas. A primeira é efetuada pela geração de moléculas de malonil CoA a partir de acetil CoA pela ação de duas enzimas sucessivas (biotina carboxilase e transcarboxilase), que catalisam a adição de uma carboxila à extremidade do acetil CoA. A seguir, as moléculas de malonil CoA entram em um processo repetitivo de adição de resíduos de ácido carboxílico de 2 carbonos pela ação do complexo multienzimático denominado ácido graxo sintase. Este complexo catalisa reações seqüenciais de condensação, redução, desidratação e uma nova redução. Este processo cíclico adiciona em cada rodada unidades de 2 carbonos à cadeia de hidrocarbonetos nascente.

A utilização de C75, um inibidor da enzima ácido graxo sintase, promoveu redução estatisticamente significativa na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos induzidos pela infecção por BCG (Fig. 08), assim como para os tratamentos com inibidores de COX descritos acima.

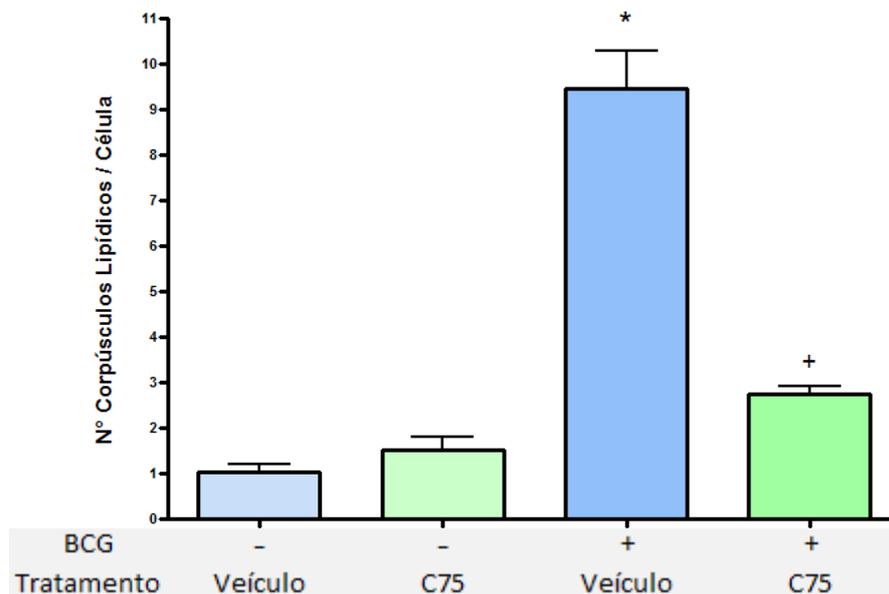


Fig. 08 Modulação da formação de corpúsculos lipídicos pelo inibidor de ácido graxo sintase C75.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio mais veículo ou tratados com C75 (5 µg/mL). Para contagem de corpúsculos lipídicos, as células foram submetidas à coloração por tetróxido de ósmio. Cada barra representa média ± erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos de 6 grupos de 5 animais cada em 2 experimentos independentes, sendo representativos de 7 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ente macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com C75.

#### 4.2) Análise da Produção de PGE<sub>2</sub> em Culturas de Macrófagos Infectados por *M. bovis* BCG

A produção de PGE<sub>2</sub> foi avaliada nos sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG após 24 horas de infecção pelo uso de kit imunoenzimático de competição. Foi observado que a infecção pelo BCG é capaz de induzir potente aumento na produção deste mediador lipídico. Os tratamentos com inibidores de COX conduziram a uma diminuição na produção de PGE<sub>2</sub> pelas células submetidas aos tratamentos em relação aos macrófagos infectados e mantidos somente em meio de cultivo mais veículo (Fig. 09), em paralelo com a inibição observada na formação de corpúsculos lipídicos por estas substâncias.

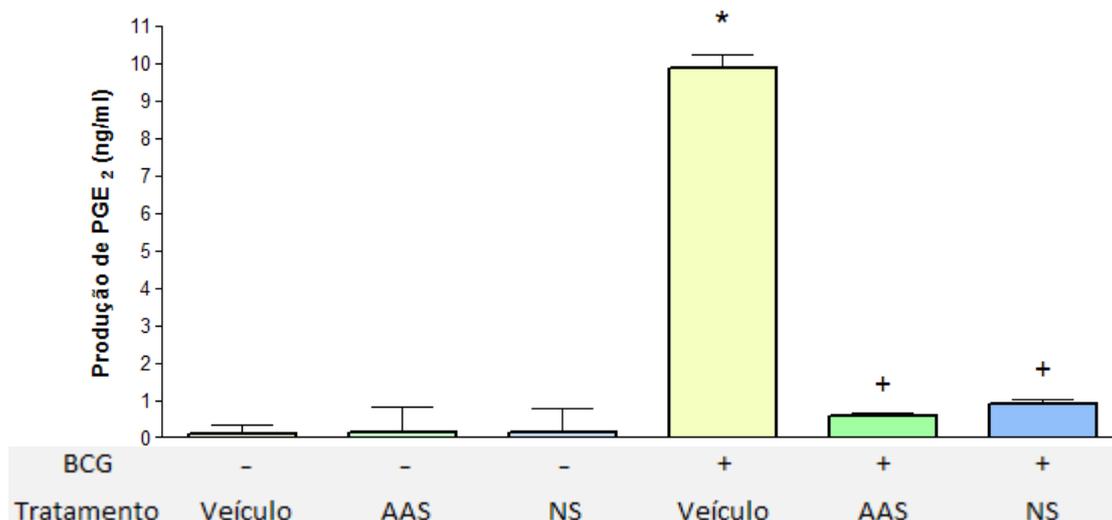


Fig. 09 Efeito dos inibidores de ciclooxigenase na produção de PGE<sub>2</sub>.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio mais veículo ou tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por método imunoenzimático. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada, representativo de 2 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa na produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa na produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com AAS ou NS-398.

O tratamento das culturas de macrófagos infectadas por BCG com C75 promoveu diminuição estatisticamente significativa da formação de PGE<sub>2</sub> (Fig. 10) de forma similar à observada para a inibição da formação de corpúsculos lipídicos por esta substância.

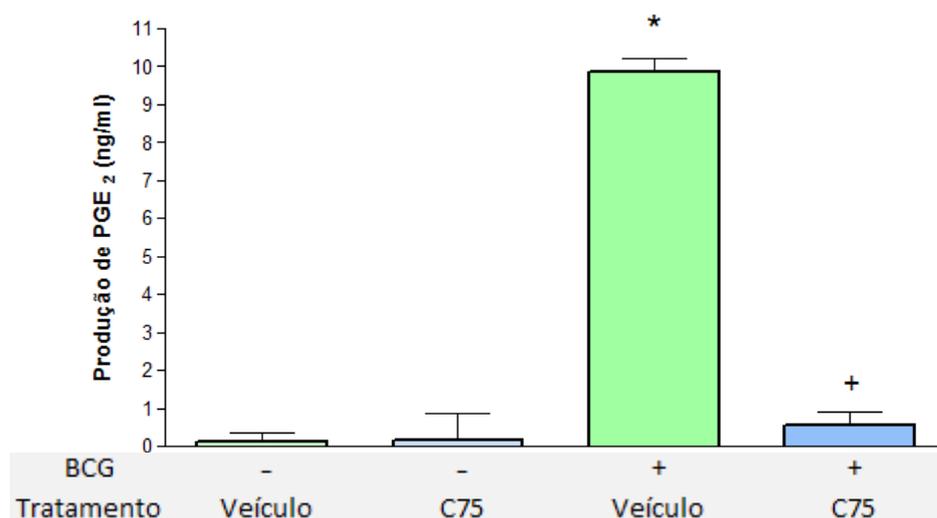


Fig. 10 Efeito do inibidor de ácido graxo sintase na produção de PGE<sub>2</sub>.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio mais veículo ou tratados com C75 (5  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por método imunoenzimático. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada, representativo de 2 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa na produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa na produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com C75.

De acordo com dados da literatura, nossos resultados mostram que a inibição da geração de corpúsculos lipídicos, quer por inibidores de COX ou por inibidor da enzima ácido graxo sintase, conduz também à minimização da produção de PGE<sub>2</sub>, sugerindo o envolvimento dos corpúsculos lipídicos na produção deste mediador lipídico. Observações experimentais anteriores descrevem serem estas organelas os principais sítios intracelulares de produção de PGE<sub>2</sub> (D'Avila e cols., 2006)

#### 4.3) Quantificação de Citocinas nos Sobrenadantes de Cultura de Macrófagos Infectados com *M. bovis* BCG

A produção de citocinas foi avaliada através da dosagem de TNF- $\alpha$ , uma citocina envolvida na potencialização da atividade microbicida em macrófagos e que participa ativamente na formação do granuloma tuberculoso, e IL-10, que demonstra capacidade de inibir a ativação de macrófagos e a produção de citocinas por este.

A infecção em macrófagos murinos pelo BCG foi capaz de induzir aumento nos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-10 (Fig. 11 e 12, respectivamente), uma produção paradoxal de citocinas, já que estão envolvidas em processos antagônicos nas infecções micobacterianas, tornando clara a complexidade de variáveis associadas à patobiologia da infecção pelas micobactérias.

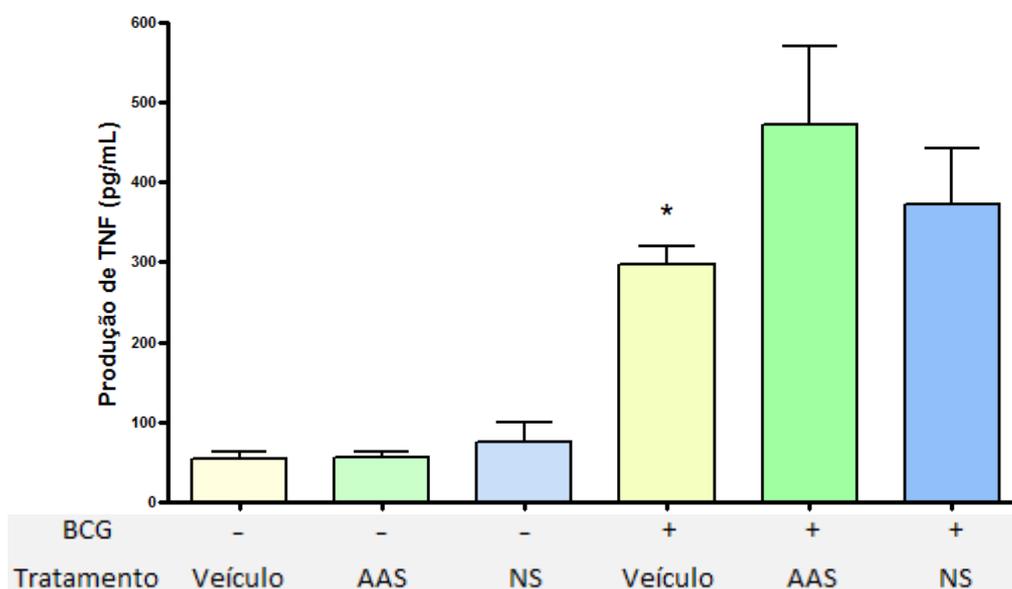


Fig. 11 Modulação da produção de TNF- $\alpha$  por inibidores de ciclooxygenases.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio de cultura mais veículo ou tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de TNF- $\alpha$  por Luminex. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo.

Os tratamentos por inibidores seletivo (NS-398) e não-seletivo (AAS) de COX mostraram tendência de aumento nos níveis de produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 11). É interessante observar que os mesmos tratamentos promoveram tendência de decréscimo nos níveis de produção de IL-10, conforme mostrado na figura 12.

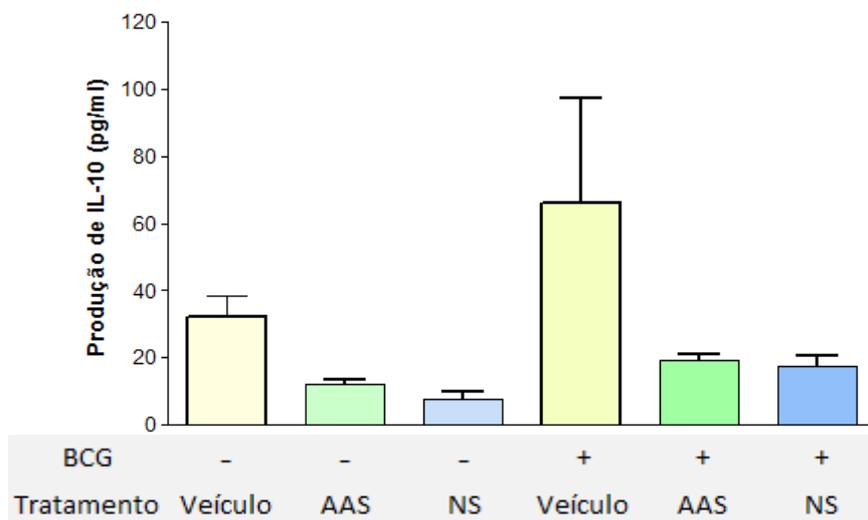


Fig.12 Modulação da produção de IL-10 por inibidores de ciclooxigenases.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio de cultura mais veículo ou tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrífuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de IL-10 por Luminex. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada.

O efeito do inibidor da enzima ácido graxo sintase sobre o perfil de produção de citocinas nos sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG foi também avaliado. O tratamento com C75 promoveu aumento na produção de TNF- $\alpha$ , além de reduzir a produção de IL-10, sendo este de forma estatisticamente significativa (Figs. 13 e 14, respectivamente).

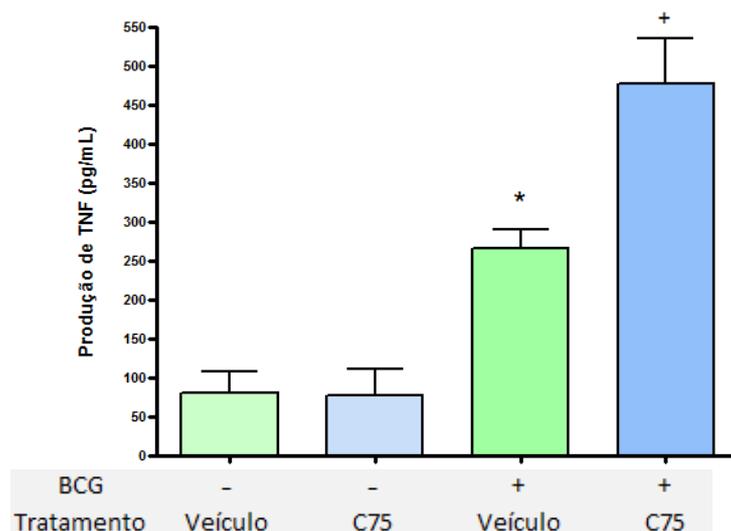


Fig.13 Modulação da produção de TNF- $\alpha$  pelo inibidor de ácido graxo sintase.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio de cultura mais veículo ou tratados com C75 (5  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de TNF- $\alpha$  por Luminex. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes das culturas de macrófagos de pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa entre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com C75.

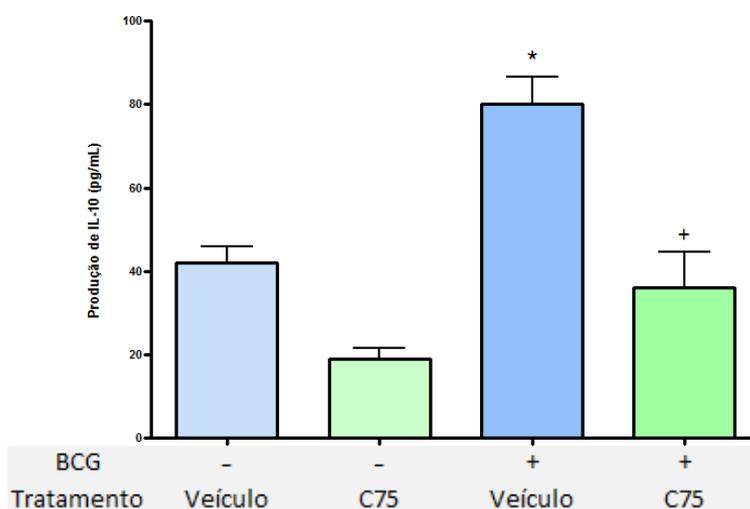


Fig.14 Modulação da produção de IL-10 pelo inibidor de ácido graxo sintase

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago) e mantidos em cultura por período de 24 horas em meio de cultura mais veículo ou tratados com C75 (5  $\mu$ g/mL). Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de IL-10 por método imunoenzimático. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão dos resultados de quantificação de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos pelo menos 3 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre a produção de IL-10 por macrófagos não-infectados e infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa entre a produção de IL-10 por macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com C75.

Desta forma, nossos resultados sugerem que o aumento do número de corpúsculos lipídicos mostra não estar relacionado somente à produção de mediadores de origem lipídica, mas também demonstra capacidade de modular a produção de citocinas em macrófagos infectados por *M. bovis* BCG.

#### 4.4) Efeito de Neutrófilos Apoptóticos sobre a Biogênese de Corpúsculos Lipídicos e Síntese de PGE<sub>2</sub>

Com o objetivo de verificar a capacidade de neutrófilos em diferentes condições celulares de modular a formação de corpúsculos lipídicos e produção de PGE<sub>2</sub>, neutrófilos vivos, necróticos ou apoptóticos foram adicionados às culturas de macrófagos infectadas ou não por *M. bovis* BCG.

Experimentos de cultivo *in vitro* de macrófagos infectados ou não por BCG na presença de neutrófilos vivos, apoptóticos ou necróticos conduziram à constatação de que somente neutrófilos apoptóticos, mas não vivos ou necróticos, são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de forma estatisticamente significativa, efeito potencializado pela infecção por *M. bovis* BCG (Fig. 15).

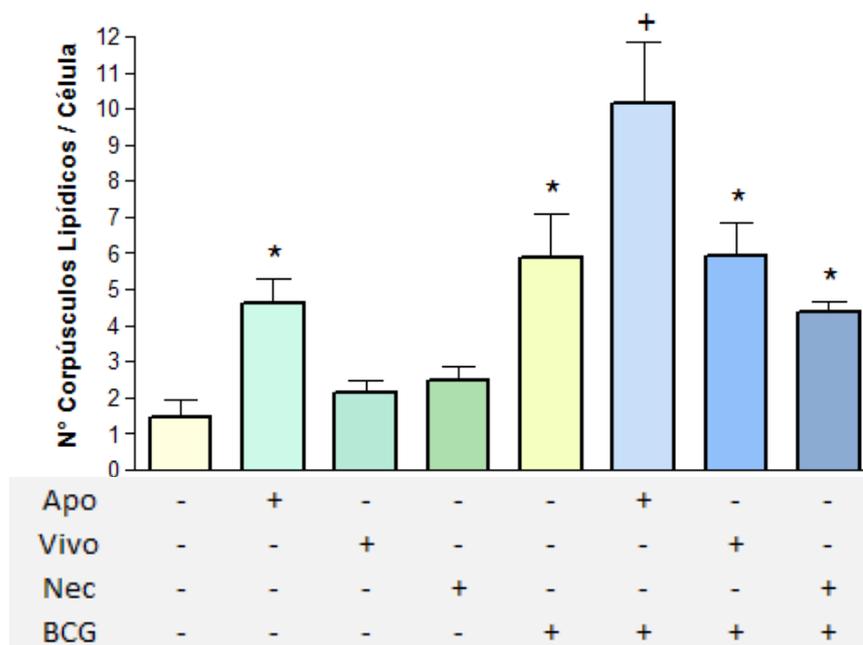


Fig.15 Formação de Corpúsculos Lipídicos Induzida por Neutrófilos em Diferentes Condições de Viabilidade em Macrófagos Infectados ou não por BCG.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos vivos (Vivo), necróticos (Nec) ou apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago. As culturas foram mantidas por 24 horas e submetidas à coloração por tetróxido de ósmio. Cada barra representa média ± erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos não-infectados e macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos, infectados por BCG ou ainda infectadas por BCG na presença de neutrófilos vivos ou na presença de neutrófilos necróticos. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos e macrófagos infectados por BCG na presença de neutrófilos apoptóticos.

A quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes de cultura de macrófagos na presença de neutrófilos apoptóticos mostrou elevação estatisticamente significativa nos níveis deste mediador lipídico. Este aumento foi potencializado pela infecção por *M. bovis* BCG, efeito similar ao observado para a biogênese de corpúsculos lipídicos (Fig. 16).

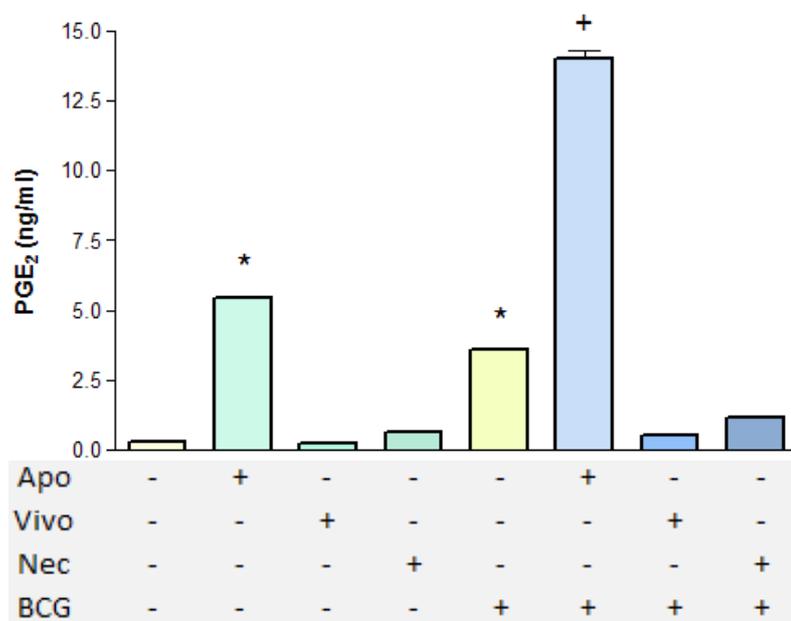


Fig.16 Níveis de Produção de PGE<sub>2</sub> em Culturas de Macrófagos infectadas por BCG e cultivadas com Neutrófilos em Diferentes Condições de Viabilidade.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos vivos (Vivo), necróticos (Nec) ou apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago. As culturas foram mantidas por 24 horas. Os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por método imunoenzimático. Cada barra representa média ± erro padrão dos resultados de quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de macrófagos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ente os níveis de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes de macrófagos não-infectados e macrófagos cultivados na presença de neutrófilos apoptóticos ou infectados por BCG. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente os níveis de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes de macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos e macrófagos infectados por BCG na presença de neutrófilos apoptóticos.

De forma interessante, os tratamentos das culturas de macrófagos com inibidores de COX (AAS ou NS-398) foram capazes de reduzir a formação de corpúsculos lipídicos, tanto para aqueles induzidos somente pela incubação dos macrófagos com neutrófilos apoptóticos quanto na infecção de macrófagos por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos (Fig. 17).

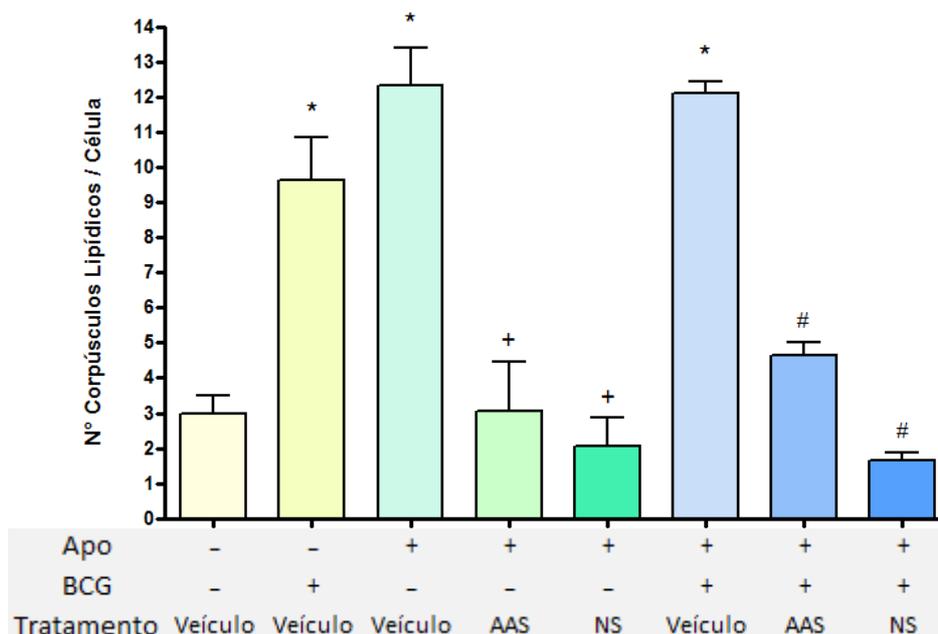


Fig.17 Modulação da Formação de Corpúsculos Lipídicos por Inibidores de COX em macrófagos infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago e tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). As culturas foram mantidas por 24 horas, sendo a seguir submetidas à coloração por tetróxido de ósmio. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos não-infectados e infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos ou ainda macrófagos não infectados na presença de neutrófilos apoptóticos. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com AAS ou NS-398. (#) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos infectados por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com AAS ou NS-398.

O uso de inibidores de COX foi eficaz ainda em reduzir os níveis de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos, bem como nas culturas de macrófagos não-infectados na presença de neutrófilos apoptóticos (Fig. 18).

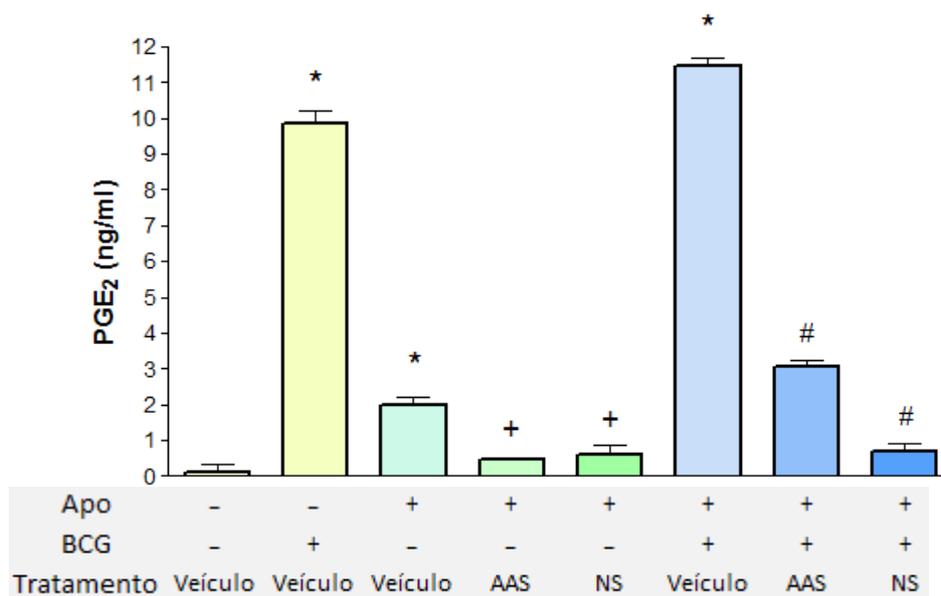


Fig.18 Efeito de Inibidores de COX sobre a Produção PGE<sub>2</sub> em por macrófagos infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago e tratados com AAS (5 µM) ou NS-398 (1 µM). As culturas foram mantidas por 24 horas, quando os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrifuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por método imunoenzimático. Cada barra representa média ± erro padrão dos resultados de quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de macrófagos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos não-infectados e infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos ou ainda macrófagos não-infectados na presença de neutrófilos apoptóticos cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com AAS ou NS-398. (#) indica diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos infectados por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com AAS ou NS-398.

O emprego de C75 promoveu redução no número de corpúsculos lipídicos induzido pela infecção *in vitro* por *M. bovis* BCG, pela adição de neutrófilos apoptóticos às culturas de macrófagos ou ainda pelos dois estímulos em conjunto (Fig. 19).

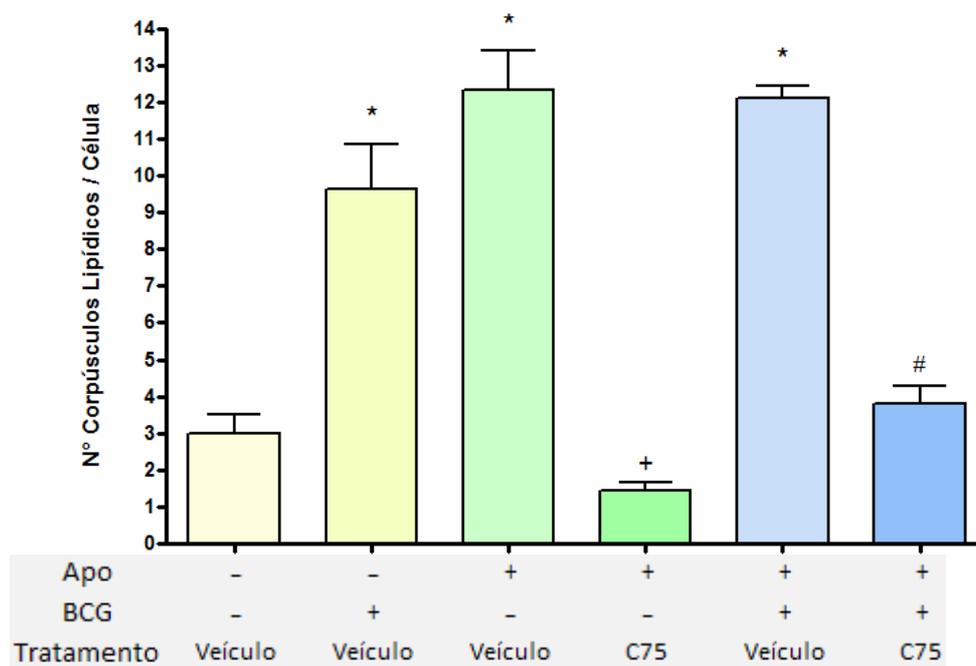


Fig.19 Modulação da Formação de Corpúsculos Lipídicos pelo inibidor de ácido graxo sintase (C75) em culturas de macrófagos infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago e tratadas com C75 (5 µg/mL). As culturas foram mantidas por período de 24 horas, sendo a seguir submetidas à coloração por tetróxido de ósmio para visualização dos corpúsculos lipídicos. Cada barra representa média ± erro padrão de contagem do número de corpúsculos lipídicos em 50 macrófagos consecutivos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos em macrófagos não-infectados e infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos ou ainda macrófagos não infectados na presença de neutrófilos apoptóticos. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com C75. (#) indica diferença estatisticamente significativa ente o número de corpúsculos lipídicos entre macrófagos infectados por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com C75.

A estratégia de inibir a formação dos corpúsculos lipídicos pelo emprego do inibidor da enzima ácido graxo sintase, o C75, mostrou capacidade também de reduzir os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos infectados por BCG na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos e ainda nos sobrenadantes de macrófagos não-infectados na presença de neutrófilos apoptóticos (Fig. 20).

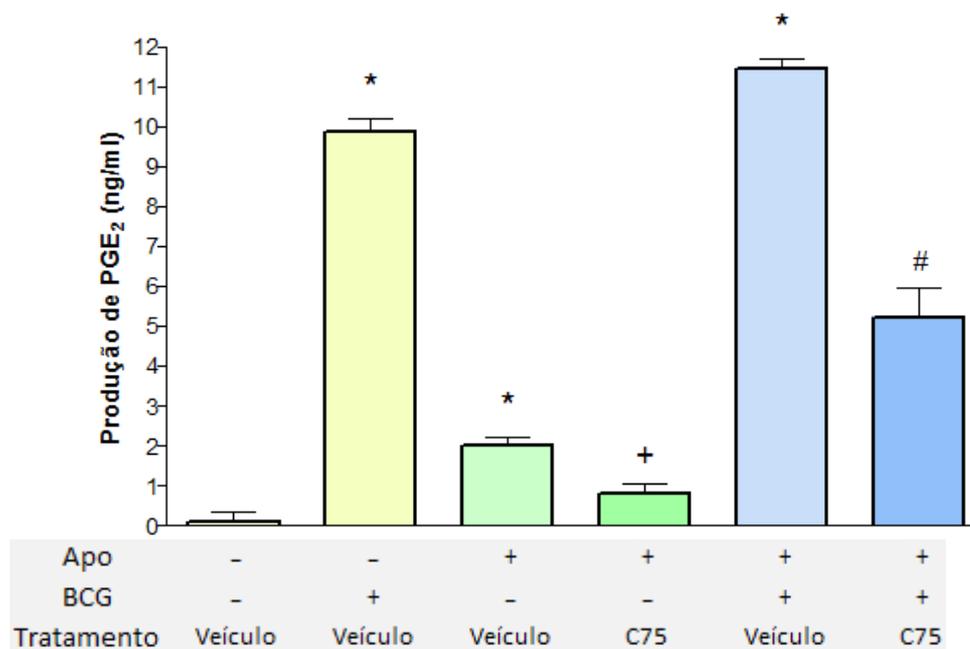


Fig. 20 Efeito do inibidor de ácido graxo sintase (C75) sobre os Níveis de Produção PGE<sub>2</sub> em macrófagos infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 2 horas em multiplicidade de infecção (MOI) de 5:1 (bactéria:macrófago), sendo adicionados, após as lavagens para remoção de bactérias não-interiorizadas, neutrófilos apoptóticos (Apo) na proporção de 3 células por macrófago e tratados com C75 (5 µg/mL). As culturas foram mantidas por 24 horas, quando os sobrenadantes de cultura foram coletados em tubos de microcentrífuga, mantidos sob refrigeração a -20°C até serem utilizados para quantificação de PGE<sub>2</sub> por método imunoenzimático. Cada barra representa média ± erro padrão dos resultados de quantificação de PGE<sub>2</sub> nos sobrenadantes das culturas de macrófagos pelo menos 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada. Valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. (\*) indica diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos não-infectados e infectados por BCG, na presença ou ausência de neutrófilos apoptóticos ou ainda macrófagos não-infectados na presença de neutrófilos apoptóticos cultivados em meio de cultura mais veículo. (+) indica diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos cultivados com neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com C75. (#) indica diferença estatisticamente significativa entre os níveis de PGE<sub>2</sub> produzidos por macrófagos infectados por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos em meio mais veículo e tratados com C75.

#### 4.5) Avaliação do Impacto da Formação de Corpúsculos Lipídicos na Sobrevivência e Multiplicação Micobacterianas

Por fim, o efeito da geração de corpúsculos lipídicos sobre a sobrevivência e multiplicação micobacterianas foi analisado através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) provenientes da permeabilização de macrófagos infectados por *M. bovis* BCG e tratados com as substâncias utilizadas neste estudo (AAS, NS-398 e C75).

Os resultados demonstram que a inibição da formação de corpúsculos lipídicos pelos inibidores de COX está relacionada à menor capacidade de sobrevivência e/ou proliferação do *M. bovis* BCG no microambiente intracelular macrofágico, uma vez que apresentaram menor número de unidades formadoras de colônias (Fig. 21).

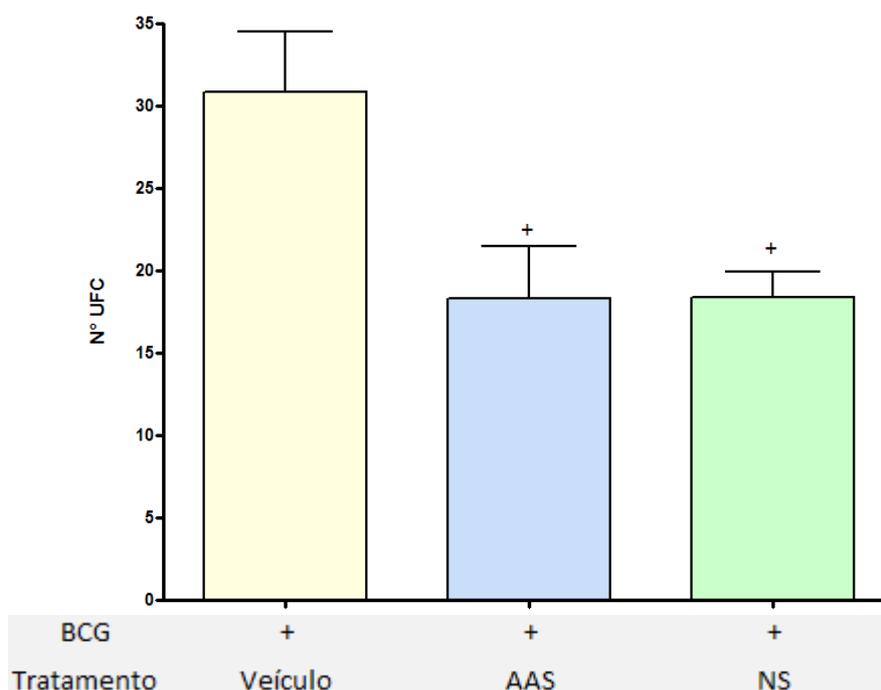


Fig. 21 Efeito da inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos por inibidores de COX na sobrevivência e multiplicação micobacterianas em macrófagos murinos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago), mantidos em cultura por período de 24 horas e tratados com AAS (5  $\mu$ M) ou NS-398 (1  $\mu$ M). Os sobrenadantes dos poços foram descartados e foram adicionado 500  $\mu$ L de saponina 1% estéril a cada um dos poços para permeabilizar os macrófagos. Após incubação de 20 minutos em estufa, 50  $\mu$ L de cada um dos poços foram dispersos em placas de petri contendo meio 7H10 + OADC. Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão de contagem do número de unidades formadoras de colônias de 6 grupos independentes de 3 a 5 animais cada, sendo representativo de 4 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (+) indica diferença estatisticamente significativa entre o crescimento em placas de petri de micobactérias provenientes de macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com AAS ou NS-398.

O tratamento das culturas de macrófagos infectados por BCG com C75 (inibidor de ácido graxo sintase) foi efetivo em reduzir de forma estatisticamente significativa o número de UFC (Fig 22), revelando uma menor capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas quando da inibição da formação de corpúsculos lipídicos.

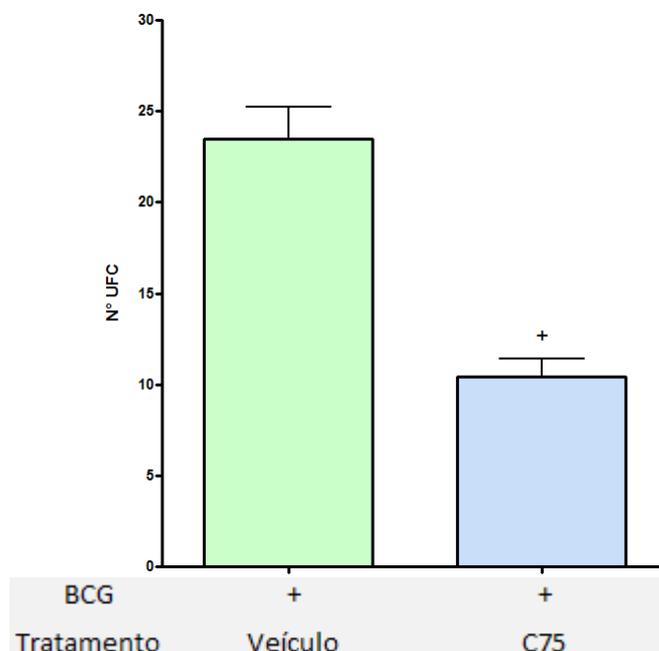


Fig. 22 Efeito da inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos pelo inibidor da ácido graxo sintase na sobrevivência e multiplicação micobacterianas em macrófagos murinos.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG por 1 hora em multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 (bactéria:macrófago), mantidos em cultura por período de 24 horas e tratados com C75 (5 µg/mL). Os sobrenadantes dos poços foram descartados e foram adicionado 500 µL de saponina 1% estéril a cada um dos poços para permeabilizar os macrófagos. Após incubação de 20 minutos em estufa, 50 µL de cada um dos poços foram dispersos em placas de petri contendo meio 7H10 + OADC. Cada barra representa média ± erro padrão de contagem do número de unidades formadoras de colônias de 9 grupos independentes de 3 a 5 animais cada, sendo representativo de 5 experimentos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. (+) indica diferença estatisticamente significativa ente o crescimento em placas de petri de micobactérias provenientes de macrófagos infectados por BCG cultivados em meio de cultura mais veículo e tratados com C75.

## 5) Discussão:

Este estudo teve por principal objetivo avaliar a influência dos corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção por *M. bovis* BCG sobre a modulação da capacidade de resposta de macrófagos e seus mecanismos micobactericidas. Tal influência poderia representar um mecanismo importante no equilíbrio dinâmico estabelecido entre a resposta imune e eventos de sobrevivência e multiplicação bacterianas, conferindo vantagem biológica ao patógeno.

É amplo o número de citações bibliográficas que relacionam corpúsculos lipídicos com parâmetros relacionados aos mais diferentes processos inflamatórios e infecciosos, como revisto recentemente (Bozza e cols., 2007; D`Avila e cols., 2008). Durante processos de estimulação de natureza inflamatória, estes corpúsculos lipídicos aumentam em número e tamanho em diversos subtipos celulares, incluindo macrófagos, mastócitos, eosinófilos e neutrófilos e se tornam sítios de importância significativa na condução do processo inflamatório (Dvorak e cols., 1983; Weller e cols., 1994, 1999; Bozza e cols., 2005).

As infecções micobacterianas estão envolvidas com diversos tipos de ativação celular assim como na geração de mediadores inflamatórios que participam da construção da resposta imune inata e adaptativa para esta infecção. Entre os eventos decorrentes das infecções micobacterianas, assim como para diferentes infecções por agentes patogênicos, está a formação de corpúsculos lipídicos, como revisto recentemente (Bozza e cols., 2007; D`Avila e cols., 2008). Dados pregressos mostram que a infecção de macrófagos peritoneais por micobactérias não patogênicas não é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de forma estatisticamente significativa, efeito também observado para outros agentes inócuos, como o *Bacillus subtilis* e para fagocitose de partículas de látex (D`Ávila e cols., 2006). Estes dados mostram que o processo de formação de corpúsculos induzido por agentes infecciosos é um evento altamente regulado e independente do processo de fagocitose.

Nossos resultados experimentais mostram que a infecção de macrófagos peritoneais *in vitro* por *M. bovis* BCG é capaz de promover a formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente da dose (Fig. 06), concordando com dados anteriores que demonstram que esta indução *in vivo* é dependente de tempo e dose (D`Ávila e cols., 2006).

Apesar da crescente compreensão do envolvimento dos corpúsculos lipídicos em diferentes processos regulatórios de respostas inflamatórias e infecciosas, ainda não foi descrito um inibidor seletivo de sua biogênese. Algumas alternativas para modulação da formação dos corpúsculos lipídicos envolvem o uso de antiinflamatórios não-esteroidais que, agindo por mecanismos independentes de COX, inibem a formação destas estruturas (Bozza e cols., 1996, 2002). Alguns fármacos reduzem a formação de corpúsculos lipídicos e a síntese eicosanóides, como demonstrado na redução do número de corpúsculos lipídicos e da produção de LTC<sub>4</sub> em eosinófilos no processo inflamatório alérgico pelo HQL-79, um inibidor de PGD<sub>2</sub> sintase (Mesquita-Santos e cols., 2006). Extratos de espécies vegetais foram descritos como inibidores da formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos. Dentre eles, as preparações obtidas a partir de *N. procerum* e *C. sympodialis* inibiram a formação destas estruturas e o extrato desta última foi ainda capaz de minimizar a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos obtidos do BAL durante processo alérgico (Vieira-de-Abreu e cols., 2005; Amendoeira e cols., 2005; Bezerra-Santos e cols., 2006). Mais recentemente foram descritas outras moléculas com capacidade de inibição da formação de corpúsculos lipídicos, entre elas o triacsin, um inibidor de acil-CoA sintetase (Iorio e cols., 2003; Matsuda e cols., 2008; Fujimoto e cols., 2006) e C75, inibidor do domínio tioesterase do complexo enzimático ácido graxo sintase (Accioly e cols., 2008; Cheng e cols., 2008).

Neste estudo, o emprego de antiinflamatórios não-esteroidais seletivo (NS-398) ou não seletivo para COX-2 (AAS) promoveu redução estatisticamente significativa na formação de corpúsculos lipídicos (Fig. 07) em macrófagos infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG. De forma similar, o tratamento das culturas infectadas com o inibidor de ácido graxo sintase, C75, promoveu redução estatisticamente significativa no número de corpúsculos lipídicos por macrófago (Fig. 08).

Estes achados corroboram com os dados outrora mencionados de inibição da formação de corpúsculos lipídicos por estes tratamentos em diferentes modelos experimentais e distintas circunstâncias de natureza inflamatória (Bozza e cols., 1996, 2002; Vieira-de-Abreu e cols., 2005) e mesmo para as infecções *in vivo* por *M. bovis* BCG (D'Avila e cols., 2006), legitimando a utilização destes inibidores no modelo de infecção *in vitro* por BCG empregado neste estudo.

A produção de PGE<sub>2</sub> é descrita nas infecções por patógenos intracelulares, entre eles o *T. cruzi* (Melo e cols., 2003; Freire-de-Lima e cols., 2000; D`Avila e cols., em preparação) e *M. bovis* BCG (D`Avila e cols., 2006; Rangel-Moreno e cols., 2002; Shibata e cols., 2005), tendo implicações importantes nos mecanismos de patogênese destes agentes agressores. Nas infecções por *T. cruzi*, o aumento da formação de eicosanóides parece estar envolvido nos mecanismos de patogenicidade da doença de chagas (Celentano e cols., 1995; Borges e cols., 1998; Freire-de-Lima e cols., 2000; Talvani e cols., 2002), além de sua descrita função na inibição da produção de citocinas relacionadas à resposta Th1, como IL-2, IL-12 e IFN-γ (Betz e cols., 1991), inibindo assim a resposta imune que controla uma série de infecções por patógenos intracelulares, incluindo as infecções por micobactérias (Rangel-Moreno e cols., 2002; Raja, 2004).

A avaliação da produção de PGE<sub>2</sub> demonstrou que a infecção *in vitro* por *M. bovis* BCG induz uma produção importante deste mediador lipídico por macrófagos peritoneais murinos (Fig. 09 e 10). De forma interessante, os tratamentos empregados anteriormente na inibição de formação de corpúsculos lipídicos promoveram redução nas quantidades de PGE<sub>2</sub> detectadas nos sobrenadantes destas culturas de macrófagos novamente de forma estatisticamente significativa (Fig. 09 e 10). A correlação entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da capacidade de geração de eicosanóides foi descrita anteriormente em infecções ou produtos de origem bacteriana *in vivo* (Pacheco e cols., 2002, 2007; Leite e cols., 2005; D`Avila e cols., 2006), sendo confirmado para a infecção *in vitro* por *M. bovis* BCG em macrófagos peritonais. Na infecção intrapleural por *M. bovis* BCG, foi observada colocalização das enzimas COX e 5-LO nos corpúsculos lipídicos induzidos por esta infecção (D`Avila e cols., 2006). Neste mesmo estudo, através de técnica capaz de imobilizar mediadores lipídicos em seu sítio de formação (Bandeira-Melo e cols., 2001), foi demonstrado que os corpúsculos lipídicos são os principais sítios intracelulares de formação de PGE<sub>2</sub> (D`Avila e cols., 2006), reforçando o papel dos corpúsculos lipídicos como regiões de síntese de mediadores lipídicos capazes de modular negativamente respostas imunes contra patógenos intracelulares.

A idéia inicial e linear de que o uso de antiinflamatórios não-esteroidais geraria redução da produção de eicosanóides derivados do ácido araquidônico, uma vez que seus efeitos são classicamente descritos como inibidores de ciclooxigenases (enzimas-chave na rota biossintética de produção de

prostaglandinas), apesar de não estar errada, pode ser demasiadamente simplista. Agentes antiinflamatórios são amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias, incluindo artrite (Vane e cols., 1994) pela sua ação inibitória sobre as enzimas ciclooxigenases, bloqueando assim a formação de prostaglandinas (Vane, 1971). Todavia, há uma incompatibilidade na lógica da ação somente sobre as ciclooxigenases e o potencial antiinflamatório, dado que doses muito maiores são necessárias para exercer efeito antiinflamatório, como exemplificado para o efeito anti-reumático *in vivo* (Vane e cols., 1994; Weissmann, 1991) do que aquelas observadas para inibição das ciclooxigenases tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Vane e cols., 1994; Patrono & Patrignani, 1982). De forma aditiva, o salicilato sódico, que demonstra efeito mínimo sobre COX, apresenta eficácia similar ao ácido acetilsalicílico no controle de processos inflamatórios, conforme observado nos pacientes com artrite ou em modelos experimentais de tal patologia (Weissmann, 1991).

Dados da literatura são convergentes e sugerem que os efeitos antiinflamatórios desses fármacos não se devem somente aos efeitos sobre as ciclooxigenases. Antiinflamatórios não-esteroidais são capazes de inibir a ativação de células polimorfonucleares por mecanismos que modulam a síntese de leucotrienos e formação de eicosanóides da via das lipoxigenases ou ainda por efeitos em proteínas ligantes de GTP em membranas de neutrófilos, interferindo com mobilização de cálcio e com níveis de AMPc intracelular (Abramson e cols., 1985, 1991; Villanueva e cols., 1993). Bozza e cols (1996) mostraram que ácido acetilsalicílico e antiinflamatórios não-esteroidais, como indometacina e piroxicam, que não compartilham similaridades estruturais com o AAS, foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzidos em células polimorfonucleares humanas por ácido araquidônico e ácido oleico. O mesmo efeito fora observado para o salicilato de sódio, que não exerce efeito sobre COX.

Corroborando com estes dados, o uso de substâncias que inibem a formação de corpúsculos lipídicos limita a capacidade destas células em gerar eicosanóides. Antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) como ácido acetilsalicílico e indometacina inibem a formação de corpúsculos lipídicos induzida por ácidos graxos insaturados. Estudos com AINEs e salicilato sódico, um fármaco que não apresenta ação sobre ciclooxigenases, e usando animais deficientes geneticamente de COX-1 ou COX-2 mostraram que estes fármacos são capazes de inibir a formação de eicosanóides por mecanismos independentes de suas ações sobre COX, mas diretamente

correlacionada com suas capacidades de inibir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza e cols., 1996, 2002).

Apesar de todas as evidências de que os efeitos de inibição da produção de PGE<sub>2</sub> por antiinflamatório não-esteroidais parecem estar relacionados, sobretudo, à inibição da formação de corpúsculos lipídicos, o mecanismo farmacológico clássico destas moléculas, descritas como inibidores de COX, não permite precisar de forma definitiva ser este o mecanismo de ação sobre a redução na produção de PGE<sub>2</sub> promovida por estes fármacos.

No sentido de ratificar a estreita relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub>, os mesmos experimentos executados com os antiinflamatórios não-esteroidais foram realizados com o emprego de um inibidor da enzima ácido graxo sintase, o C75, cuja capacidade em inibir a formação de corpúsculos lipídicos fora descrita anteriormente (Accioly e cols., 2008; Cheng e cols., 2008). O tratamento das culturas de macrófagos infectadas por *M. bovis* BCG com C75 reduziu o número de corpúsculos lipídicos induzidos por esta infecção. De forma interessante, foi constatada, em paralelo à modulação negativa da formação de corpúsculos lipídicos, a diminuição nos níveis de PGE<sub>2</sub> detectados nos sobrenadantes de culturas de macrófagos que foram submetidos a este tratamento. Assim, o uso de uma molécula que age na inibição da formação de corpúsculos lipídicos e promove redução da produção de PGE<sub>2</sub> sem, no entanto, ter efeitos descritos sobre COX, ampara e reforça a função dos corpúsculos lipídicos como sítios principais na síntese deste mediador lipídico (D`Avila e cols., 2006).

O papel da PGE<sub>2</sub> é alvo de estudo nas infecções por patógenos intracelulares, em modelos experimentais de infecção pulmonar tuberculosa (Rangel-Moreno e cols., 2002) e por *T. cruzi* (Freire-de-Lima e cols., 2000). Nestes estudos, foi demonstrado que este mediador lipídico favorece o crescimento intracelular do patógenos, um efeito que pode ser parcialmente revertido pelo uso de antiinflamatórios não-esteroidais. Estes dados fortalecem a hipótese da utilização moléculas que inibem a produção deste mediador no sentido de desfavorecer sobrevivência de patógenos.

A demonstração da relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da capacidade de produzir PGE<sub>2</sub> e que este mediador está envolvido na sobrevivência de patógenos intracelulares torna os corpúsculos lipídicos alvos de interesse primário no contexto de processos infecciosos.

Macrófagos respondem às infecções micobacterianas com produção de uma série de citocinas, dentre elas, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-12 e IL-10 (Nicod, 2007; Bhatt & Salgame, 2007; D`Avila e cols., 2006; Kaufmann, 2002; Flesch & Kaufmann, 1993). Alguns trabalhos descrevem a estreita relação entre a geração de PGE<sub>2</sub> e a modulação da produção de citocinas pró e antiinflamatórias (Betz e cols., 1991; Renz e cols., 1988).

A avaliação do perfil de citocinas na infecção por *M. bovis* BCG mostrou que as infecções micobacterianas são efetivas em induzir a produção e secreção de TNF- $\alpha$  (Fig. 11 e 13) e IL-10 (Fig. 12 e 14). De fato, o uso de substâncias capazes de minimizar a formação de corpúsculos lipídicos e PGE<sub>2</sub> mostraram também tendência ao aumento na produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 11 e 13), citocina envolvida na ativação de macrófagos para produção de espécies intermediárias de oxigênio e nitrogênio reativas, e de redução nos níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas tratadas com AAS, NS-398 ou C75 (Fig. 12 e 14). A alteração no perfil de produção de citocinas devido à inibição da biogênese de corpúsculos lipídicos e PGE<sub>2</sub> relaciona estas duas variáveis aos eventos modulatórios sobre a resposta imune inata nas infecções micobacterianas.

Apesar da resposta imune na tuberculose ser caracterizada predominantemente pela migração de monócitos / macrófagos para o sítio de infecção, a resposta precoce às infecções micobacterianas envolve influxo significativo de neutrófilos (Appelberg, 1992) que desempenham papel importante na fase aguda da doença (Condos e cols., 1998). Análises de microscopia eletrônica de leucócitos obtidos de cavidades pleurais de animais previamente infectados com *M. bovis* BCG confirmam a presença de bactérias fagocitadas por neutrófilos recrutados para a cavidade já na primeira hora de infecção mostrando ainda aumento significativo no número de corpúsculos lipídicos, indicando ativação celular (Bozza e cols., 1997, 1998). A importância da participação destas células é evidenciada por dados experimentais nos quais a depleção de neutrófilos promove aumento da carga bacteriana nos pulmões de camundongos (Appelberg e cols., 1995; Fulton e cols., 2002). Todavia, a atividade microbicida destas células envolve participação de enzimas e intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio, que são capazes de promover injúrias endoteliais e no parênquima pulmonar (Cox e cols., 1995). Um mecanismo elegante para conter os possíveis processos deletérios decorrentes da função exercida por neutrófilos é o evento de apoptose celular. Experimentos de infecção murina com *M. bovis* BCG mostraram presença de padrões claros de

processo apoptótico em neutrófilos 24 horas após a infecção, incluindo condensação citoplasmática e nuclear, dano mitocondrial e vacuolização (D'Avila e cols., submetido). Neste mesmo tempo de avaliação foi demonstrada presença de macrófagos ativados no sítio inflamatório que fagocitaram neutrófilos apoptóticos.

Dados experimentais descrevem a indução de processo apoptótico como mecanismo desenvolvido por determinados patógenos para subjugar os mecanismos de resposta imune (Gao & Kwai, 2000; Weinrauch & Zychlinsky, 1999). Entre elas, de especial interesse nesse estudo estão as infecções micobacterianas (Fratuzzi e cols., 1999).

O processo de apoptose em neutrófilos apresenta papel dicotômico nos processos de ativação celular de células dendríticas e apresentação antigênica por estas células. A presença de neutrófilos que sofreram processo de apoptose espontânea inibe os fenômenos de ativação de células dendríticas induzidos por *M. tuberculosis*, como a elevação da expressão de moléculas de MHC de classe II, a secreção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por estas células. Por outro lado, quando a apoptose é induzida por *M. tuberculosis*, a fagocitose destes neutrófilos apoptóticos por células dendríticas permite que estas últimas façam apresentação cruzada de antígenos micobacterianos (Alemán e cols., 2007).

Por outro lado, não pode ser desconsiderada a linha de raciocínio que considera a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos um mecanismo voltado à manutenção homeostática, limitando processos inflamatórios exacerbados, evitando assim possíveis injúrias teciduais pela liberação de espécies reativas e enzimas hidrolíticas pelos neutrófilos. A apoptose induzida por *M. tuberculosis* via TLR2 e p38 MAP quinase (Alemán e cols., 2004) preveniria a liberação de componentes deletérios provenientes de neutrófilos. Este dado é fortalecido pela evidência de que neutrófilos reduzem a expressão de moléculas de superfície, se tornam menos responsivos aos eventos degranulatórios e mantêm a integridade de seus grânulos mesmo após o processo apoptótico, evitando a liberação do conteúdo destes (Whyte e cols., 1993; Kobayashi e cols., 2003).

Outros autores descreveram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos representa um mecanismo benéfico à resposta imune nas infecções micobacterianas. Dados da literatura mostram que macrófagos adquirem componentes dos grânulos de neutrófilo ao fagocitá-los. Neste estudo foi descrito ainda que moléculas destes grânulos foram identificados nos endossomos que continham micobactérias. O processo também é observado no fornecimento às

culturas de grânulos neutrofílicos purificados. Em ambos os casos, houve decréscimo no crescimento intracelular micobacteriano (Tan e cols., 2006)(Silva e cols., 1989). Estes dados sugerem a existência de uma cooperação intercelular elegante entre macrófagos e neutrófilos no sentido de debelar a infecção por micobactérias.

Apesar da descrição da aceleração do processo apoptótico em neutrófilos nas infecções micobacterianas (Alemán e cols., 2002) e que estas células apoptóticas são fagocitadas por macrófagos no sítio de infecção, os efeitos deste processo fagocítico nos mecanismos bioquímico-metabólicos e mesmo na resposta imune de macrófagos frente às infecções micobacterianas ainda não estão completamente elucidados.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que somente a fagocitose de neutrófilos apoptóticos é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais murinos infectados ou não por *M. bovis* BCG *in vitro* (Fig. 15). De forma interessante e em acordo com a estreita relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub>, sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados ou não por *M. bovis* BCG na presença de neutrófilos apoptóticos tiveram seus níveis de produção de PGE<sub>2</sub> aumentados de forma estatisticamente significativa em relação aos sobrenadantes de macrófagos não-infectados ou na ausência de neutrófilos apoptóticos (Fig. 16). Cabe ressaltar que o emprego de inibidores de COX (AAS e NS-398) promoveu redução tanto no número de corpúsculos lipídicos observados nos macrófagos (Fig. 17), bem como na produção de PGE<sub>2</sub> por estas células (Fig. 18). Esta inibição da síntese e liberação de PGE<sub>2</sub> não se deve a um simples evento inibitório das enzimas-chave envolvidas na produção de eicosanóides, as ciclooxigenases, uma vez que a substituição experimental destes fármacos por C75, molécula inibidora do ácido graxo sintase, promoveu de forma similar redução nos dois parâmetros avaliados, a saber, o número de corpúsculos lipídicos (Fig. 19) e produção de PGE<sub>2</sub> (Fig. 20), reforçando o papel desta organela na síntese deste mediador lipídico.

Foi descrito anteriormente que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos induz a produção de TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub> (Fadok e cols., 1998), estando estes mediadores envolvidos na desativação de macrófagos propiciando, pois, a replicação de patógenos intracelulares (Freire-de-Lima e cols., 2000; Ribeiro-Gomes e cols., 2002).

Em acordo com esses dados está a observação de que níveis elevados de PGE<sub>2</sub> estão relacionados a uma potente inibição da síntese de TNF- $\alpha$  e citocinas Th1, além de reduzir a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível, com conseqüente decréscimo da produção de óxido nítrico (Betz & Fox, 1991; Kuroda e cols., 2000; Milano e cols., 1995). Estes eventos limitam a capacidade dos macrófagos em inibir a multiplicação micobacteriana e controlar esta infecção (Bonecini-Almeida e cols., 2004; Rangel-Moreno e cols., 2002).

Decorre deste resultado a importante constatação de que estes mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos e PGE<sub>2</sub> a partir da fagocitose de neutrófilos apoptóticos poderiam representar um mecanismo de modulação do sistema imune na infecção *in vivo* por micobactérias, promovendo decréscimo na capacidade responsiva dos macrófagos e viabilizando a sobrevivência e proliferação do patógeno. Esta hipótese é apoiada pelos efeitos observados em linfócitos apoptóticos no modelo de infecção por *T. cruzi*, em que foi constatado aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> concomitante com a elevação da capacidade replicativa do parasito. Esta análise pode ser estendida a uma série de infecções por patógenos intracelulares, sobretudo nas infecções bacterianas, nas quais é observado também intenso influxo neutrofílico inicial, necessitando de estudos pormenorizados dos mecanismos particulares que atuam no estágio inicial do processo inflamatório e sua relação com o destino final da interação patógeno-hospedeiro.

Diversas estratégias de modulação da resposta imune são exercidas por patógenos intracelulares no sentido de viabilizar sua sobrevivência no microambiente intracelular, relativamente inacessível aos mecanismos efetores das respostas imune inata e adaptativa. De forma geral estes mecanismos envolvem inibição de maturação e acidificação fagossomal, inativação enzimática, uso de vias que não conduzem aos processos de fusão e resistência ao conteúdo lisossomal (Vergne e cols., 2004). Embora muitos destes mecanismos apresentem modelos elegantes de funcionamento baseados em dados experimentais, os eventos que os regulam ainda não estão completamente esclarecidos. O papel de componentes lipídicos bacterianos e do hospedeiro vem obtendo destaque na modulação de infecções bacterianas (Russell e cols., 2003; Vergne e cols., 2004; Anes e cols., 2003). Mais particularmente no caso de infecções por micobactérias, autores demonstram a importância destas interações. Anes e cols. (2003) descreveram que em culturas de macrófagos infectados por micobactérias, a oferta de determinados lipídeos exógenos é capaz de modular na maturação do fagossomo, com

conseqüente redução da sobrevivência micobacteriana, ao passo que outros lipídeos promoveram aumento no crescimento micobacteriano (Anes e cols., 2003). Estas observações denotam o importante papel de lipídeos nos mecanismos de modulação do sistema imune nas infecções micobacterianas.

A observação experimental que a micobactéria não-patogênica *M. smegmatis* não é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos ao passo que micobactérias patogênicas logram êxito neste parâmetro (D'Avila e cols., 2006) suscita a hipótese da participação de corpúsculos lipídicos nos mecanismos de escape do sistema imune, amparando o sucesso do processo infeccioso.

A avaliação da capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas frente aos tratamentos que inibem a formação de corpúsculos lipídicos mostrou que os inibidores de COX promoveram decréscimo no número de unidades formadoras de colônias (UFC) de forma estatisticamente significativa (Fig. 21). Efeito similar foi observado para o tratamento com C75, inibidor da enzima ácido graxo sintase (Fig. 22). Estes resultados sugerem íntima relação entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e a permissividade da sobrevivência e multiplicação de micobacteriana no interior de macrófagos. Estes mecanismos podem estar relacionados com o aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub>, que ocorre em paralelo com a formação de corpúsculos lipídicos, ou na alteração do balanço entre a produção de citocinas pró e antiinflamatórias no contexto do foco inflamatório micobacteriano.

Torna-se claro que o balanço estabelecido entre a instalação de resposta imune exacerbada com permissividade às lesões teciduais que podem inferir comprometimento funcional orgânico e a restrição de mecanismos efetores de combate às infecções patogênicas que limitam a colonização e mecanismos de agressão exercido pelos agentes infecciosos necessita de fino ajuste do qual a biogênese de corpúsculos lipídicos e os efeitos decorrentes de suas funções podem participar de forma decisiva, necessitando, pois, de esforços investigativos no sentido de ampliar a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo.

Além da observação de que os corpúsculo lipídicos poderiam funcionar como organelas que exercem efeitos significativos na modulação da resposta imune, estas estruturas poderiam ainda funcionar como fonte nutricional aos patógenos invasores. Dados recentes mostram a capacidade de mobilização de ácido araquidônico de corpúsculos lipídicos de células epiteliais respiratórias por uma fosfolipase de *Pseudomonas aeruginosa* como parte de sua programação de patogenicidade

(Plotkwoski e cols., 2008). Faça-se constar nesta descrição a importante observação da íntima associação entre corpúsculos lipídicos e fagossomos contendo patógenos (Melo e cols., 2003; D`Avila e cols., 2006, 2008), o que corrobora com a hipótese de tráfego de moléculas entre os corpúsculos lipídicos e fagossomos micobacterinos. Ainda neste contexto, evidências experimentais indicam a possibilidade de corpúsculos lipídicos funcionarem como fonte nutricional para diferentes agentes infecciosos, como *T. gondii*, *P. falciparum*, *Chlamydia trachomatis* e *M. tuberculosis* (Charron e cols., 2002; Nishikawa e cols., 2005; Jackson e cols., 2004; Luo e cols., 2005). De forma interessante, foi descrito que o *M. tuberculosis* apresenta capacidade peculiar de sobreviver em uma fase latente de infecção nos adipócitos onde acumula inclusões lipídicas citoplasmáticas, sendo postulado que as micobactérias, através de suas lipases, degradam triglicerídeos do hospedeiro e importam ácidos graxos ao seu citoplasma (Neyrolles e cols., 2006).

De interesse especial nas infecções micobacterianas estão algumas moléculas envolvidas no processo de maturação fagossomal, como Rab5, Rab7 e PI3K (Via e cols., 1997; Fratti e cols., 2001), cuja presença fora descrita nos corpúsculos lipídicos. A localização dos corpúsculos lipídicos junto aos fagossomos contendo micobactérias levanta a suposição de que o tráfego de moléculas entre estas duas organelas poderia influenciar o processo de maturação do fagossomo.

As observações experimentais acima descritas permitem, como conclusão dos resultados de modulação enzimática da formação de corpúsculos lipídicos, inferir que estas estruturas funcionam como plataformas de sinalização intracelular, com mecanismos de biogênese altamente regulados e sendo dinamicamente ativos e capazes de produzir uma série de mediadores lipídicos, influenciando a capacidade de ativação de macrófagos para suas atividades microbicidas, propiciando pois, a sobrevivência e multiplicação micobacterianas no microambiente intracelular.

## 6) Conclusão

A análise conjunta dos resultados obtidos neste estudo permite inferir uma série de observações pertinentes aos objetivos pré-estabelecidos.

Foi demonstrado que a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais por *M. bovis* BCG é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos de forma dependente da dose de infecção. Este fenômeno de formação de organelas intracelulares envolvidas em processos de ativação celular representa um processo importante no contexto de indução de mecanismos especificamente relacionados ao desenvolvimento da resposta imune e mecanismo que conduzam à eliminação da infecção micobacteriana.

O emprego de fármacos antiinflamatórios não-esteroidais (AAS e NS-398) foi efetivo em modular negativamente a formação de tais organelas, efeito compartilhado e estendido para o uso de C75, substância que, agindo pela inibição da enzima ácido graxo sintase, é também capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos.

De forma interessante, os mesmos tratamentos descritos acima, foram capazes de reduzir a produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por *M. bovis* BCG, em paralelo à suas capacidades descritas de inibição da formação de corpúsculos lipídicos, fortalecendo dados experimentais prévios de nosso grupo quanto à estreita relação entre a formação de corpúsculos lipídicos e o aumento da capacidade das células em gerar eicosanóides.

Os tratamentos com AAS, NS-398 ou C75 promoveram tendência ao aumento na produção de TNF- $\alpha$  e redução nos níveis de IL-10 nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectadas por *M. bovis* BCG. Estes dados suscitam a hipótese de que a geração de corpúsculos lipídicos pode estar relacionada a efeitos modulatórios no balanço da produção de citocinas pró e antiinflamatórias, alterando a capacidade de macrófagos em responder às infecções micobacterianas.

A participação de neutrófilos apoptóticos na infecção por micobactérias revelou que estas células são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos e a produção de PGE<sub>2</sub> *in vitro*. Desta forma, a apoptose de neutrófilos, evento observado no sítio inflamatório nas infecções *in vivo* por micobactérias e também outros agentes patogênicos, pode estar relacionada também com mecanismos de modulação negativa da capacidade de macrófagos em responder de forma eficaz às infecções por patógenos intracelulares.

Por fim, através da análise da capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas e sua relação com a formação de corpúsculos lipídicos, os resultados obtidos neste estudo mostram que nas culturas de macrófagos em que a formação de corpúsculos lipídicos foi inibida pelo uso de AAS, NS-398 ou C75, houve menor capacidade de sobrevivência e/ou multiplicação micobacterianas, sugerindo que os corpúsculos lipídicos e os eventos decorrentes de sua geração podem estar intimamente relacionados com a capacidade de patógenos intracelulares em subverter os mecanismos de resposta imune inata, viabilizando sua sobrevivência e multiplicação no microambiente intracelular.

## 7) Referências Bibliográficas

- Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, e cols. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol*. 2002 Sep 15;169(6):3155-62.
- Abramson S, Korchak H, Ludewig R, Edelson H, Haines K, Levin RI, e cols. Modes of action of aspirin-like drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Nov;82(21):7227-31.
- Abramson SB, Leszczynska-Piziak J, Haines K, Reibman J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: effects on a GTP binding protein within the neutrophil plasma membrane. *Biochem Pharmacol*. 1991 Jun 1;41(11):1567-73.
- Accioly MT, Pacheco P, Maya-Monteiro CM, Carrossini N, Robbs BK, Oliveira SS, e cols. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res*. 2008 Mar 15;68(6):1732-40.
- Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):782-7.
- Akgul C, Moulding DA, Edwards SW. Molecular control of neutrophil apoptosis. *FEBS Lett*. 2001 Jan 5;487(3):318-22.
- Akira S, Yamamoto M, Takeda K. Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans*. 2003 Jun;31(Pt 3):637-42.
- Akira S. Toll-like receptor signaling. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38105-8.
- Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, e cols. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol*. 2002 Apr;22(8):2607-19.
- Aleman M, Beigier-Bompadre M, Borghetti C, de la Barrera S, Abbate E, Isturiz M, e cols. Activation of peripheral blood neutrophils from patients with active advanced tuberculosis. *Clin Immunol*. 2001 Jul;100(1):87-95.
- Aleman M, de la Barrera S, Schierloh P, Yokobori N, Baldini M, Musella R, e cols. Spontaneous or *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils exert opposite effects on the dendritic cell-mediated immune response. *Eur J Immunol*. 2007 Jun;37(6):1524-37.
- Aleman M, Garcia A, Saab MA, De La Barrera SS, Finiasz M, Abbate E, e cols. *Mycobacterium tuberculosis*-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Nov;27(5):583-92.
- Aleman M, Schierloh P, de la Barrera SS, Musella RM, Saab MA, Baldini M, e cols. *Mycobacterium tuberculosis* triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect Immun*. 2004 Sep;72(9):5150-8.
- Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003 Dec;14(6):467-77.
- Algood HM, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis*. 2005 Aug 1;41 Suppl 3:S189-93.
- Allison MJ, Mendoza D, Pezzia A. Documentation of a case of tuberculosis in Pre-Columbian America. *Am Rev Respir Dis*. 1973 Jun;107(6):985-91.

- Alonso S, Pethe K, Russell DG, Purdy GE. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 3;104(14):6031-6.
- Amendoeira FC, Frutuoso VS, Zanon C, Chedier LM, Figueiredo MR, Kaplan MA, e cols. Anti-inflammatory activity in the aqueous crude extract of the leaves of *Nidularium procerum*: A bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Biol Pharm Bull*. 2005 Jun;28(6):1010-5.
- 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 Sep;5(9):793-802.
- Appelberg R, Castro AG, Gomes S, Pedrosa J, Silva MT. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infect Immun*. 1995 Sep;63(9):3381-7.
- Appelberg R. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J Leukoc Biol*. 1992 May;51(5):472-7.
- Arriaza BT, Salo W, Aufderheide AC, Holcomb TA. Pre-Columbian tuberculosis in northern Chile: molecular and skeletal evidence. *Am J Phys Anthropol*. 1995 Sep;98(1):37-45.
- Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, Kaufmann SH, e cols. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol*. 2008 Jul;10(7):1530-45.
- Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (second of two parts). *N Engl J Med*. 1978 Mar 30;298(13):721-5.
- Baca OG, Li YP, Kumar H. Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends Microbiol*. 1994 Dec;2(12):476-80.
- Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, e cols. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest*. 2005 Jun;115(6):1601-6.
- Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol*. 1998 Sep 1;161(5):2636-41.
- Bandeira-Melo C, Bozza PT, Weller PF. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol*. 2002 Mar;109(3):393-400.
- Bandeira-Melo C, Herbst A, Weller PF. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Jun;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*. 2001 Jun 22;276(25):22779-87.
- Bandeira-Melo C, Serra MF, Diaz BL, Cordeiro RS, Silva PM, Lenzi HL, e cols. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):1029-36.
- Barnewall RE, Rikihisa Y, Lee EH. *Ehrlichia chaffeensis* inclusions are early endosomes which selectively accumulate transferrin receptor. *Infect Immun*. 1997 Apr;65(4):1455-61.
- Bartemes KR, McKinney S, Gleich GJ, Kita H. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2982-9.

- Beharka AA, Gaynor CD, Kang BK, Voelker DR, McCormack FX, Schlesinger LS. Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol.* 2002 Oct 1;169(7):3565-73.
- 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 Sep;58(3):284-98.
- Betz M, Fox BS. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 1991 Jan 1;146(1):108-13.
- Bezerra-Santos CR, Vieira-de-Abreu A, Barbosa-Filho JM, Bandeira-Melo C, Piuvezam MR, Bozza PT. Anti-allergic properties of *Cissampelos sympodialis* and its isolated alkaloid warifteine. *Int Immunopharmacol.* 2006 Jul;6(7):1152-60.
- Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol.* 2007 Jul;27(4):347-62.
- Blander JM, Medzhitov R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 2004 May 14;304(5673):1014-8.
- Blander JM, Medzhitov R. Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature.* 2006 Apr 6;440(7085):808-12.
- Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Boechat N, Huard RC, Chitale S, Doo H, et 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 May;72(5):2628-34.
- Borges MM, Kloetzel JK, Andrade HF, Jr., Tadokoro CE, Pinge-Filho P, Abrahamsohn I. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Lett.* 1998 Aug;63(1):1-8.
- Bozza PT, Bandeira-Melo C. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(Suppl 1):113-20.
- Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, Pires AL, Silva PM, Martins MA, Cordeiro RS. Endotoxin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity. *Braz J Med Biol Res.* 1991;24(9):957-60.
- Bozza PT, Melo RC, Bandeira-Melo C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: contribution to allergy and host defense. *Pharmacology & therapeutics.* 2007 Jan;113(1):30-49.
- Bozza PT, Pacheco P, Yu W, Weller PF. NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2002 Oct;67(4):237-44.
- 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.* 1996 Apr 1;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.* 1996 Oct 1;93(20):11091-6.
- Bozza PT, Weller PF. Arachidonyl trifluoromethyl ketone induces lipid body formation in leukocytes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2001 Apr-May;64(4-5):227-30.
- 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 Oct;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*. 1997 Sep 15;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*. 1997;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*. 1997 Apr 4;272(14):9378-87.
- 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 Nov 5;279(45):46835-42.
- Brasaemle DL. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res*. 2007 Dec;48(12):2547-59.
- Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR, et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):732-6.
- Brock TG, Paine R, 3rd, Peters-Golden M. Localization of 5-lipoxygenase to the nucleus of unstimulated rat basophilic leukemia cells. *J Biol Chem*. 1994 Sep 2;269(35):22059-66.
- Brown DA. Lipid droplets: proteins floating on a pool of fat. *Curr Biol*. 2001 Jun 5;11(11):R446-9.
- Brown PD, Robinson GB. Granule enzymes of human and rabbit polymorphonuclear leukocytes: an investigation of enzyme solubility. *Inflammation*. 1987 Mar;11(1):95-110.
- Cardona PJ, Ausina V. [Histopathology of tuberculosis. Approximation to the clinical course of lung lesions in animal experimentation models induced with aerosols]. *Arch Bronconeumol*. 2000 Dec;36(11):645-50.
- Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*. 1995 Jan;16(1):21-6.
- Castro AG, Minoprio P, Appelberg R. The relative impact of bacterial virulence and host genetic background on cytokine expression during *Mycobacterium avium* infection of mice. *Immunology*. 1995 Aug;85(4):556-61.
- Celentano AM, Gorelik G, Solana ME, Sterin-Borda L, Borda E, Gonzalez Cappa SM. PGE2 involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins*. 1995 Mar;49(3):141-53.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*. 1992 Apr 1;175(4):1111-22.
- Charron AJ, Sibley LD. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *J Cell Sci*. 2002 Aug 1;115(Pt 15):3049-59.
- 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.
- Cheng F, Wang Q, Chen M, Quijcho FA, Ma J. Molecular docking study of the interactions between the thioesterase domain of human fatty acid synthase and its ligands. *Proteins*. 2008 Mar;70(4):1228-34.
- Chitu V, Stanley ER. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr Opin Immunol*. 2006 Feb;18(1):39-48.
- Chua J, Vergne I, Master S, Deretic V. A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr Opin Microbiol*. 2004 Feb;7(1):71-7.

- Clemens DL, Horwitz MA. The Mycobacterium tuberculosis phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1349-55.
- Clemens DL, Lee BY, Horwitz MA. Deviant expression of Rab5 on phagosomes containing the intracellular pathogens Mycobacterium tuberculosis and Legionella pneumophila is associated with altered phagosomal fate. *Infect Immun*. 2000 May;68(5):2671-84.
- Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M. Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol*. 2004 Nov 2;113: 130-6.
- Condos R, Rom WN, Liu YM, Schluger NW. Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Mar;157(3 Pt 1):729-35.
- Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 1993 Dec 1;178(6):2243-7.
- Cowley S, Ko M, Pick N, Chow R, Downing KJ, Gordhan BG, et cols. The Mycobacterium tuberculosis protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Mol Microbiol*. 2004 Jun;52(6):1691-702.
- Cox G, Crossley J, Xing Z. Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1995 Feb;12(2):232-7.
- Darwin KH, Ehrt S, Gutierrez-Ramos JC, Weich N, Nathan CF. The proteasome of Mycobacterium tuberculosis is required for resistance to nitric oxide. *Science*. 2003 Dec 12;302(5652):1963-6.
- 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 Mar;75(3):1507-11.
- D'Avila H, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid bodies in innate immune response to bacterial and parasite infections. *International Immunopharmacology*. 2008(in press).
- D'Avila H, Melo RC, Parreira GG, Werneck-Barroso E, Castro Faria Neto HC, Bozza PT. Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology*. 2006;176:3087-97.
- de Assis EF, Silva AR, Caiado LF, Marathe GK, Zimmerman GA, Prescott SM, et 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 Aug 15;171(4):2090-8.
- de la Barrera S, Aleman M, Musella R, Schierloh P, Pasquinelli V, Garcia V, et cols. IL-10 down-regulates costimulatory molecules on Mycobacterium tuberculosis-pulsed macrophages and impairs the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients. *Clin Exp Immunol*. 2004 Oct;138(1):128-38.
- Delamarre L, Couture R, Mellman I, Trombetta ES. Enhancing immunogenicity by limiting susceptibility to lysosomal proteolysis. *J Exp Med*. 2006 Sep 4;203(9):2049-55.
- Delamarre L, Pack M, Chang H, Mellman I, Trombetta ES. Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*. 2005 Mar 11;307(5715):1630-4.

- Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, et al. Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol.* 2006 May;8(5):719-27.
- Dibbert B, Weber M, Nikolaizik WH, Vogt P, Schoni MH, Blaser K, et al. Cytokine-mediated Bax deficiency and consequent delayed neutrophil apoptosis: a general mechanism to accumulate effector cells in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Nov 9;96(23):13330-5.
- Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to Mycobacterium tuberculosis infection. *Am J Pathol.* 2004 Jan;164(1):49-57.
- Duan L, Gan H, Arm J, Remold HG. Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human macrophages infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7469-76.
- Dvorak AM, Ackerman SJ, Weller PF. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. In Harris JR (ed) *Blood Cell Biochemistry*, New York, Plenum Publishing. 1991;2:237-344.
- Dvorak AM, Dvorak HF, Peters SP, Shulman ES, MacGlashan DW, Jr., Pyne K, et al. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol.* 1983 Dec;131(6):2965-76.
- 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 Jun;40(6):759-69.
- Dvorak AM, Morgan ES, Weller PF. RNA is closely associated with human mast cell lipid bodies. *Histol Histopathol.* 2003 Jul;18(3):943-68.
- 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. Ultrastructure of human mast cells. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002 Feb;127(2):100-5.
- Ernst JD. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun.* 1998 Apr;66(4):1277-81.
- Fadeel B, Ahlin A, Henter JI, Orrenius S, Hampton MB. Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species. *Blood.* 1998 Dec 15;92(12):4808-18.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998 Feb 15;101(4):890-8.
- Feng CG, Kullberg MC, Jankovic D, Cheever AW, Caspar P, Coffman RL, et al. Transgenic mice expressing human interleukin-10 in the antigen-presenting cell compartment show increased susceptibility to infection with Mycobacterium avium associated with decreased macrophage effector function and apoptosis. *Infect Immun.* 2002 Dec;70(12):6672-9.
- Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet.* 1995 Nov 18;346(8986):1339-45.
- Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1997 Jun;61(2):136-69.
- 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 Aug 15;167(4):2187-92.
- Flesch IE, Kaufmann SH. Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology.* 1993 Nov;189(3-4):316-39.
- Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):2249-54.
- Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol.* 2003 Aug;15(4):450-5.
- Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:93-129.
- Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of Balb/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1995 Sep 1;155(5):2515-24.
- Forman HJ, Torres M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec 15;166(12 Pt 2):S4-8.
- Fortune SM, Solache A, Jaeger A, Hill PJ, Belisle JT, Bloom BR, et cols. *Mycobacterium tuberculosis* inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. *J Immunol.* 2004 May 15;172(10):6272-80.
- Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, et cols. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol.* 1999 Nov;66(5):763-4.
- Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 2001 Aug 6;154(3):631-44.
- Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 29;100(9):5437-42.
- Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Soares MB, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, de Mello FG, et cols. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 2000 Jan 13;403(6766):199-203.
- Fremont CM, Yermeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest.* 2004 Dec;114(12):1790-9.
- 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 Mar 5;152(5):1079-85.
- Fujimoto Y, Itabe H, Sakai J, Makita M, Noda J, Mori M, et cols. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta.* 2004 Feb 2;1644(1):47-59.
- Fujimoto Y, Onoduka J, Homma KJ, Yamaguchi S, Mori M, Higashi Y, et cols. Long-chain fatty acids induce lipid droplet formation in a cultured human hepatocyte in a manner dependent of Acyl-CoA synthetase. *Biol Pharm Bull.* 2006 Nov;29(11):2174-80.
- Fulton SA, Cross JV, Toossi ZT, Boom WH. Regulation of interleukin-12 by interleukin-10, transforming growth factor-beta, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma in human monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Infect Dis.* 1998 Oct;178(4):1105-14.
- Fulton SA, Reba SM, Martin TD, Boom WH. Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5322-7.

- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1871-5.
- Gao LY, Kwai YA. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. *Trends Microbiol*. 2000 Jul;8(7):306-13.
- Gardam M, Iverson K. Rheumatoid arthritis and tuberculosis: time to take notice. *J Rheumatol*. 2003 Jul;30(7):1397-9.
- Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 2000 Jun 2;288(5471):1647-50.
- 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 Dec 1;155(11):5343-51.
- Gehring AJ, Dobos KM, Belisle JT, Harding CV, Boom WH. *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): a novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *J Immunol*. 2004 Aug 15;173(4):2660-8.
- Gerosa F, Nisii C, Righetti S, Micciolo R, Marchesini M, Cazzadori A, e cols. CD4(+) T cell clones producing both interferon-gamma and interleukin-10 predominate in bronchoalveolar lavages of active pulmonary tuberculosis patients. *Clin Immunol*. 1999 Sep;92(3):224-34.
- Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, e cols. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7033-41.
- Gilleron M, Himoudi N, Adam O, Constant P, Venisse A, Riviere M, e cols. *Mycobacterium smegmatis* phosphoinositols-glyceroarabinomannans. Structure and localization of alkali-labile and alkali-stable phosphoinositides. *J Biol Chem*. 1997 Jan 3;272(1):117-24.
- Gilleron M, Lindner B, Puzo G. MS/MS approach for characterization of the fatty acid distribution on mycobacterial phosphatidyl-myo-inositol mannosides. *Anal Chem*. 2006 Dec 15;78(24):8543-8.
- Gordon AH, Hart PD, Young MR. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. *Nature*. 1980 Jul 3;286(5768):79-80.
- 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 Jul;73(7):2510-4.
- Griffith, T. S., X. Yu, e cols. (1996). "CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance." *Immunity* 5(1): 7-16.
- Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, e cols. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature*. 2008 May 29;453(7195):657-61.
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*. 2004 Dec 17;119(6):753-66.
- Hackstadt T, Scidmore MA, Rockey DD. Lipid metabolism in *Chlamydia trachomatis*-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 May 23;92(11):4877-81.
- 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 Nov;294(2):309-21.
- Henderson WR, Jr. The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*. 1994 Nov 1;121(9):684-97.

- 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 Aug;65(8):3317-27.
- Hickman SP, Chan J, Salgame P. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4636-42.
- Hmama Z, Sendide K, Talal A, Garcia R, Dobos K, Reiner NE. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Cell Sci*. 2004 Apr 15;117(Pt 10):2131-40.
- Homburg CH, de Haas M, von dem Borne AE, Verhoeven AJ, Reutelingsperger CP, Roos D. Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro. *Blood*. 1995 Jan 15;85(2):532-40.
- 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 Oct;28(5):487-93.
- Indrigo J, Hunter RL, Jr., Actor JK. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology*. 2003 Aug;149(Pt 8):2049-59.
- Iorio E, Di Vito M, Spadaro F, Ramoni C, Lococo E, Carnevale R, e cols. Triacsin C inhibits the formation of 1H NMR-visible mobile lipids and lipid bodies in HuT 78 apoptotic cells. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Oct 20;1634(1-2):1-14.
- 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 Oct;54(1):109-22.
- Jang S, Uematsu S, Akira S, Salgame P. IL-6 and IL-10 induction from dendritic cells in response to Mycobacterium tuberculosis is predominantly dependent on TLR2-mediated recognition. *J Immunol*. 2004 Sep 1;173(5):3392-7.
- 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 Aug;21(2):253-8.
- Joiner KA, Fuhrman SA, Miettinen HM, Kasper LH, Mellman I. Toxoplasma gondii: fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science*. 1990 Aug 10;249(4969):641-6.
- Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis*. 2001 Nov;60 Suppl 3:iii6-12.
- Jones GS, Amirault HJ, Andersen BR. Killing of Mycobacterium tuberculosis by neutrophils: a nonoxidative process. *J Infect Dis*. 1990 Sep;162(3):700-4.
- Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, Tibesar E, e cols. The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *J Exp Med*. 2005 Oct 3;202(7):987-99.
- Kasahara K, Sato I, Ogura K, Takeuchi H, Kobayashi K, Adachi M. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis*. 1998 Jul;178(1):127-37.

- Kaufmann SH, Ladel CH, Flesch IE. T cells and cytokines in intracellular bacterial infections: experiences with *Mycobacterium bovis* BCG. *Ciba Found Symp.* 1995;195:123-32; discussion 32-6.
- Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature reviews.* 2001 Oct;1(1):20-30.
- Kaufmann SH. New issues in tuberculosis. *Ann Rheum Dis.* 2004 Nov;63 Suppl 2:ii50-ii6.
- Kaufmann SH. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis.* 2002 Nov;61 Suppl 2:ii54-8.
- Keane J, Balcewicz-Sablinska MK, Remold HG, Chupp GL, Meek BB, Fenton MJ, et cols. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. *Infect Immun.* 1997 Jan;65(1):298-304.
- Keane J, Remold HG, Kornfeld H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):2016-20.
- Keane MPS, R.M. Chemokine signaling in inflammation. *Crit Care Med.* 2000;28(4):N13-N26.
- Kelley VA, Schorey JS. Modulation of cellular phosphatidylinositol 3-phosphate levels in primary macrophages affects heat-killed but not viable *Mycobacterium avium*'s transport through the phagosome maturation process. *Cell Microbiol.* 2004 Oct;6(10):973-85.
- Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, Gasnier C, et cols. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J.* 2003 Apr;17(6):776-8.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell.* 1989 Mar 10;56(5):731-40.
- Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 2003 Mar 15;170(6):3357-68.
- Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997 Jun;3(6):614-20.
- Kuroda E, Sugiura T, Zeki K, Yoshida Y, Yamashita U. Sensitivity difference to the suppressive effect of prostaglandin E2 among mouse strains: a possible mechanism to polarize Th2 type response in Balb/c mice. *J Immunol.* 2000 Mar 1;164(5):2386-95.
- Kusner DJ. Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clin Immunol.* 2005 Mar;114(3):239-47.
- Leite MS, Pacheco P, Gomes RN, Guedes AT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, et cols. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock.* 2005;23(2).
- Lim KG, Wan HC, Bozza PT, Resnick MB, Wong DT, Cruikshank WW, et cols. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol.* 1996 Apr 1;156(7):2566-70.
- 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 Jan 30;279(5):3787-92.
- Londos C, Sztalryd C, Tansey JT, Kimmel AR. Role of PAT proteins in lipid metabolism. *Biochimie.* 2005 Jan;87(1):45-9.
- Luo M, Fadeev EA, Groves JT. Mycobactin-mediated iron acquisition within macrophages. *Nat Chem Biol.* 2005 Aug;1(3):149-53.

- 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 May 13;94(10):5243-8.
- Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, Porter B, Iyer SS, Kusner DJ. Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca<sup>2+</sup> signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol*. 2003 Mar 15;170(6):2811-5.
- Matsuda D, Namatame I, Ohshiro T, Ishibashi S, Omura S, Tomoda H. Anti-atherosclerotic Activity of Triacsin C, an Acyl-CoA Synthetase Inhibitor. *J Antibiot (Tokyo)*. 2008 May;61(5):318-21.
- May ME, Spagnuolo PJ. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with Mycobacterium tuberculosis. *Infect Immun*. 1987 Sep;55(9):2304-7.
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *N Engl J Med*. 2000 Aug 3;343(5):338-44.
- Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255-8.
- 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 Feb;35(1):59-67.
- Melo RC, Fabrino DL, D'Avila H, Teixeira HC, Ferreira AP. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with Trypanosoma cruzi in vivo. *Cell Biol Int*. 2003;27(10):853-61.
- Melo RC, Machado CR. Trypanosoma cruzi: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol*. 2001 Jan;97(1):15-23.
- Melo RC. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental Trypanosoma cruzi infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell*. 1999 Jun;31(3):281-90.
- Menezes-de-Lima-Junior O, Henriques MdG. Mechanisms of cell accumulation induced by Mycobacterium bovis BCG. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1997;92 Suppl 2:227-32.
- Mesquita-Santos FP, Vieira-de-Abreu A, Calheiros AS, Figueiredo IH, Castro-Faria-Neto HC, Weller PF, e cols. Cutting Edge: Prostaglandin D2 Enhances Leukotriene C4 Synthesis by Eosinophils during Allergic Inflammation: Synergistic In Vivo Role of Endogenous Eotaxin. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1326-30.
- Milano S, Arcoleo F, Dieli M, D'Agostino R, D'Agostino P, De Nucci G, e cols. Prostaglandin E2 regulates inducible nitric oxide synthase in the murine macrophage cell line J774. *Prostaglandins*. 1995 Feb;49(2):105-15.
- Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, e cols. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun*. 2001 Mar;69(3):1847-55.
- 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 May 5;270(18):10902-8.
- Mosser DM, Rosenthal LA. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol*. 1993 Oct;4(5):315-22.

- Moulding DA, Quayle JA, Hart CA, Edwards SW. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood*. 1998 Oct 1;92(7):2495-502.
- Munk ME, Emoto M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl*. 1995 Sep;20:668s-75s.
- Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res*. 2001 Sep;40(5):325-438.
- Murray CJ, Salomon JA. Modeling the impact of global tuberculosis control strategies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Nov 10;95(23):13881-6.
- Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):229-40.
- Nathan C. Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jul 15;166(2):130-1.
- Newman SL, Henson JE, Henson PM. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med*. 1982 Aug 1;156(2):430-42.
- 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.
- Nicholson AC, Hajjar DP. Viral activation of the coagulation cascade. *Am Heart J*. 1999 Nov;138(5 Pt 2):S461-4.
- Nick JA, Young SK, Brown KK, Avdi NJ, Arndt PG, Suratt BT, e cols. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in a murine model of pulmonary inflammation. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2151-9.
- Nicod LP. Immunology of tuberculosis. *Swiss Med Wkly*. 2007 Jun 30;137(25-26):357-62.
- Noss EH, Pai RK, Sellati TJ, Radolf JD, Belisle J, Golenbock DT, e cols. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophage class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 2001 Jul 15;167(2):910-8.
- Orme IM, Roberts AD. Changes in integrin/adhesion molecule expression, but not in the T-cell receptor repertoire, in old mice infected with tuberculosis. *Mech Ageing Dev*. 1998 Sep 15;105(1-2):19-29.
- Ostermeyer AG, Paci JM, Zeng Y, Lublin DM, Munro S, Brown DA. Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol*. 2001 Mar 5;152(5):1071-8.
- Otto JC, and W.L. Smith. The orientation of prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1994;269(31):19868-75.
- 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 Jun 15;118(Pt 12):2601-11.
- Pacheco P, Bozza FA, Gomes RN, Bozza M, Weller PF, Castro-Faria-Neto HC, e cols. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6498-506.
- Pacheco P, Vieira-de-Abreu A, Gomes RN, Barbosa-Lima G, Wermelinger LB, Maya-Monteiro CM, e cols. 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 Dec 15;179(12):8500-8.

- Pandey AK, Sasseti CM. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Mar 18;105(11):4376-80.
- Patrono C, Patrignani P. Pharmacologic modulation of arachidonic acid metabolism in man. A minireview with emphasis on radioimmunological methods used to quantitate drug effects. *Int J Immunopharmacol*. 1982;4(2):127-33.
- Pecora ND, Gehring AJ, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Mycobacterium tuberculosis LprA is a lipoprotein agonist of TLR2 that regulates innate immunity and APC function. *J Immunol*. 2006 Jul 1;177(1):422-9.
- Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT, Cooper AM. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice. *Infect Immun*. 2000 Feb;68(2):577-83.
- Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol*. 2002 Jun 15;168(12):6358-65.
- Perskvist N, Zheng L, Stendahl O. Activation of human neutrophils by Mycobacterium tuberculosis H37Ra involves phospholipase C gamma 2, Shc adapter protein, and p38 mitogen-activated protein kinase. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):959-65.
- Peters W, Ernst JD. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect*. 2003 Feb;5(2):151-8.
- Peters W, Scott HM, Chambers HF, Flynn JL, Charo IF, Ernst JD. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):7958-63.
- Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C, Russell DG. Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13642-7.
- Plotkowski MC, Brandão BA, Assis MC, Feliciano LFP, Saliba AS, Raymond B, e cols. Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microb Pathog*. 2008 Jul;45(1):30-37
- Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ferguson C, Carozzi A, Luetterforst R, e cols. Dynamic and regulated association of caveolin with lipid bodies: modulation of lipid body motility and function by a dominant negative mutant. *Mol Biol Cell*. 2004 Jan;15(1):99-110.
- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:419-45.
- Purdy GE, Owens RM, Bennett L, Russell DG, Butcher BA. Kinetics of phosphatidylinositol-3-phosphate acquisition differ between IgG bead-containing phagosomes and Mycobacterium tuberculosis-containing phagosomes. *Cell Microbiol*. 2005 Nov;7(11):1627-34.
- Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guerardel Y, Nigou J, e cols. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol*. 2004 Apr 1;172(7):4425-34.
- Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res*. 2004 Oct;120(4):213-32.
- 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 Jun;106(2):257-66.
- 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 Oct 1;169(7):3480-4.
- Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gemsa D. Release of tumor necrosis factor- $\alpha$  from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2388-93.
- Revelli S, Didoli G, Roggero E, Moreno H, Bernabo J, Wietzerbin J, e cols. Macrophage activity, IL-6 levels, antibody response and heart histology in rats undergoing an attenuated *Trypanosoma cruzi* acute infection upon treatment with recombinant interferon gamma. *Cytokines Cell Mol Ther*. 1998 Sep;4(3):153-9.
- Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Borges VM, Nunes MP, Mantuano-Barradas M, D'Avila H, e cols. Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *J Infect Dis*. 2005 Sep 15;192(6):1127-34.
- Ridley DS, Ridley MJ. Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification. *Pathology*. 1987 Apr;19(2):186-92.
- Riedel DD, Kaufmann SH. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun*. 1997 Nov;65(11):4620-3.
- Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Invest Clin*. 2005 Dec;46(4):391-412.
- Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol*. 2002 May 1;168(9):4620-7.
- Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunological reviews*. 2007 Oct;219:37-54.
- Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF. TNF- $\alpha$  and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol*. 1999 May 15;162(10):6122-31.
- Rosenzweig SD, Holland SM. Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways. *Immunol Rev*. 2005 Feb;203:38-47.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, e cols. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. *Clin Infect Dis*. 2001 Aug 1;33(3):305-11.
- Rouzer CA, Kargman S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J Biol Chem*. 1988 Aug 5;263(22):10980-8.
- Russell DG, Dant J, Sturgill-Koszycki S. *Mycobacterium avium*- and *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles are dynamic, fusion-competent vesicles that are accessible to glycosphingolipids from the host cell plasmalemma. *J Immunol*. 1996 Jun 15;156(12):4764-73.
- Russell DG. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat Cell Biol*. 2003 Sep;5(9):776-8.
- Salo WL, Aufderheide AC, Buikstra J, Holcomb TA. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in a pre-Columbian Peruvian mummy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 15;91(6):2091-4.
- Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hieny S, Sher A. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun*. 2004 Apr;72(4):2400-4.

- Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 2000 Oct;177:195-203.
- Schaible UE, Kaufmann SH. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol.* 2004 Dec;2(12):946-53.
- Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG. Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1290-6.
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* 1990 Apr 1;144(7):2771-80.
- Schrader M. Tubulo-reticular clusters of peroxisomes in living COS-7 cells: dynamic behavior and association with lipid droplets. *J Histochem Cytochem.* 2001 Nov;49(11):1421-29.
- Seiler P, Aichele P, Bandermann S, Hauser AE, Lu B, Gerard NP, e cols. Early granuloma formation after aerosol Mycobacterium tuberculosis infection is regulated by neutrophils via CXCR3-signaling chemokines. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2676-86.
- Seiler P, Aichele P, Raupach B, Odermatt B, Steinhoff U, Kaufmann SH. Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating Mycobacterium tuberculosis. *J Infect Dis.* 2000 Feb;181(2):671-80.
- Shi H, Zhong X, Long X, Chen Y. Effect of interferon-gamma on antigen-induced eosinophil infiltration into the mouse airway. *Chin Med J (Engl).* 1996 Mar;109(3):215-8.
- Shibata Y, Henriksen RA, Honda I, Nakamura RM, Myrvik QN. Splenic PGE2-releasing macrophages regulate Th1 and Th2 immune responses in mice treated with heat-killed BCG. *J Leukoc Biol.* 2005 Dec;78(6):1281-90.
- 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 Apr 15;168(8):4112-20.
- Silva MT, Silva MN, Appelberg R. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb Pathog.* 1989 May;6(5):369-80.
- St John G, Brot N, Ruan J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Weissbach H, e cols. Peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia coli and Mycobacterium tuberculosis protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Aug 14;98(17):9901-6.
- Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG. Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 1996 Dec 16;15(24):6960-8.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, e cols. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994 Feb 4;263(5147):678-81.
- 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.
- Suzuki K, Hino M, Kutsuna H, Hato F, Sakamoto C, Takahashi T, e cols. Selective activation of p38 mitogen-activated protein kinase cascade in human neutrophils stimulated by IL-1beta. *J Immunol.* 2001 Nov 15;167(10):5940-7.

- Tailleux L, Schwartz O, Herrmann JL, Pivert E, Jackson M, Amara A, e cols. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Jan 6;197(1):121-7.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76.
- Takeda Y, Watanabe H, Yonehara S, Yamashita T, Saito S, Sendo F. Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha. *Int Immunol*. 1993 Jun;5(6):691-4.
- 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 Jul 1;169(1):10-4.
- Talvani A, Machado FS, Santana GC, Klein A, Barcelos L, Silva JS, e cols. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in Trypanosoma cruzi-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun*. 2002 Aug;70(8):4247-53.
- Tan BH, Meinken C, Bastian M, Bruns H, Legaspi A, Ochoa MT, e cols. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. *J Immunol*. 2006 Aug 1;177(3):1864-71.
- 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 Nov 15;277(46):44507-12.
- Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR. Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha. *J Immunol*. 1997 Oct 1;159(7):3595-602.
- Thompson CR, Iyer SS, Melrose N, VanOosten R, Johnson K, Pitson SM, e cols. Sphingosine kinase 1 (SK1) is recruited to nascent phagosomes in human macrophages: inhibition of SK1 translocation by Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*. 2005 Mar 15;174(6):3551-61.
- Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998 Apr 17;93(2):241-52.
- Triggiani M, Oriente A, de Crescenzo G, Marone G. Metabolism of lipid mediators in human basophils and mast cells. *Chem Immunol*. 1995;61:135-47.
- Triggiani M, Oriente A, de Crescenzo G, Rossi G, Marone G. Biochemical functions of a pool of arachidonic acid associated with triglycerides in human inflammatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 1995 May-Jun;107(1-3):261-3.
- Triggiani M, Oriente A, Seeds MC, Bass DA, Marone G, Chilton FH. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1181-90.
- Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis*. 2003 Sep;3(9):578-90.
- Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM, e cols. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2002 Dec 1;169(11):6343-51.
- Twigg HL, 3rd. Macrophages in innate and acquired immunity. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004 Feb;25(1):21-31.
- Umlauf E, Csaszar E, Moertelmaier M, Schuetz GJ, Parton RG, Prohaska R. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*. 2004 May 28;279(22):23699-709.
- 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 Jul 19;102(29):10159-64.

- Vane J. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol.* 1971 Jun 23;231(25):232-5.
- Vane JR, Mitchell JA, Appleton I, Tomlinson A, Bishop-Bailey D, Croxtall J, e cols. Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 15;91(6):2046-50.
- Vergne I, Chua J, Deretic V. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic.* 2003 Sep;4(9):600-6.
- Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, Deretic V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 15;102(11):4033-8.
- Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:367-94.
- Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, e cols. Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Mar 30;101(13):4560-5.
- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 1997 May 16;272(20):13326-31.
- Via LE, Fratti RA, McFalone M, Pagan-Ramos E, Deretic D, Deretic V. Effects of cytokines on mycobacterial phagosome maturation. *J Cell Sci.* 1998 Apr;111 (Pt 7):897-905.
- Vieira-de-Abreu A, Amendoeira FC, Gomes GS, Zanon C, Chedier LM, Figueiredo MR, e cols. Anti-allergic properties of the bromeliaceae *Nidularium procerum*: inhibition of eosinophil activation and influx. *Int Immunopharmacol.* 2005 Dec;5(13-14):1966-74.
- 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 Sep;33(3):254-61.
- Villanueva M, Heckenberger R, Strobach H, Palmer M, Schror K. Equipotent inhibition by R(-), S(+)- and racemic ibuprofen of human polymorphonuclear cell function in vitro. *Br J Clin Pharmacol.* 1993 Mar;35(3):235-42.
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR, Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 1997 Nov 27;390(6658):350-1.
- Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE, 3rd, Honer Zu Bentrop K, e cols. Elemental analysis of Mycobacterium avium-, Mycobacterium tuberculosis-, and Mycobacterium smegmatis-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system. *J Immunol.* 2005 Feb 1;174(3):1491-500.
- Wan HC, Melo RC, Jin Z, Dvorak AM, Weller PF. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. *FASEB J.* 2007 Jan;21(1):167-78.
- Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Bouchier-Hayes D. Bacterial ingestion, tumor necrosis factor-alpha, and heat induce programmed cell death in activated neutrophils. *Shock.* 1996 Jan;5(1):47-51.
- Weinmann P, Gaetgens P, Walzog B. Bcl-XL- and Bax-alpha-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. *Blood.* 1999 May 1;93(9):3106-15.
- Weinrauch Y, Zychlinsky A. The induction of apoptosis by bacterial pathogens. *Annu Rev Microbiol.* 1999;53:155-87.

- Weinstein J. Synovial fluid leukocytosis associated with intracellular lipid inclusions. *Arch Intern Med.* 1980 Apr;140(4):560-1.
- Weissmann G. The actions of NSAIDs. *Hosp Pract (Off Ed).* 1991 Aug 15;26(8):60-8, 71-2, 5-6.
- Weller PF, Bozza PT, Yu W, Dvorak AM. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999 Feb-Apr;118(2-4):450-2.
- Weller PF, Dvorak AM. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. *J Allergy Clin Immunol.* 1994 Dec;94(6 Pt 2):1151-6.
- 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 Jan;138(1):141-8.
- WHO Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing : WHO report 2008. World Health Organization WHO/HTM/TB/2008.393
- Whyte MK, Meagher LC, MacDermot J, Haslett C. Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol.* 1993 Jun 1;150(11):5124-34.
- Wieland CW, Knapp S, Florquin S, de Vos AF, Takeda K, Akira S, et cols. Non-Mannose-capped Lipoarabinomannan Induces Lung Inflammation via Toll-like Receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Dec 15;170(12):1367-74.
- Winau F, Weber S, Sad S, de Diego J, Hoops SL, Breiden B, et cols. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. *Immunity.* 2006 Jan;24(1):105-17.
- Woods JW, Coffey MJ, Brock TG, Singer, II, Peters-Golden M. 5-Lipoxygenase is located in the euchromatin of the nucleus in resting human alveolar macrophages and translocates to the nuclear envelope upon cell activation. *J Clin Invest.* 1995 May;95(5):2035-46.
- Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, et cols. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J Exp Med.* 1993 Dec 1;178(6):1935-46.
- Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW, Jr., Kaufmann SH, et cols. Caspases mediate tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood.* 1999 Jan 15;93(2):674-85.
- Yaqoob P, Calder PC. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. *Br J Nutr.* 2007 Oct;98 Suppl 1:S41-5.
- Yu W, Bozza PT, Tzizik DM, Gray JP, Cassara J, Dvorak AM, et cols. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol.* 1998 Mar;152(3):759-69.
- Yu W, Cassara J, Weller PF. Phosphatidylinositol 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood.* 2000 Feb 1;95(3):1078-85.
- Zhang M, Gong J, Iyer DV, Jones BE, Modlin RL, Barnes PF. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest.* 1994 Dec;94(6):2435-42.
- Zink AR, Grabner W, Reischl U, Wolf H, Nerlich AG. Molecular study on human tuberculosis in three geographically distinct and time delineated populations from ancient Egypt. *Epidemiol Infect.* 2003 Apr;130(2):239-49.
- Zweytick D, Athenstaedt K, Daum G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Sep 18;1469(2):101-20.

# 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](#)