

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado Biologia Celular e Molecular

INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG E  
*Trypanosoma cruzi*: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE  
CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS *IN*  
*VIVO* E *IN VITRO*.

HELOISA D'AVILA DA SILVA BIZARRO

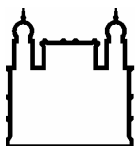
Rio de Janeiro

2006

# **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 Células e Molecular**

*Heloisa D'Avila da Silva Bizarro*

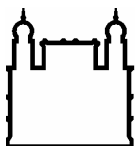
Infecção Aguda Experimental por *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*:  
Avaliação Morfológica e Funcional de Corpúsculos Lipídicos em Leucócitos e Macrófagos  
*in vivo* e *in vitro*.

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

**Orientador (es):** Prof. Dr. Patricia Torres Bozza  
Prof. Dr. Rossana Correa Netto Melo

**RIO DE JANEIRO**

2006



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***Heloisa D'Avila da Silva Bizarro***

**INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG E *Trypanosoma cruzi*: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS *IN VIVO* E *IN VITRO*.**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Prof. Dr. Patricia Torres Bozza**

**Prof. Dr. Rossana Correa Netto Melo**

**Aprovada em: 29/03/2006**

### **EXAMINADORES:**

Dra. Euzenir Nunes Sarno - Presidente

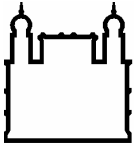
Dr. George Alexandre Dos Reis

Dr. Mário Mariano

Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro - suplente

Dra. Leila de Mendonça Lima - suplente

Rio de Janeiro, 29 de junho de 2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

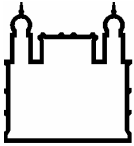
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG E *Trypanosoma cruzi*: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS *IN VIVO* E *IN* *VITRO*.

#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO

Os corpúsculos lipídicos são domínios citoplasmáticos que não apresentam membrana e que apresentam um papel importante na produção de mediadores inflamatórios por leucócitos. Neste estudo nós investigamos os mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos por patógenos intracelulares como *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*. O impacto da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos nas infecções também foi investigado. *M. bovis* BCG e *T. cruzi* induziram um aumento no número e tamanho de corpúsculos lipídicos, através de um mecanismo dependente do tempo e da concentração de patógeno. A formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos e eosinófilos ocorreu num mecanismo dependente de TLR2, mas não de TLR4. O aumento na formação de corpúsculos lipídicos, acompanhada por síntese de PGE<sub>2</sub> e TGF-β, foi observada durante as infecções e/ou quando macrófagos foram expostos a células apoptóticas, mas não a células necróticas ou vivas. Os corpúsculos lipídicos são sítios de localização de COX-2 e sítio predominante de síntese de PGE<sub>2</sub> em macrófagos, durante infecções *in vivo* e *in vitro* por patógenos intracelulares e quando macrófagos são co-cultivados com células apoptóticas. Além disso, nossos resultados sugerem que o receptor de vitronectina, TGF-β e reguladores do metabolismo lipídico, como o PPARγ, podem ter papel-chave na sinalização para a biogênese e função de corpúsculos lipídicos na produção de eicosanóides durante a fagocitose de células apoptóticas em infecções. Nossos achados demonstraram que corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos funcionam como plataformas de sinalização para a produção de mediadores inflamatórios, uma vez que substratos e enzimas-chaves compartimentalizados em corpúsculos lipídicos aumentam a capacidade de leucócitos inflamatórios ativados em gerar quantidades elevadas de eicosanóides durante infecções experimentais por patógenos intracelulares.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### INFECÇÃO AGUDA EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG E *Trypanosoma cruzi*: AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS EM LEUCÓCITOS E MACRÓFAGOS *IN VIVO* E *IN* *VITRO*.

#### ABSTRACT

#### TESE DE DOUTORADO

Lipid bodies are cytoplasmic domains, non-membrane bound, which may have roles in inflammatory mediator production in leukocytes. Here we investigated the mechanisms involved in lipid body formation by intracellular pathogens, such as *Mycobacterium bovis* BCG and *Trypanosoma cruzi*. The impact of uptake of apoptotic cells by macrophages on pathogen infection was also assessed. *Mycobacterium bovis* BCG and *T. cruzi* induced a dose- and time-dependent increase, both in size and numbers of lipid bodies. The Lipid body formation in macrophages and eosinophils occurred in a TLR2-, but not TLR4-dependent manner. Increased lipid body formation, accompanied by PGE<sub>2</sub> and TGF-β synthesis, was observed during infections by intracellular pathogens and when macrophages were exposed to apoptotic, but not necrotic or live cells. Lipid bodies were sites of COX-2 localization and the predominant location of PGE<sub>2</sub> synthesis in macrophages during the *in vivo* infection and when macrophages were co-cultured with apoptotic cells. In addition, results suggest that vitronectin receptor, TGF-β and regulators of lipid metabolism, such as PPARγ may have a key signaling role in the eicosanoid production and lipid body biogenesis during uptake of apoptotic cells in infections. Our findings demonstrated that pathogen-induced lipid bodies function as signaling platforms in the production of inflammatory mediator, since compartmentalization of substrate and key enzymes within lipid bodies have an impact on the capacity of activated inflammatory leukocytes to generate increased amounts of eicosanoids during experimental infection by intracellular pathogen.

*Dedicado com afeto aos  
meus pais, Saulo e  
Noêmia, e ao meu  
marido Júnior.*

## Agradecimentos

A Deus que sempre esteve ao meu lado no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, Saulo e Noêmia, pelas orações, amor e dedicação em todos os momentos. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Júnior, companheiro do dia-a-dia, pelo amor, zelo, compreensão, paciência e suporte nos momentos de angústia. E com quem compartilhei todos os momentos, tanto os difíceis quanto os alegres. Obrigada.

À Dr<sup>a</sup> Patrícia Torres Bozza, por me receber em seu laboratório com carinho e confiança, pelo incentivo e apoio incondicionais. Por me ajudar a escolher os melhores caminhos e pela sua dedicação extraordinária.

À Dr<sup>a</sup> Rossana Correa Netto Melo que, há 11 anos atrás, impulsionou os meus primeiros passos na carreira científica. E que, desde então, tem me acompanhado e orientado com carinho e dedicação.

Ao Dr Hugo Caire de Castro Faria Neto que sempre me orientou com afeto e contribuiu enormemente para o meu desenvolvimento.

Às amigas do grupo corpúsculos lipídicos Clarissa Maya-Monteiro, Adriana Ribeiro, Christianne Bandeira Melo e Patrícia Pacheco pelos conselhos, ensinamentos profissionais e discussões sobre resultados.

À amiga Patrícia Elaine e à minha aluna Natália Roque pela agradável convivência e ajuda nos experimentos.

A todos os queridos amigos do Laboratório de Imunofarmacologia: Rachel, Danielle, Cristiane Zanon, Andressa, Dri, Edson, Lígia, Cassiano, Fábio Amendoeira, Fábio Mesquita, Andrea Surrage, Lara, Érika, Bárbara, Diogo, Diego, Liliane, Válber, Kelly, Clarissinha, Léo, Michele, Fernando, Alessandra, Pedro, Renata e Gisele.

À amiga Rose Branco, sempre pronta a resolver qualquer problema. À secretária Andréa pela disponibilidade e ajuda. Às secretárias da Pós-graduação Cleide e Eliete pela eficiência no trabalho realizado frente ao departamento de ensino.



Aos amigos do Laboratório de Biologia da UFJF, Raúl, Daniela e Felipe pela afável convivência.

À Dra. Leila Mendonça de Lima, leitora prévia desta tese, pela disponibilidade e sugestões.

Ao Nelson, Edson e Bira pelo cuidado com os animais do nosso biotério. Às senhoras Rosilda, Dora, Valéria e Jane responsáveis pela manutenção do departamento.

A todos do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica.

## ***Lista de Figuras***

**Figura 1** – Corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos peritoneais murinos observados ao microscópio de campo claro (A) ou de fluorescência (B) após coloração com tetróxido de ósmio ou marcação com P96..... 3

**Figura 2** – Representação esquemática de receptores envolvidos no reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos.....27

## Lista de abreviaturas

<u><math>\alpha_v\beta_3</math></u>	integrina, receptor de vitronectina
<u>AA</u>	ácido araquidônico
<u>ADRP Proteína Relacionada à Diferenciação de Adipócito</u>	
<u>AO</u>	ácido oleico
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CCR3	receptor 3 de quimiocina do tipo CC
COX	ciclooxigenase
DAG	diacilglicerol
ECP	proteína catiônica de eosinófilos
EDAC	1 – etil-3 (3-dimetilamino-propil) carbodiimida
ELISA	Ensaio de Imuno-aderência Ligado à enzima
EPO	Peroxidase de eosinófilos
ERK ( )	quinase regulada por sinal extracelular
FLAP	proteína ativadora de 5-LO
GM-CSF	fator estimulador de crescimento de colônia de granulócitos e monócitos
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GTP	trifosfato de guanosina
HETE	ácidos hidroxí-eicosa-tetraenóicos
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
IL	interleucina
<u>LAM</u>	<u>lipoarabinomanana</u>
LDL	Lipoproteína Baixa Densidade
<u>LO</u>	<u>lipoxigenase</u>
<u>LPS</u>	<u>lipopolissacarídeo</u>
<u>LT()</u>	<u>leucotrieno</u>
<u>LTB<sub>4</sub></u>	<u>leucotrieno B<sub>4</sub></u>
<u>LTC<sub>4</sub></u>	<u>leucotrieno C<sub>4</sub></u>
MAP	proteína ativadora de mitose

MBP	proteína básica principal
MCP	proteína quimiotática de monócito tipo-1
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MIF	fator inibitório de migração de macrófagos
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NO	óxido nítrico
ODC	ornitina descarboxilase
PAF	fator ativador de plaquetas
PAT	<b>Perilipina, ADRP, TIP47</b>
PG ()	prostaglandina
PGD <sub>2</sub>	prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	prostaglandina E <sub>2</sub>
PI3K	fosfoinositol 3-quinase
PIM	mio-inositol manosídeo
PKC	proteína quinase C
PLA <sub>2</sub>	fosfolipase A <sub>2</sub>
PPAR	receptor ativador de proliferação de peroxissomos
PSR	receptor de fosfatidilserina
RANTES	“Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted
RNI	espécies de nitrogênio reativas
ROI	espécies de oxigênio reativas
SR	“scavenger receptors”
TAG	triacilglicerol
TGF	fator transformador de crescimento
Th	“T helper”
TLR	receptor do tipo “Toll”
TNF	fator de necrose tumoral
TSP	trombospondina

Índice	Pág.
<b>Resumo</b> .....	XIV
<b>Abstract</b> .....	XV
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>1.1 – Corpúsculos lipídicos</b> .....	2
<b>1.1.1 – Aspectos Gerais</b> .....	2
<b>1.1.2 – Formação de corpúsculos lipídicos</b> .....	4
<b>1.1.3 – Composição de corpúsculos lipídicos</b> .....	6
<b>1.1.4 – Envolvimento de corpúsculos lipídicos com a síntese de eicosanóides</b> .....	9
<b>1.1.5 – Corpúsculos lipídicos e a resposta imune inata</b> .....	10
<b>1.2 – Resposta do hospedeiro à infecção por patógenos intracelulares</b> .....	13
<b>1.2.1 – Tuberculose</b> .....	14
<b>1.2.2 – Doença de Chagas</b> .....	22
<b>1.2.3 – Papel da apoptose na infecção por patógenos intracelulares</b> .....	24
<b>2 – Objetivos</b> .....	31
<b>3 – Resultados</b>	
<b>Capítulo 1 – Formação e função de corpúsculos lipídicos em infecções por patógenos intracelulares</b> .....	32
<b>3.1 – <i>Mycobacterium bovis</i> BCG induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis <i>in vivo</i></b> .....	33
<b>3.2 – Macrophage lipid body formation induction by Chagas disease <i>in vivo</i>: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection</b> .....	44
<b>3.3 - Toll-like Receptor-2 and eotaxin mediate the recruitment of Eosinophils in inflammatory response induced by <i>Mycobacterium bovis</i> BCG in mice</b> .....	53
<b>Capítulo 2 – Modulação da formação e função de corpúsculos lipídicos por células apoptóticas</b> .....	71

3.4 - Uptake of apoptotic cells during <i>Trypanosoma cruzi</i> infection triggers lipid body formation: specialized organelles associated with PGE <sub>2</sub> generation in macrophages.....	73
3.5 - Neutrophils recruited to the site of <i>Mycobacterium bovis</i> BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and PGE <sub>2</sub> production by macrophages.....	98
<b>4 - Discussão.....</b>	<b>123</b>
<b>5 – Conclusões.....</b>	<b>139</b>
<b>6 - Referências Bibliográficas.....</b>	<b>140</b>

## **Neutrophils recruited to the site of *Mycobacterium bovis* BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and PGE<sub>2</sub> production by macrophages**

**Heloisa D'Avila<sup>‡</sup>, Hugo C. Castro-Faria-Neto<sup>‡</sup>, Rossana C. N. Melo<sup>†\*</sup>, Patrícia T. Bozza<sup>†\*</sup>**

<sup>‡</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>†</sup>Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil.

\* These senior authors have equally contributed for this work

Correspondence should be addressed to:

Dr. Patrícia T. Bozza

Laboratorio de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz; Av. Brasil 4365, Manguinhos 21045-900 Rio de Janeiro, RJ – Brazil. E-mail: [pbozza@ioc.fiocruz.br](mailto:pbozza@ioc.fiocruz.br)

Dr. Rossana C. N. Melo

Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil. E-mail: [rossana.melo@ufjf.edu.br](mailto:rossana.melo@ufjf.edu.br)

**Running title:** BCG-induced apoptosis stimulate lipid body formation and PGE<sub>2</sub> synthesis

**Keywords:** neutrophils, apoptosis, lipid body, prostaglandin, *Mycobacterium bovis* BCG

## Abstract

Influx of neutrophils to sites of mycobacterial infections is one of the first events of tuberculosis pathogenesis, however the roles of early neutrophil recruitment in the course of mycobacterial infection are not completely understood. Here we investigated the rate of neutrophil apoptosis in *Mycobacterium bovis* BCG recruited neutrophils and the role of macrophage uptake of apoptotic neutrophils in lipid body formation, TGF $\beta$  and PGE<sub>2</sub> production in a murine model of pleural tuberculosis. Neutrophil recruitment occurred in a time-dependent mechanism, with maximum influx observed within 6 h. Within 6 and 24 h large numbers of infected and non-infected neutrophils undergo apoptosis. By electron microscopy, recruited neutrophils present signals of activation within 1 h characterized by large number of glycogen particles and granules and cytoplasmic lipid bodies. But, at 24h of infection, most neutrophils present features of cell death. These cells exhibited distinct levels of agglomeration of glycogen particles, from few peripheral granules into large and numerous granules that occupied significant area in the cytoplasm and nuclear chromatin condensation. Increased lipid body formation, accompanied by PGE<sub>2</sub> production, was observed *in vitro* 6 h after macrophage exposure to apoptotic, but not necrotic or live neutrophils. Accordingly, lipid body formation, PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 synthesis occurs in parallel to macrophage uptake of apoptotic cells *in vivo*. Pretreatment of the animals with the pan-caspase inhibitor zVAD abrogates BCG-induced leukocyte apoptosis, without modifying the neutrophil influx in BCG-infected mice. Under this condition, lipid body formation was significantly inhibited in infected mice, indicating a role for apoptosis in lipid body biogenesis. In conclusion, the *in vivo* BCG infection induced activation and apoptosis of infected neutrophils at the inflammatory site. The uptake of apoptotic neutrophils by macrophages leads to TGF $\beta$ 1 generation and PGE<sub>2</sub>-derived lipid body formation, and may have modulatory roles in mycobacterial pathogenesis.



## Introduction

Protective immunity against mycobacteria depends on recruitment and activation of inflammatory cells to sites of infections. The roles of early neutrophil recruitment in the course of mycobacterial infection are not completely understood. Neutrophils are the first phagocytes to appear in the tuberculous exudate, although the migration of monocyte/macrophage lineage is predominant (Kasahara et al., 1998) (Antony et al., 1985). In mice, neutrophils migrate to sites of mycobacterial infection and may play a protective role given that neutropenia improves the growth of *M avium* (Appelberg et al., 1995) and neutrophil depletion by treatment with antibody increase the *M tuberculosis* in lungs (Pedrosa et al., 2000).

Neutrophils seem to be important for early control of bacterial infections because it can phagocyte and release potent mediators, indicating that neutrophils may initiate the inflammatory response to tuberculous bacilli, but it is not clear whether these cells have direct protective functions (Fulton et al., 2000). It has been demonstrated that neutrophils are activated by mycobacterial antigens and present mycobactericidal potential through reactive oxygen radical production and oxidative killing of intracellular pathogens (Jones et al., 1990; MacMicking et al., 1997). Conversely, Eruslanov *et al.* (Eruslanov et al., 2005) demonstrated that neutrophils present poor ability to restrict mycobacterial growth compared to that of lung macrophages, indicating that the prevalence of neutrophils in tuberculous inflammation contributes to development of pathology. Furthermore, neutrophils migrate in response to mycobacteria, engulf the bacilli and undergo apoptosis in susceptible mice (Aleman et al., 2002). Indeed, it has been recently shown that *M. tuberculosis*-induced neutrophil activation leads to the acceleration of apoptosis in neutrophils through mechanisms dependent of TLR2 and p38 MAP kinase (Aleman et al., 2005; Aleman et al., 2004). Accumulating evidence demonstrated that neutrophil apoptosis, followed by recognition and clearance, is associated with a down regulation of their proinflammatory capacity and prevents tissue damage (Henson, 2005). Fadok et al (Fadok et al., 1998) demonstrated that phagocytosis of apoptotic human neutrophils by macrophages triggers the production of TGF- $\beta$ 1 and PGE<sub>2</sub>. However, the uptake of apoptotic cells through

mechanisms dependent of TGF $\beta$  and PGE<sub>2</sub> lead to macrophage deactivation and drives the replication of intracellular pathogen (Freire-de-Lima et al., 2000; Ribeiro-Gomes et al., 2004). In agreement, increased levels of PGE<sub>2</sub> contribute to down-regulate cell mediated immunity, permitting disease progression, a phenomenon that could be reverted by treatment with COX2 inhibitors (Freire-de-Lima et al., 2000; Hines et al., 1995; Hsueh et al., 1979; Rangel Moreno et al., 2002).

The mechanisms involved in enhanced PGE<sub>2</sub> generation by apoptotic cells are not completely understood, and may involve regulated expression of eicosanoid-forming enzymes as well as compartmentalization of signaling components within discrete cellular locations. We have recently described that intracellular lipid domains, called lipid bodies, are involved in PGE<sub>2</sub> synthesis during BCG infection and our observations suggest that lipid bodies and lipid body-derived PGE<sub>2</sub> might have implications to the pathogenesis of mycobacterial infection (D'Avila et al., 2006).

In the present study, we used a murine model of pleural tuberculosis to demonstrate that mycobacterial infection induces intense neutrophils migration and apoptosis. Moreover, we demonstrated the uptake of apoptotic neutrophils triggers macrophages to increase the PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 synthesis and lipid body formation during BCG infection, contributing to inhibition of proinflammatory response of macrophages.

## **Materials and methods**

### **Reagents**

zVAD and Calcium ionophore (A23187) was obtained from Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA). Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) from Merck (Darmstadt, Germany). TACS Annexin-V FITC apoptosis detection Kit from R&D Systems (Minneapolis). PGE<sub>2</sub> EIA Kit from Cayman Chemicals CO. (Ann Arbor, MI). Nile red from Sigma (St Louis, MO).

### **Animals**

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

### ***Mycobacterium bovis* BCG**

*Mycobacterium bovis* BCG (Moreau strain) vaccine was kindly donated by Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil (Benévolo-de-Andrade et al., 2005). The freeze-dried vaccine was stored at 4 °C. BCG was resuspended in physiologic solution just before use.

### **Pleurisy induced by BCG**

Mice were intrapleurally (i.pl.) injected with 5 x 10<sup>6</sup> bacilli/cavity in 100 µL sterile saline. Control animals received an equal volume (100 µL) of sterile saline only. After different time intervals (1 h to 15 days) the animals were killed by CO<sub>2</sub> inhalation and their thoracic cavities were washed with 1 mL of the heparinized PBS (10 UI/mL). To inhibit the neutrophil apoptosis during BCG infection, one group of animals were i.pl pre-treated with 20 mg/kg of weight of zVAD, 5 minutes before BCG injection.

## **Neutrophils**

Neutrophils were obtained from the bone marrow. The marrow cavities from murine femurs were flushed with 3 ml of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS. Bone marrow cells were washed and resuspended in 5 ml of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS and placed on the top of a discontinuous Percoll gradient with densities of 57–72%. Cells were centrifuged for 30 min at 3500 rpm. Neutrophils were recovered from the interface (purity, >95%). The cells were washed twice in 10 ml of  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS. The cells were suspended in complete medium and UV-irradiated at 254 nm for 10 min followed by culture in RPMI containing 10% heat-inactivated FBS at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  for 4 h as described by (Fadok et al., 1998). The cells exhibited more than 90 % of apoptosis after Annexin –V staining. Viable cells were also frozen-thawed to obtain necrotic cells (Griffith et al., 1996).

## ***In vitro* infection**

Peritoneal cells from naïve C57/BL6 mice were harvested by lavage with sterile RPMI –1640 cell-culture medium. Macrophages ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were adhered in cover slides within culture plates (24 wells) overnight with RPMI-1640 cell-culture medium containing 2% FCS. The non-adherent cells were removed after vigorous PBS wash (2x). Macrophages were infected by BCG (MOI, 1:1) and/or treated with apoptotic, necrotic or living neutrophils (3:1) for 24 h at 37°C in  $\text{CO}_2$  atmosphere. Viability was assessed by trypan blue exclusion at the end of each experiment and was always greater than 90%. In priming study, pleural cells, stimulated as described above, were obtained for lipid body enumeration. Cells were washed in HBSS<sup>-/-</sup>. Pleural cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were resuspended in HBSS containing  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  and then stimulated with A23187 (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 15 min. Reactions were stopped on ice, and samples were centrifuged at 500g for 10 min at 4 °C.  $\text{PGE}_2$  was assayed in the cell-free supernatant by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical CO.).

### **Apoptosis quantification**

The pleural fluid from BCG-infected or control animals were centrifuged for 10 min at 1500 rpm. Neutrophils were purified under Percoll gradient as described above. Neutrophil apoptosis was detected *in situ* using TACS Annexin-V FITC apoptosis detection Kit, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN). The cells were observed in fluorescence microscopy.

### **Mycobacterium Staining**

Cytocentrifuged smears from *in vivo* infected group were fixed in methanol and stained with Kinyoun's carbol fuchsin as described by (Lavalley, 1973). The cells were observed under light microscopy in a 100x objective lens.

### **Total and differential cell analysis**

Total cells were counted in a Neubauer chamber after diluting in Turk solution (2% acetic acid solution). Differential analysis was performed by light microscopy in cytocentrifuged smears stained with May-Grünwald-Giemsa.

### **Electron Microscopy**

Pleural cells from control and infected animals ( $5 \times 10^6$  of BCG/cavity for 1 h and 24 h) were centrifuged (2000 rpm, 5 min) and the pellets obtained were resuspended and fixed in a mixture of freshly prepared aldehydes (1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.3 overnight at 4°C (Karnovsky, 1965). The cells were washed in the same buffer and embedded in molten 2% agar (Merck). Agar pellets containing the cells were post-fixed in a mixture of 1% phosphate-buffered osmium tetroxide and 1.5 % potassium ferrocyanide (final concentration) for 1h and processed for resin embedding (PolyBed 812, Polysciences, Inc., Warrington, PA). The sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella, Inc., Redding, CA) before staining with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (EM 10; Zeiss, Germany) at 60 KV.

### **Lipid body staining and enumeration**

Different techniques were used for lipid body staining and quantification. For quantitative studies, cells were stained by osmium tetroxide and enumerated exactly as described (Bozza et al., 1996). For fluorescent-labeled lipid bodies, cells recovered from the pleural cavities after 24h of the infection by BCG and controls were incubated with Nile Red (1:10000 from a stock solution of 0.1 mg/mL in acetone) for 10 minutes at room temperature. After incubation, cells were washed twice in  $\text{Ca}^{2+}$  - $\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS (HBSS<sup>-/-</sup>), cytospun onto slides and fixed in 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min.

### **Prostaglandin E<sub>2</sub> Measurement**

PGE<sub>2</sub> levels were measured directly in the supernatant from cell-free pleural lavage or *in vitro* stimulation at 24 h from control and stimulated groups. In priming studies, macrophages, stimulated *in vitro* as described above, were obtained for lipid body enumeration. Cells were stimulated with A23187 (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 15 min in HBSS containing  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ . Reactions were stopped on ice, and samples were centrifuged at 500g for 10 min at 4° C. PGE<sub>2</sub> was assayed in the cell-free supernatant by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical CO.).

### **TGF - $\beta$ 1 Measurement**

Supernatants from pleural cavities after 24h of the infection by BCG and controls were collected and stored at -20° C until the day of analysis. TGF -  $\beta$ 1 was measured using ELISA technique with specific monoclonal antibodies, according to manufacturer instructions (Duo Set Kit from R&D systems).

### **Image acquisition**

The images were obtained using an Olympus BX-FLA fluorescence microscope equipped with a Plan Apo 100x 1.4 Ph3 objective (Olympus Optical CO., Japan) and CoolSNAP-Pro CF digital camera in conjunction with Image-Pro Plus version 4.5.1.3 software (MediaCybernetics, San Diego, CA). The images were edited using Adobe Photoshop 5.5 software (Adobe Systems, San Jose, CA) Adobe Illustrator 10.0

**Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed statistically by means of ANOVA followed by the Neuman-Keuls - Student test with the levels of significance set at  $p < 0.05$ .

## Results and Discussion

Although neutrophils are capable of phagocytose and kill mycobacterium, the role for these cells during innate immunity and adaptive immune response to mycobacterial infection remains poorly defined. Studies using experimental infection have likewise failed to demonstrate a clear mechanism whereby neutrophils contribute to mycobacterial innate immunity (Appelberg et al., 1995; Pedrosa et al., 2000).

Pleural effusions from clinical or experimentally induced tuberculosis are characterized by an early influx of neutrophils followed by monocyte, lymphocyte and eosinophil influx (Aleman et al., 2005; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Penido et al., 2003; Werneck-Barroso et al., 2000). Accordingly, pleurisy induced by BCG infection induced significant cell recruitment at 6h, rating maximum at 24h of infection and persisting for 15 days after infection (Figure 1A). At 6h, the cell infiltrate were predominately of neutrophils that rapidly (from 1 to 6 h) migrated to pleural cavity of infected animals. Though, after this time the number of neutrophils reduced and at 15 days of infection neutrophil numbers were not significantly different from control (Figure 1B and C). The fate of recruited neutrophils to the pleural cavity of BCG-infected mice was analyzed. Neutrophils recruited to the inflammatory foci were able to rapidly ingest BCG, and large numbers of BCG-containing neutrophils were observed after Kinyoun's staining, an appropriated mycobacterium staining, at 1h of infection (Figure 1D). In fact, neutrophils are phagocytic and have mycobactericidal activity (Fulton et al., 2000; Majeed et al., 1998).

It has been recently demonstrated that human neutrophils undergo rapid apoptosis *in vitro* when stimulated with *Mycobacterium tuberculosis* through mechanisms dependent of TLR2 and p38 MAPK pathway (Aleman et al., 2004; Kasahara et al., 1998). The rate of neutrophil apoptosis in *in vivo* infected animals was analyzed. We observed that BCG is able to induce neutrophil apoptosis *in vivo*. Within 24 h of BCG infection, a significant number of the cells that migrated to pleural cavity undergo apoptosis (29.74%) as observed in Figure 2A. Inflammatory neutrophils account for a large amount of apoptotic cells (Figure 2B), indeed more than one third of infiltrating neutrophils were identified as apoptotic by Annexin-V FITC within 24 h. The apoptotic neutrophils



showed green positive staining that matched with -Annexin-V FITC after *in situ* staining (Figure 2C). By light microscopy, apoptotic neutrophils from BCG-infected mice exhibited typical apoptotic morphology, such as nuclear condensation, reduced volume and cytoplasm showing vacuoles (Figure 2D).

Electron microscopy analysis demonstrated, at 1h of infection, neutrophils presenting phagosome-containing BCG in its cytoplasm exhibited morphology like normal cells, as electron dense nuclei and few granules in the cytoplasm (Figure 3A). These bacteria were contained inside phagosomes (Figure 3B detail), showing typical structure with membrane and peripheral lucent zone; all phagosomes containing intact bacteria exhibited the same morphology (Figure 3A). Frequently, these neutrophils were showed in close association with other cells, suggesting interaction between neutrophils and cells at the inflammatory site (Figure 3A).

As shown in figure 3 B, in animals infected with fluorescent-labeled BCG we observed the presence of large numbers of fluorescent-labeled cytoplasmic lipid bodies (yellow) in infected neutrophils. In these cells the bacteria was observed in green (Figure 3B). It has been demonstrated that lipid body formation in leukocytes is a highly regulated event that depends on the interaction of cellular receptors with their ligands, are involved in inflammatory mediator production and are markers of leukocyte activation (Bozza and Bandeira-Melo, 2005), thus indicating that 1h of infection the neutrophils are highly activated.

Recent studies have suggested that *M. tuberculosis*-induced neutrophil activation leads to the acceleration of apoptosis in these cells (Aleman et al., 2005; Aleman et al., 2002). In BCG-infected mice, neutrophils exhibited intact morphology at 1h of infection (Figure 4A), and signals of cell activation could already be observed as large number of glycogen particles, large number of granules and cytoplasmic lipid bodies. But, at 24h of infection, most of neutrophils present features of cell death. These cells exhibited distinct levels of agglomeration of glycogen particles, from few peripheral granules (Figure 4B) into large and numerous granules that occupied significant area in the cytoplasm and nuclear chromatin condensation (Figure 4C). At the same time, neutrophils apoptotic were phagocyted by macrophages. In Figure 4 D, an activated macrophage exhibited phagosome containing infected neutrophil with

very condensed nucleus, reduced cytoplasm, compact cytoplasmic and high agglomeration of glycogen particles (Figure 4D).

During BCG infection, macrophages showed morphological signals of activation within 24h of infection. These cells were voluminous with a striking increase in surface ruffings and cytoplasmic organelles such as arrays of rough endoplasmic reticulum, polysomes, lysosomes, mitochondrion profiles, and vesicles (Figure 5). Intact apoptotic neutrophils were observed inside of phagosome, these cells exhibited a dark electron dense nucleus and, frequently these neutrophils were infected (Figure 5A). In Figure 5 B, macrophage showed a large number of phagosomes containing apoptotic bodies with or without bacteria. In addition, some macrophages exhibited phagosomes and phagolysosomes with varying sizes and electron densities containing amorphous or granular materials (Figure 5C). These structures may represent stages of bacterial or cellular disintegration. In fact, apoptotic neutrophils are engulfed by inflammatory macrophages.

Apoptotic neutrophil recognition and clearance in the lung were shown to play critical functions in the resolution of the inflammatory response, by the removal of the inflammatory cells themselves, along with ingested organisms, and also by the generation of potent anti-inflammatory mediators (Henson, 2005). Ingestion of apoptotic cells by macrophages induces TGF- $\beta$ 1 and prostaglandin secretion, resulting in an anti-inflammatory effect and suppression of proinflammatory mediators (Fadok et al., 1998). However, the uptake of apoptotic cells drives the replication of intracellular parasites through mechanisms dependent of TGF $\beta$  and PGE<sub>2</sub> (Freire-de-Lima et al., 2000; Ribeiro-Gomes et al., 2004). We next evaluated if apoptotic neutrophil uptake by macrophages would lead to enhanced anti-inflammatory mediator synthesis and lipid body biogenesis.

Figure 6 shows that cells from BCG infected animals, appropriately treated for lipid fixation and staining, contain markedly increased numbers of lipid bodies at 24 h when compared to non infected animals control (Figure 6A). Since lipid bodies are stores of the eicosanoid precursor, arachidonic acid in different leukocyte subsets including eosinophils, neutrophils and monocytes, and contain eicosanoid-forming enzymes (Bozza and Bandeira-Melo, 2005; D'Avila et al., 2006), we investigated whether increased numbers of leukocyte

lipid bodies from animals infected by BCG would lead to enhanced prostaglandin production. Increased levels of PGE<sub>2</sub> in the pleural fluid was observed after 24 h of infection (Figure 5B), concomitantly to lipid body formation (Figure 1A). In addition, TGF-β1, an important cytokine involved in macrophage deactivation were produced at 24h of BCG infection (Figure 6C). By electron microscopy, macrophages from infected group showed round, non-membrane bound, lipid bodies as large and light dense structures with a frequent peripheral rim of electron dense material (Figure 6D). These macrophages showed phagosomes containing bacteria and apoptotic bodies (Figure 6 detail).

To confirm whether the uptake of apoptotic neutrophils can be involved in enhanced lipid body formation and prostaglandin production during BCG infection, murine peritoneal macrophages were co-cultured with living, necrotic or apoptotic neutrophils. At 24h, we observed that BCG infection and phagocytosis of apoptotic cells significantly increased the number of lipid bodies in macrophages, however no differences was observed between control and living or necrotic groups (Figure 7A). Moreover, we observed that the uptake of apoptotic cells synergize with the effects of BCG infection on lipid body formation (Mean ± SEM; from 5.9 ± 1.2 lipid bodies/cell in BCG group to 10.16 ± 1.673 BCG plus apoptotic cell group) (Figure 7A).

Consecutively, we investigated whether increased numbers of lipid bodies from group stimulated with apoptotic cells would lead to enhanced prostaglandin production. Again, apoptotic cells increase the effects of BCG infection on PGE<sub>2</sub> synthesis (Mean ± SEM; from 3.6 ± 0.03 ng/ml in BCG group to 14.0 ± 0.3 ng/ml in BCG plus apoptotic cell group (Figure 7B). No differences in PGE<sub>2</sub> levels in the supernatant from control and macrophages co-cultured with living and necrotic cells were observed (Figure 7B).

Unstimulated cells respond to submaximal concentrations of calcium ionophore by generating low levels of eicosanoids. In a process known as “priming”, the cells after *in vitro* stimulation with BCG and/or live and dead neutrophils were stimulated with 0.5 μM calcium ionophore A23187. The levels of the PGE<sub>2</sub> released after priming increased in the groups stimulated with BCG, apoptotic cells and BCG plus apoptotic cells (Figure 7C). Again, apoptotic

cells worked synergistically with BCG infection to induce enhanced lipid body-derived PGE<sub>2</sub> production (Mean  $\pm$  SEM; from  $2.5 \pm 0.03$  ng/ml in BCG group  $4.5 \pm 0.03$  to ng/ml in BCG plus apoptotic cell group)(Figure 7C). These results suggest that, similarly to *T. cruzi* infection (D' Avila, in preparation), the uptake of apoptotic cells induced the synthesis of PGE<sub>2</sub> and we demonstrated that lipid bodies are sites of increased eicosanoid productions in this condition. In addition, we have recently demonstrated that cyclooxygenase 2 were localized in BCG-induced lipid bodies and most newly-formed PGE<sub>2</sub> in BCG infection *in vivo* occurs at lipid bodies (D'Avila et al., 2006).

To confirm the involvement of apoptotic cells in modulating the BCG infection, mice were i.pl. treated with the pan caspase-inhibitor zVAD-fmk peptide immediately before BCG infection. Although, zVAD pretreatment was able to affect the neutrophil migration to pleural cavity during infection, the caspase-inhibitor rescued neutrophils from death during BCG infection (Figure 8A). Also, the inhibition of apoptosis significantly, although partially, reduced the lipid body formation induced during BCG infection *in vivo* (Figure 8B). This data corroborate the involvement of apoptotic neutrophil uptake on lipid body formation *in vivo*.

In conclusion, the *in vivo* BCG infection induced activation and apoptosis in infected neutrophils in the inflammatory site. Both BCG and uptake of apoptotic neutrophils by macrophages induced lipid body formation inducible organelles that may function as signaling platforms to generate increased amounts of PGE<sub>2</sub> in macrophages, an anti-inflammatory mediator that may favors the bacteria persistence by macrophages deactivation.

## References

- Aleman, M., S.S. de la Barrera, P.L. Schierloh, L. Alves, N. Yokobori, M. Baldini, E. Abbate, and M.C. Sasiain. 2005. In tuberculous pleural effusions, activated neutrophils undergo apoptosis and acquire a dendritic cell-like phenotype. *J Infect Dis.* 192:399-409.
- Aleman, M., A. Garcia, M.A. Saab, S.S. De La Barrera, M. Finiasz, E. Abbate, and M.C. Sasiain. 2002. Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 27:583-92.
- Aleman, M., P. Schierloh, S.S. de la Barrera, R.M. Musella, M.A. Saab, M. Baldini, E. Abbate, and M.C. Sasiain. 2004. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect Immun.* 72:5150-8.
- Antony, V.B., S.A. Sahn, A.C. Antony, and J.E. Repine. 1985. Bacillus Calmette-Guerin-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest.* 76:1514-21.
- Appelberg, R., A.G. Castro, S. Gomes, J. Pedrosa, and M.T. Silva. 1995. Susceptibility of beige mice to Mycobacterium avium: role of neutrophils. *Infect Immun.* 63:3381-7.
- Benévolo-de-Andrade, T.C., R. Monteiro-Maia, C. Cosgrove, and L.R.R. Castello-Branco. 2005. BCG Moreau Rio de Janeiro - An oral vaccine against tuberculosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:459-465.
- Bozza, P.T., and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:113-120.
- Bozza, P.T., J.L. Payne, J.L. Goulet, and P.F. Weller. 1996. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183:1515-25.
- D'Avila, H., R.C. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro Faria Neto, and P.T. Bozza. 2006. Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology.* 176:3087-3097.
- Eruslanov, E.B., I.V. Lyadova, T.K. Kondratieva, K.B. Majorov, I.V. Scheglov, M.O. Orlova, and A.S. Apt. 2005. Neutrophil responses to Mycobacterium tuberculosis infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun.* 73:1744-53.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. 1998. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 101:890-8.
- Freire-de-Lima, C.G., D.O. Nascimento, M.B. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. de Mello, G.A. DosReis, and M.F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403:199-203.
- Fulton, S.A., T.D. Martin, R.W. Redline, and W. Henry Boom. 2000. Pulmonary immune responses during primary mycobacterium bovis- Calmette-

- Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 22:333-43.
- Griffith, T.S., X. Yu, J.M. Herndon, D.R. Green, and T.A. Ferguson. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 5:7-16.
- Henson, P.M. 2005. Dampening inflammation. *Nat Immunol.* 6:1179-81.
- Hines, M.E., 2nd, J.M. Kreeger, and A.J. Herron. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Lab Anim Sci.* 45:334-51.
- Hsueh, W., C. Kuhn, 3rd, and P. Needleman. 1979. Relationship of prostaglandin secretion by rabbit alveolar macrophages to phagocytosis and lysosomal enzyme release. *Biochem J.* 184:345-54.
- Jones, G.S., H.J. Amirault, and B.R. Andersen. 1990. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. *J Infect Dis.* 162:700-4.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137A-138A.
- Kasahara, K., I. Sato, K. Ogura, H. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Adachi. 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 178:127-37.
- Lavallee, P.W. 1973. A new fluorescence and Kinyoun's acid-fast stain. *Am J Clin Pathol.* 60:428-9.
- MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-50.
- Majeed, M., N. Perskvist, J.D. Ernst, K. Orselius, and O. Stendahl. 1998. Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb Pathog.* 24:309-20.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R.S. Cordeiro, and M.G. Henriques. 1997. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 62:778-85.
- Pedrosa, J., B.M. Saunders, R. Appelberg, I.M. Orme, M.T. Silva, and A.M. Cooper. 2000. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun.* 68:577-83.
- Penido, C., A. Vieira-de-Abreu, M.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2003. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol.* 171:6788-94.
- Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. 2002. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 106:257-66.
- Ribeiro-Gomes, F.L., A.C. Otero, N.A. Gomes, M.C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A.C. Arnholdt, V.L. Calich, S.G. Coutinho, M.F. Lopes, and G.A. DosReis. 2004. Macrophage interactions with

neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 172:4454-62.

Werneck-Barroso, E., A.C. Moura, M.M. Monteiro, O. Menezes de Lima Junior, M.N. de Meirelles, and M.G. Henriques. 2000. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res.* 49:206-13.

## Figure Legends

**Figure 1. BCG infection induces time-dependent cell migration in pleural cavities.** Kinetic of BCG-induced total cell (A) and neutrophil (B) migration in pleural cavity 1, 6, 24, 48 h and 15 days after infection. (C) Large number of neutrophils is observed at 24 h of infection. (D) Neutrophils at 24h of infection exhibiting phagocytosed bacteria (arrow) after Kinyoun's staining. Bars 10  $\mu\text{m}$ . C57BL/6 mice were i.pl. infected with BCG ( $5 \times 10^6$  bacilli/cavity). Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from at least 8 animals. Statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences between control and infected groups are indicated by asterisks.

**Figure 2. BCG infection induces apoptosis of pleural cells.** Number of total (A) and neutrophils apoptosis (B) induced at 24h after i.pl infection. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from at least 8 animals. Statistically significant ( $p < 0.05$ ) difference between control and infected group is indicated by asterisks. (C) *In situ* Annexin -V FITC staining of isolated neutrophils from infected animals. Apoptotic cells show a positive green fluorescence staining. (D) Morphological examination of apoptotic neutrophils (arrow) after May-Giemsa staining. Bars 10  $\mu\text{m}$ .

**Figure 3. Morphological features of neutrophils from infected mice.** (A) Infected neutrophils after 1h of infection showed three phagosomes containing BCG (b). In detail, phagosome exhibiting membrane and electron-dense bacteria, electron lucent area is observed around the bacteria. Pleural cells were fixed in a mixture of glutaraldehyde and paraformaldehyde, embedded in agar, and processed for transmission electron microscopy. Bars 1  $\mu\text{m}$ . (B) Fluorescent Nile Red-labeled lipid bodies were visualized at 1h after *in vivo* infection as cytoplasmic punctate inclusions (yellow) in neutrophils with phagocytosed fluorescent-labeled BCG (green), *lower*; Phase contrast of the same cells, *upper*. Pleural cells were recovered from infected group ( $5 \times 10^6$  bacilli/cavity) at 24h, fixed with 3.7% formaldehyde and stained by Nile Red. Bar, 10  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4. Neutrophils in degeneration present accumulation of glycogen particles and are phagocytosed by macrophages.** (A) Neutrophils at 1h of infection showing a phagosome containing bacteria and an electron lucent lipid body (arrowhead). In B and C, neutrophils exhibiting distinct levels of glycogen agglomeration at 24h of infection. (D) Macrophage presenting apoptotic neutrophils in phagosome. Bar: 1  $\mu\text{m}$

**Figure 5. Uptake of apoptotic neutrophils by macrophages at 24h of infection.** At 24h of infection, macrophage exhibiting: (A) large number of phagosome with apoptotic bodies and bacteria are showing in the phagosomes (white arrows); (B) apoptotic neutrophils, with condensed nucleus (n) and disorganization of cytoplasm, inside phagosome (black arrows) and vacuole with amorphous material (arrowhead); (C) large number of vacuoles with digested material (head arrows). Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

**Figure 6. *In vivo* lipid body formation, PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$ 1 synthesis occurs in parallel to macrophage uptake of apoptotic neutrophils.** Number of lipid bodies (A) and levels of PGE<sub>2</sub> (B) and TGF- $\beta$ 1 (C) within 24 h of BCG infection in mice. (D) Macrophage exhibited in the same field large number of electron lucent lipid bodies (LB), apoptotic body (apo) and phagosome containing BCG (b). In detail, phagosome with apoptotic body. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from at least 8 animals. Statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences between control and infected groups are indicated by asterisks. n, nucleus. Bar, 1  $\mu\text{m}$ .

**Figure 7. Apoptotic cells, but not necrotic or live cells induce lipid body formation and PGE<sub>2</sub> synthesis in macrophages.** (A) Number of macrophages lipid bodies, (B) PGE<sub>2</sub> levels in the supernatant or (C) after re-stimulation with calcium ionophore (0,5  $\mu\text{M}$  for 15 min at 37 °C) in macrophages co-cultures with apoptotic, necrotic or living cells (3:1) for 24h. Peritoneal macrophages ( $1 \times 10^6$  cells/well) were *in vitro* infected by BCG (5:1) for 24h. After then, the cells were re-stimulated with A23187 (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 15 min. PGE<sub>2</sub> were measured by EIA and lipid bodies were enumerated following osmium staining. Data are means  $\pm$

SEM from at least 8 mice. Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) are indicated by asterisks or +.

**Figure 8. Effect of apoptosis inhibition on macrophage lipid body formation and neutrophil migration in infected animals.** (A) Number of apoptotic neutrophils, (B) macrophage lipid body formation and (C) neutrophils influx in control and infected groups after pre-treatment (5 min) with ZVAD (caspase inhibitor) at 24h of infection. . Each bar represents the mean  $\pm$  SEM from at least 8 animals. Statistically significant ( $p < 0.05$ ) differences are indicated by asterisks or +.

**Toll-like Receptor-2 and eotaxin mediate the recruitment of eosinophils in inflammatory response induced by *Mycobacterium bovis* BCG in mice**

**Heloisa D´Avila, Patricia E. Almeida, Natália R. Roque, Hugo C. Castro-Faria-Neto, Patricia T. Bozza\***

Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**\*Corresponding author:** P.T. Bozza, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil - 21045-900 Tel.: 55-21-2598-4492. Fax: 55-21- 2590-9490  
e-mail: [pbozza@ioc.fiocruz.br](mailto:pbozza@ioc.fiocruz.br)

**Running title:** Mechanisms of eosinophil recruitment induced by BCG infection

**Key Words:** *Mycobacterium bovis* BCG; Toll-like receptor; tuberculosis; eosinophils; chemokines; lipid bodies; CCR3.

**Characters Count:** 23,483

## Abstract

Mechanisms of eosinophil recruitment and activation induced by *Mycobacterium bovis* BCG infection were investigated. Engagement of TLR proteins activates the expression of proinflammatory mediators by macrophages and regulates host susceptibility to pathogens. Here, mice deficient in the TLR2 and TLR4 were infected i.t. by *M. bovis* BCG (Moreau strain). Pleural BCG infection induced significant eosinophil recruitment starting within 6 h, maximal within 24-48 h and remained increased after 15 days of infection. Recruited eosinophils into sites of BCG infection presented signs of activation as attested by the augmented lipid body formation. BCG-induced eosinophil recruitment and increased lipid body formation was completely inhibited in TLR2 deficient mice, but not in two strains of TLR4-deficient mice, when compared to wild type animals. BCG-induced increased IL-5 and eotaxin/CCL11 generation were drastically inhibited in TLR2 deficient animals *in vitro* as well as *in vivo*. The involvement of eotaxin/CCL11 in BCG-induced eosinophil recruitment and activation was assessed. Neutralizing antibodies to eotaxin/CCL11 or CCR3 drastically inhibited eosinophil recruitment and lipid body formation within recruited eosinophils in BCG-infected animals. Together, these data demonstrate that BCG-induced eosinophil recruitment and activation is largely dependent of TLR2 signaling and eotaxin.

## Introduction

Eosinophils are fundamentally found in tissues that have an interface with the external environment and its bacterial flora, such as the gastrointestinal and respiratory tracts (Kato et al., 1998; Svensson and Wenneras, 2005). Increased eosinophil numbers are largely associated with allergy and helminthic infections (Kato et al., 1998; Svensson and Wenneras, 2005) although that cells can be involved in other inflammatory responses including viral and bacterial infections (Rosenberg and Domachowske, 2001). Mycobacterial infections frequently show eosinophil recruitment in naturally occurring infections in human patients (Vijayan et al., 1992) and experimental infections in animals (Castro et al., 1991; D'Avila et al., 2006; Lasco et al., 2004; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Werneck-Barroso et al., 2000). The role of eosinophils in bacterial infection pathogenesis is not well defined. The bactericidal potential of eosinophils has been demonstrated by their ability to phagocytose, mount a respiratory burst, and to mobilize cytotoxic proteins from specific granules, such as major basic protein (MBP), eosinophil peroxidase (EPO) and [eosinophil cationic protein](#) (ECP) in response to Gram-positive and Gram-negative bacteria bursts (DeChatelet et al., 1977; Svensson and Wenneras, 2005), suggesting a protective role of eosinophils in bacterial infections. Indeed, eosinophil granules contain peroxidase capable of killing mycobacteria (Borelli et al., 2003). However, unrestricted growth of mycobacteria in animals susceptible to infection with tuberculosis-causing organisms is accompanied by striking increase in the number of eosinophils at sites of infection (Erb et al., 1999). These studies hypothesized that the eosinophil influx may exaggerated the disease severity because eosinophils, which have been shown to phagocytose mycobacteria (Castro et al., 1991), may provide an intracellular habitat in which mycobacteria could proliferate in an unrestricted manner and may also contribute to hematogenous dissemination of mycobacteria leading to an increased bacterial load in the other tissues (Kirman et al., 2000). Accordingly, enhanced eosinophil recruitment to sites of infection was observed in mouse susceptible strains than in the resistant ones (Werneck-Barroso et al., 2000). Although the implication the eosinophils to pathophysiology of tuberculosis are not completely understood, different studies have demonstrated that eosinophils are recruited and activated in the course of mycobacterial infection. However, the mechanisms involved in eosinophil have not been fully investigated

In the present study, we used a murine model of pleural tuberculosis to demonstrate that mycobacterial infection induces eosinophil migration in a highly regulated manner that is largely dependent of TLR2 signaling. Moreover, our results indicate that BCG-induced eosinophil migration and activation is mediated through TLR2-dependent endogenous eotaxin generation signaling through CCR3.

## **Materials and methods**

### **Antibodies and reagents**

Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) from Merck (Darmstadt, Germany). Multiplex cytokine kit was obtained from Upstate, (Waltham, MA).. RPMI and thiocarbohydrazide was obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO). Neutralizing antibodies to murine eotaxin and CCR3 and Eotaxin DuoSet Kit were from R&D Systems (Minneapolis, MN). BCG-derived LAM was kindly donated by Dr. Pessolani (FIOCRUZ, Brazil).

### **Animals**

C57BL/6 and C57BL/10 mice were obtained from the Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, Brazil) breeding unit. C57/BL10 ScCr (TLR4-deficient mice) were obtained from Universidade Federal Fluminense (Rio de Janeiro, Brazil). TLR2 knockout (KO) mice in a homogeneous C57BL/6 background (Takeuchi et al., 1999) were kindly donated by Dr. Shizuo Akira (from Osaka University, Japan), MCP-1/CCL2-deficient mice in a mixed C57Bl/6 and 129Sv/J genetic background and wild type litter mates (Lu et al., 1998) were kindly provided from Dr. Craig Gerard (Harvard Medical School, Boston, MA), and TNFR1 (p55) deficient mice in a homogeneous C57Bl/6 background were obtained from the Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Animals were bred and maintained under standard conditions in the breeding unit of the Oswaldo Cruz Foundation, Brazil. Animals were caged with free access to food and water in a room at 22 to 24 °C and a 12 h light/dark cycle in the Department of Physiology and Pharmacodynamic animal facility until used. Animals weighing 20 to 25 g from both sexes were used. All protocols were approved by the Fundação Oswaldo Cruz animal welfare committee.

### **Mycobacterium bovis BCG**

*Mycobacterium bovis* BCG (Moreau strain) vaccine was provided by Fundação Athaulpho de Paiva, Rio de Janeiro, Brazil. The freeze-dried vaccine was stored at 4°C. BCG was resuspended in physiologic solution (for the *in vivo* experiments) or RPMI-1640 cell –culture medium (for the *in vitro* experiments) at 5 X 10<sup>7</sup> bacilli/mL just before use and adjusted to 1 x 10<sup>6</sup> or 1 x 10<sup>5</sup> colony-forming units (CFU)/mL of vehicle.

### ***In vitro* infection with *M. bovis* BCG**

Peritoneal cells were harvested by lavage with sterile RPMI –1640 cell-culture medium. Cells ( $1 \times 10^6$  cells/mL) were adhered in cover slides within culture plates (24 wells) overnight with RPMI-1640 cell-culture medium containing 2% fetal bovine serum. After 2h, the non-adherent cells were removed after lavage with sterile PBS (twice), and the peritoneal cells were infected with BCG (MOI, 1:10) for 24h at 37°C in CO<sub>2</sub> atmosphere. The cell-free supernatants were recovered and storage at –20 °C.

#### **Pleurisy induced by BCG:**

Wild type and knockout mice were intrapleurally (i.pl.) injected with live or heat-killed BCG ( $5 \times 10^6$  bacilli/cavity) or LAM (500ng/cavity) in 100 µl sterile saline. Controls animals received an equal volume (100 µl) of sterile saline. After different time intervals (1 h to 15 days) the animals were killed by CO<sub>2</sub> inhalation and their thoracic cavities were washed with 1 mL of the heparinized PBS (10 UI/mL). To evaluate the involvement of CCR3 activation, C57Bl/6 mice were pre-treated with an intraperitoneal injection of anti-eotaxin (10 µg/cavity), or anti-CCR3 (10 µg/cavity) 30 min before BCG infection.

#### **Eosinophil analysis**

Total cells were counted in a Neubauer chamber, after diluting in Turk solution (0.01% crystal violet in 2 % acetic acid solution) to lyse the red blood cells and expressed as million of cells/cavity. Eosinophil analysis was performed by light microscopy in smears prepared in a cytocentrifuge (Cytocentrifuge, Shandon, Pittsburg) (140 x g) and stained with May-Grünwald-Giemsa. Values shown represent cell counts adjusted to the full volume of the pleural lavage fluid recovered from each animal.

#### **Lipid body staining and enumeration**

Cytospun containing pleural cells from *in vivo* experiments were fixed in 3.7% formaldehyde in Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>- free HBSS (pH 7.4), rinsed in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4), stained in 1.5% osmium tetroxide (30 min), rinsed in water, immersed in 1.0% thiocarbohydrazide (5min), rinsed in water, rinsed in 0.1M cacodylate buffer, restained in 1.5% osmium tetroxide (3min), rinsed in water, dried, and mounted. The morphology of fixed cells was observed, and lipid bodies were enumerated with light microscopy and a 100x objective lens in 50 consecutively scanned eosinophils.



### **Eotaxin and IL-5 analysis**

Supernatants from *in vitro* and *in vivo* infections were collected and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until the day of analysis. IL-5 was analyzed using luminex technology. A mouse multiplex cytokine kit was obtained and the assay performed according to the manufacturer's instructions (Upstate, Waltham, MA). Fifty  $\mu\text{L}$  of sample was analyzed on the Bio-Plex system (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Data analyses of all assays were performed with the Bio-Plex Manager software. Eotaxin was measured according to manufacturer's instructions by the Mouse Eotaxin DuoSet kit (R&D Systems).

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed statistically by means of ANOVA followed by the Neuman-Keuls - Student test with the levels of significance set at  $P < 0.05$ .

## Results and Discussion

### ***Mycobacterium bovis* BCG infection induced increased eosinophil influx in a time- and BCG viability- dependent manner**

The initial events during a pleural and/or pulmonary tuberculosis infection are poorly understood and there are few models to evaluate the sequence of events that follow the first contact of the host with the mycobacteria. Here we used the BCG-induced pleurisy in mice because it is a straightforward and well-established model for leukocyte and inflammatory mediator assessment (D'Avila et al., 2006; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Penido et al., 2003). To analyze the effect of BCG infection on cell migration, susceptible C57BL/6 mice were intrapleurally injected with BCG at  $5 \times 10^6$  bacilli/cavity. We observed a significant migration of eosinophil after 6 h of infection. At 24 h, a peak in the number of eosinophils was observed; that remained increased at least until 15 days of infection as previously demonstrated (Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Penido et al., 2003). Control mice and infected at 1h had no detectable eosinophils in the cavity (Fig. 1A).

To determine if the eosinophil migration depends on bacterial viability, i.pl. infection by live or heat-killed BCG were compared. Although heat-killed-BCG were capable of recruiting eosinophils to the pleural cavity within 24h, it was reduced compared to the same dose of live-BCG, suggesting that eosinophil recruitment was partially dependent of the bacterial viability.

In order to ascertain if the mycobacterial - cell wall component LAM can induce eosinophil influx, C57BL/6 mice were stimulated with LAM (500 ng/cavity). At 24h, significant increase in the number of eosinophil was observed in the group stimulated with LAM, however to a lesser extent than live BCG (Figure 1B), suggesting that other mycobacterial components may participate in BCG-induced eosinophil recruitment.

### **Mechanisms involved on eosinophil recruitment and lipid body formation in BCG-infected animals**

Pattern-recognition receptors involved in recognizing mycobacteria include the mannose receptor, complement receptor and Toll-like receptors (TLRs) (Medzhitov and Janeway, 2000). TLR2 and TLR4, and more recently, TLR6 and TLR1 that

heterodimerizes with TLR2, have been shown to mediate intracellular signaling induced by mycobacteria (Means et al., 2001; Means et al., 1999; Takeuchi et al., 2002). To investigate the role of TLR-mediated pathogen recognition in the mechanism of eosinophil influx and lipid body formation, we infected TLR-2 and TLR4 wild type and knock out mice by BCG. Significantly, we observed that BCG-induced eosinophil migration in TLR2-defective C57BL/6 mice was drastically inhibited when compared with C57BL/6 wild type mice (Figure 2A). In contrast, TLR4-defective mice, C57BL/10 ScCr, were capable to induce eosinophil migration when infected by BCG, at levels comparable to TLR4 wild type mice (Figure 2B).

It has been demonstrated that the lipid body formation in leukocytes is a highly regulated event that depends on the interaction of cellular receptors with their ligands, are involved in inflammatory mediator production and are markers of leukocyte activation (Bozza and Bandeira-Melo, 2005). *In vivo* the ability of BCG to induce eosinophil lipid body formation through TLR2 dependent pathway was observed. As shown in Figure 2C-D, the BCG significantly induced lipid body formation in C57BL/6, C57BL/10 ScSn, C57BL/10 ScCr, but not in TLR2<sup>-/-</sup> eosinophils. These results demonstrate an essential role for TLR2 receptors in BCG recognition by cells from pleural cavity and signaling to induce eosinophil recruitment and lipid body formation in eosinophils.

It has been demonstrated that eosinophils do not to express TLR2, TLR4, or CD14, and consequently are not capable to directly respond to TLR2 or TLR4 ligands (Meerschaert et al., 2000; Sabroe et al., 2002). Indeed, it has been demonstrated that the TLR4-ligand LPS induces eosinophil accumulation *in vivo* in experimental animals through mechanisms that are largely dependent on monocyte/macrophage and lymphocyte derived cytokine production (Bozza et al., 1994; Penido et al., 2003). Similar monocyte/macrophage-derived cytokine dependent mechanisms could be involved in TLR2-dependent eosinophil recruitment induced by BCG.

### **TLR-2 deficient mice were unable to synthesize IL-5 during BCG infection both *in vivo* and *in vitro***

Recent works have described the role of interleukin-5 in eosinophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG in wild-type and in interferon- $\gamma$  deficient mice (Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997). As eosinophil migration induced by BCG was inhibited in TLR-2 deficient mice (Figure 2A), we analyzed the

involvement of TLR2 in IL-5 synthesis during BCG infection *in vivo* and *in vitro*. Our results demonstrated that TLR-2 knockout mice produced reduced amounts of IL-5 in the pleural fluid of BCG infected animals compared to wild type mice at 24h after infection (Figure 3A). Similarly, peritoneal cells from TLR-2 knockout mice were unable to produce IL-5 while infected *in vitro* by BCG, under conditions where wild type mice produced significant levels of IL-5 when infected (Figure 3B), indicating that IL-5 production induced by BCG is dependent of TLR2.

### **Involvement of endogenously generated pro-inflammatory cytokines in eosinophil recruitment induced by BCG**

It has been previously described that mycobacterial infections up regulate genes encoding proteins involved in cell migration and homing, like MCP-1 and TNF. Furthermore, it has been demonstrated that mice deficient in interferon (IFN)  $\gamma$  or TNF- $\alpha$  are extremely susceptible to infection with tuberculosis-causing organisms (Erb et al., 1999). The roles of three cytokine/chemokine relevant to cell activation in mycobacterium-induced response were evaluated as to their involvement in BCG-induced eosinophil influx. As shown in Figure 4, no difference in eosinophil recruitment was observed 24 h after infection when each respective wild-type were compared to MCP-1/CCL2 (A) and TNFR1 (B) genetically deficient animals. In agreement with previous findings (Kirman et al., 2000), in interferon (IFN)  $\gamma$  knockout mice we observed increased influx of eosinophils compared to wild type mice (C).

### **Endogenous Eotaxin signal through CCR3 for BCG-induced eosinophil recruitment and lipid body formation**

Eotaxin is a key mediator in the eosinophil trafficking into mucosal tissues (Rothenberg, 1999). In addition, eotaxin-mediated CCR3 activation is a potent inducer of lipid body formation in eosinophils (Bandeira-Melo et al., 1999; Vieira-de-Abreu et al., 2005). Thus, we first evaluated whether BCG infection induced eotaxin production and if this mechanism is dependent of TLR2. For this, pleural cells from TLR-2 wild type and knock out mice were stimulated by BCG or LAM. As shown in Figure 5A, BCG significantly induced eotaxin production *in vivo* detected in the pleural fluid of TLR2<sup>+/+</sup> but not in TLR2<sup>-/-</sup> (Figure 5A). Accordingly, eotaxin up-regulation has been observed by transcriptome gene array analysis of the

macrophage cell line THP-1 infected by *M. tuberculosis* (Ragno et al., 2001). To investigate the *in vivo* role of eotaxin activation on BCG-induced lipid body formation and eosinophil recruitment, we pretreated mice with neutralizing antibodies to eotaxin or CCR3. Both BCG-induced eosinophil influx and lipid body formation were dramatically inhibited by the pretreatment with neutralizing antibodies (Figure 5B,C), indicating that endogenous eotaxin, acting via CCR3, elicited *in vivo* lipid body formation within infiltrating eosinophils. It is important to point out that neutrophil and monocyte recruitment as well as lipid body formation within those infiltrating cells that is observed within 24 h after BCG infection (D'Avila et al., 2006; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997), were not affected by pretreatment with anti-CCR3 or with anti-eotaxin, suggesting that antibody neutralization or genetically deficient animals to these molecules would be useful tools to address the role of eosinophils in mycobacterial pathogenesis in future studies.

In conclusion, our findings demonstrated that mycobacterial infection induces eosinophil migration in a highly regulated manner that is largely dependent of TLR2 signaling. Moreover, our results indicate that BCG-induced eosinophil migration and activation is mediated through TLR2-dependent endogenous eotaxin generation signaling through CCR3.

## References

- Bandeira-Melo, C., A.S. Calheiros, P.M. Silva, R.S. Cordeiro, M.M. Teixeira, and M.A. Martins. 1999. Suppressive effect of distinct bradykinin B2 receptor antagonist on allergen-evoked exudation and leukocyte infiltration in sensitized rats. *Br J Pharmacol.* 127:315-20.
- Borelli, V., F. Vita, S. Shankar, M.R. Soranzo, E. Banfi, G. Scialino, C. Brochetta, and G. Zabucchi. 2003. Human eosinophil peroxidase induces surface alteration, killing, and lysis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 71:605-13.
- Bozza, P.T., and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:113-120.
- Bozza, P.T., H.C. Castro-Faria-Neto, C. Penido, A.P. Lorangeira, M. das Gracias, M.O. Henriques, P.M. Silva, M.A. Martins, R.R. dos Santos, and R.S. Cordeiro. 1994. Requirement for lymphocytes and resident macrophages in LPS-induced pleural eosinophil accumulation. *J Leukoc Biol.* 56:151-8.
- Castro, A.G., N. Esaguy, P.M. Macedo, A.P. Aguas, and M.T. Silva. 1991. Live but not heat-killed mycobacteria cause rapid chemotaxis of large numbers of eosinophils in vivo and are ingested by the attracted granulocytes. *Infect Immun.* 59:3009-14.
- D'Avila, H., R.C. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro Faria Neto, and P.T. Bozza. 2006. *Mycobacterium bovis* BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology.* 176:3087-3097.
- DeChatelet, L.R., P.S. Shirley, L.C. McPhail, C.C. Huntley, H.B. Muss, and D.A. Bass. 1977. Oxidative metabolism of the human eosinophil. *Blood.* 50:525-35.
- Erb, K.J., J. Kirman, B. Delahunt, H. Moll, and G. Le Gros. 1999. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon-gamma signalling. *Eur Cytokine Netw.* 10:147-54.
- Kato, M., G.M. Kephart, N.J. Talley, J.M. Wagner, M.G. Sarr, M. Bonno, T.W. McGovern, and G.J. Gleich. 1998. Eosinophil infiltration and degranulation in normal human tissue. *Anat Rec.* 252:418-25.
- Kirman, J., Z. Zakaria, K. McCoy, B. Delahunt, and G. Le Gros. 2000. Role of eosinophils in the pathogenesis of *Mycobacterium bovis* BCG infection in gamma interferon receptor-deficient mice. *Infect Immun.* 68:2976-8.
- Lasco, T.M., O.C. Turner, L. Cassone, I. Sugawara, H. Yamada, D.N. McMurray, and I.M. Orme. 2004. Rapid accumulation of eosinophils in lung lesions in guinea pigs infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 72:1147-9.
- Lu, B., B.J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B.J. Rollins. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 187:601-8.
- Means, T.K., B.W. Jones, A.B. Schromm, B.A. Shurtleff, J.A. Smith, J. Keane, D.T. Golenbock, S.N. Vogel, and M.J. Fenton. 2001. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. *J Immunol.* 166:4074-82.
- Means, T.K., S. Wang, E. Lien, A. Yoshimura, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 163:3920-7.
- Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med.* 343:338-44.

- Meerschaert, J., W.W. Busse, P.J. Bertics, and D.F. Mosher. 2000. CD14(+) cells are necessary for increased survival of eosinophils in response to lipopolysaccharide. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:780-7.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R.S. Cordeiro, and M.G. Henriques. 1997. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 62:778-85.
- Penido, C., A. Vieira-de-Abreu, M.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2003. Role of monocyte chemotactic protein-1/CC chemokine ligand 2 on gamma delta T lymphocyte trafficking during inflammation induced by lipopolysaccharide or *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin. *J Immunol.* 171:6788-94.
- Ragno, S., M. Romano, S. Howell, D.J. Pappin, P.J. Jenner, and M.J. Colston. 2001. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. *Immunology.* 104:99-108.
- Rosenberg, H.F., and J.B. Domachowske. 2001. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. *J Leukoc Biol.* 70:691-8.
- Rothenberg, M.E. 1999. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:291-5.
- Sabroe, I., L.C. Parker, A.G. Wilson, M.K. Whyte, and S.K. Dower. 2002. Toll-like receptors: their role in allergy and non-allergic inflammatory disease. *Clin Exp Allergy.* 32:984-9.
- Svensson, L., and C. Wenneras. 2005. Human eosinophils selectively recognize and become activated by bacteria belonging to different taxonomic groups. *Microbes Infect.* 7:720-8.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 11:443-51.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 169:10-4.
- Vieira-de-Abreu, A., E.F. Assis, G.S. Gomes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, C. Bandeira-Melo, and P.T. Bozza. 2005. Allergic Challenge-Elicited Lipid Bodies Compartmentalize In Vivo Leukotriene C4 Synthesis within Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33:254-261.
- Vijayan, V.K., A.M. Reetha, M.S. Jawahar, K. Sankaran, and R. Prabhakar. 1992. Pulmonary eosinophilia in pulmonary tuberculosis. *Chest.* 101:1708-9.
- Werneck-Barroso, E., A.C. Moura, M.M. Monteiro, O. Menezes de Lima Junior, M.N. de Meirelles, and M.G. Henriques. 2000. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res.* 49:206-13.

## **Uptake of apoptotic cells during *Trypanosome cruzi* infection triggers lipid body formation: specialized organelles associated with PGE<sub>2</sub> generation in macrophages**

**Heloisa D'Avila<sup>\*</sup>, Lara F. Caiado<sup>\*</sup>, Célio G. Freire-de-Lima<sup>#</sup>, Adriana R. Silva<sup>\*</sup>, Natalia R. Roque<sup>\*</sup>, Thereza Christina Barja-Fidalgo<sup>+</sup>, Rossana C. N. Melo<sup>†</sup>, George A. DosReis<sup>#</sup>, Hugo C. Castro-Faria-Neto<sup>\*</sup> and Patrícia T. Bozza<sup>1\*</sup>**

<sup>\*</sup> Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>+</sup> Departamento de Farmacologia, Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil

<sup>#</sup> Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco G, Rio de Janeiro 21949-900, Brazil.

<sup>†</sup> Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

**\*Corresponding author:** P.T. Bozza, Laboratório de Imunofarmacologia, Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, IOC, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brazil - 21045-900 Tel.: 55-21-2598-4492. Fax: 55-21- 2590-9490  
e-mail: [pbozza@ioc.fiocruz.br](mailto:pbozza@ioc.fiocruz.br)

**Running title:** Apoptotic cells induce lipid body formation in macrophages

**Keywords:** apoptotic cells, *Trypanosome cruzi*, macrophages, PGE<sub>2</sub>, lipid bodies

Characteres Count: 29,947



## Abstract

The role of cyclooxygenase metabolites in the modulation of macrophage response to pathogens is striking and one important issue in understanding of innate immunity responses is the regulation of the production of lipid mediators such as eicosanoids. Apoptotic cell up taken by macrophages leads to increased prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> generation with impacts to enhanced intracellular parasite growth, however the mechanisms involved in the regulation of PGE<sub>2</sub> production by apoptotic cell clearance are not fully elucidated. In this work, we analyzed the mechanisms involved in COX-2 expression and signaling compartmentalization within lipid bodies leading to enhanced PGE<sub>2</sub> synthesis after uptake of apoptotic cells during *T. cruzi* infection in macrophages. Our results demonstrated that *T. cruzi* induced lipid body formation and enhanced COX-2 expression accompanied by enhancement in PGE<sub>2</sub> production in macrophages, these phenomena were markedly enhanced by co-culture of apoptotic cells or anti- $\alpha_v\beta_3$  alone. Anti- $\alpha_v\beta_3$ -induced lipid body formation and enhanced COX-2 expression were partially blocked by the disintegrin Flavoridin. Apoptotic cell uptake also increased the production of TGF- $\beta$ . Treatment with recombinant TGF- $\beta$  alone induced macrophage lipid body formation, while anti-TGF- $\beta$  inhibits apoptotic cell-induced lipid body formation suggesting a positive feedback mechanism by TGF- $\beta$ . The effect of apoptotic cells increasing lipid body formation and PGE<sub>2</sub> secretion was also diminished by GW 9662, a selective inhibitor of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ). This result suggests that regulators of lipid metabolism, such as PPAR $\gamma$  that are also linked to the control of inflammatory response and cell proliferation, may have a key signaling role in the eicosanoid production and lipid body formation. Importantly, we demonstrate by intracellular immunofluorescent localization of newly formed eicosanoid, that lipid bodies were the predominant sites of PGE<sub>2</sub> synthesis in activated macrophages. In conclusion, during *T. cruzi* infection the uptake of apoptotic cells modulates macrophage function via lipid body formation and COX-2 expression with increased PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$  production.

## Introduction

Clearance of dying cells is critical to tissue homeostasis in the multicellular organisms. In recent years, accumulating data suggest that removal of apoptotic cells is a two-stage process. First, recognition and uptake by phagocytic cells prevents the eventual release of potent pro-inflammatory intracellular contents, as well as intracellular materials that may be pro-immunogenic. The second step is characterized by the induction of an active anti-inflammatory response which involves phagocytic cells and uptake of apoptotic bodies. Both the uptake and anti-inflammatory responses appear to require that the dying cell lose phospholipid asymmetry, thus exposing phosphatidylserine (PS) on the external leaflet of the plasma membrane (Fadok et al., 2001b; Hoffmann et al., 2001).

Previous works, have demonstrated that when macrophages ingest apoptotic cells, they are able to release TGF- $\beta$  (Fadok et al., 1998a; Huynh et al., 2002; McDonald et al., 1999) which would then act in an autocrine or paracrine manner to inhibit the production of pro-inflammatory cytokines. In fact, TGF-  $\beta$  has been shown to down regulate the production of pro-inflammatory mediators in macrophages (Fadok et al., 2001a; Ruscetti et al., 1993). Fadok et al (Fadok et al., 1998a) reported that the phagocytosis of apoptotic human neutrophils triggered the production of TGF- $\beta$ 1, as well IL-10 by macrophages, and also the production and secretion of PGE<sub>2</sub>.

An intense apoptosis of both inflammatory cells and cardiomyocytes have been identified during the experimental and human with *Trypanosoma cruzi*, the protozoan parasite causative agent of Chagas' disease. The interaction of apoptotic, but not necrotic T lymphocytes, with macrophages infected with *T. cruzi* favors parasite growth (Freire-de-Lima et al., 2000; Lopes and DosReis, 2000). Similarly, in a model of *Leishmania* infection, intracellular amastigote forms imitate apoptotic cells and down regulate macrophage microbicidal activity by a mechanism involving TGF- $\beta$  (de Freitas Balanco et al., 2001)

Distinct receptors such as scavenger receptors (Platt et al., 1996), phosphatidylserine receptors (Hoffmann et al., 2001), CD36 (Fadok et al., 1998b) and vitronectin receptors are involved in the recognition of apoptotic cells. The recognition of apoptotic cells by vitronectin receptor is critical in apoptotic-cell cytoadherence and is the induction of PGE<sub>2</sub> and TGF- $\beta$  release in *T. cruzi* infection. In addition, the injection of apoptotic cells in infected mice increased parasitaemia,

whereas treatment with cyclooxygenase inhibitors almost completely inhibited the parasite replication, suggesting that the increase of parasite replication of intracellular protozoan is facilitated by increased production of eicosanoids (Freire-de-Lima et al., 2000).

Recently, we have demonstrated that lipid bodies are the main intracellular sites for PGE<sub>2</sub> synthesis during intracellular pathogen infection (D'Avila et al., 2006). Also, *T. cruzi* infection in rats induced important lipid body formation in inflammatory macrophages (Melo et al., 2003) suggesting that lipid bodies carry out specific functions in eicosanoid generation in the course of intracellular pathogen infections that go beyond those of simple lipid storage organelles and might have implications to the pathogenesis of infections.

In the present study, we investigate the role of apoptotic cells in the modulation of macrophage responses against *T. cruzi*. In this context, we considered that inflammatory macrophages that ingested apoptotic cells exhibited lipid body formation in a tightly regulated manner that is largely dependent of recognition of apoptotic cells via vitronectin receptor, activation of PPAR $\gamma$  and TGF- $\beta$  production. Moreover, we demonstrated that newly formed lipid bodies are structurally distinct intracellular sites for PGE<sub>2</sub> synthesis with paracrine and/or intracrine functions during *T. cruzi* infection.

## **Material and Methods**

### **Antibodies and Reagents**

Purified hamster anti-mouse CD61 (integrin  $\beta_3$  chain) and anti-mouse CD51 (integrin  $\alpha_v$  chain) monoclonal antibodies and control hamster IgG were purchased from BD Biosciences Pharmingen (San Diego). Human TGF- $\beta_1$ , Duo set Elisa Development System was from R&D Systems (Minneapolis, MN). Mouse anti-PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> EIA Kit and GW9662 were from Cayman Chemical CO (Ann Arbor, MI) and Guinea pig polyclonal anti-mouse ADRP from Research Diagnostics Inc. (Flanders, NJ). CY2-conjugated donkey anti-guinea pig and CY3-conjugated donkey anti-mouse were from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. (West Grove, PA). 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide (EDAC), Osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) were from Merck (Darmstadt, Germany) and dexamethasone from Merck & CO, Inc. (West Point, PA). LPS from *Escherichia coli* O111:B4, RPMI medium, Ficoll-Paque, human serum albumin, bovine serum albumin and aspirin were from Sigma (St Louis, MO). Celecoxib from Calbiochem (San Diego, CA). Mouse-anti COX-2 was from B&D Transduction (San Jose, CA). Rabbit anti-mouse conjugated with peroxidase was from Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, UK), and DEMEM medium from HyClone (Logan, UT). Nutridoma-SP was from Roche (Switzerland).

### **Culture of macrophages derived from human PBMC**

Human PBMCs were purified from "Buffy Coats" kindly donated by Clementino Fraga Filho University Hospital at the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro. Blood was diluted (1:2) in RPMI (RPMI, 2mM L-glutamine, 1mM sodium pyruvate, 10 mg/ml gentamicin, MEM non-essential amino acids, 10mM HEPES and 50 mM 2-ME 250 IU/ml penicillin/ streptomycin) (pH 7.4). The mononuclear cells were isolated in Ficoll-Paque gradient by centrifugation (400 g for 30 min at room temperature), washed twice with RPMI and resuspended in DEMEM medium (250 IU/ml penicillin/ streptomycin, 4 mM L-glutamine, 1000 mg/ml glucose, 1mM sodium pyruvate) (pH 7.4). Cells were cultured in 6-wells plates in DEMEM medium (10% human serum albumin) for 10 to 15 days at 37 °C, with 7% CO<sub>2</sub>, to macrophage differentiation. During the last three days, cells were cultured in DEMEM medium with 1% Nutridoma-SP .

### **Apoptosis induction and quantification**

Splenocytes from normal C57Bl/6 mice were incubated in complete RPMI medium with 1% Nutridoma-SP containing 1  $\mu$ M dexamethasone overnight to obtain apoptotic cells. Viable cells were submitted to two cycles of freeze/thaw to obtain necrotic cells. In lymphocytes purified from human peripheral blood or Jurkat cell line apoptosis was induced by heating (56 °C for 30 min) as described (Griffith et al., 1996). Dead or viable cells ( $3 \times 10^6$  per well) were then incubated with cultured macrophages. Apoptotic, necrotic and live cells were stained *in situ* with annexin V-FITC (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions, to confirm the efficiency (more than 80%) of the induction of apoptosis or necrosis.

### ***In vitro* infection**

Human PBMC from normal donors or peritoneal macrophages from uninfected C57Bl/6 mice were cultured ( $1 \times 10^6$ /well) in complete RPMI medium with 1% Nutridoma-SP at  $1 \times 10^6$  cells/ml on 24-well plates (Corning). Cells were infected with  $3 \times 10^6$  metacyclic trypomastigote forms of *T. cruzi* clone Dm 28c. After 24 h, non internalized parasites were removed. The cells were treated with apoptotic, live or necrotic cells ( $3 \times 10^6$  cells/well), or with anti- $\alpha_v$  or  $\beta_3$  monoclonal antibodies (10  $\mu$ g/ml) or LPS (1 or 1,5  $\mu$ g/ml) or TGF- $\beta$ 1 (1 or 5 ng/ml) for 24h at 37 °C, with 7% CO<sub>2</sub>. To investigate the effect of COX inhibitors, human PBMC were treated with aspirin (10  $\mu$ g/ml) or celecoxib (1 $\mu$ M). Extracellular motile trypomastigotes were counted in culture supernatants after 10 days of infection. Infected untreated wells were used as controls. To confirm the involvement of the vitronectin receptor, two wells were pre-treated with 0.1 or 1  $\mu$ M of desintegrin flavoridin (from Dr. Barja-Fidalgo from UERJ, Rio de Janeiro, Brazil), 5 min before stimulation with apoptotic cells. To investigate the involvement of PPAR -  $\gamma$ , one well was pre-treated with 0,1  $\mu$ M of GW 9662, 30 min before stimulation with apoptotic cells. To assess the role of TGF- $\beta$ 1, one well stimulated with apoptotic cells was pre-treated (30 min) with neutralizing antibody against TGF- $\beta$ 1 (50  $\mu$ g/ml).

### ***In vivo* infection**

Female Holtzman rats aged 27-30 days were inoculated intraperitoneally with a single inoculum of 150  $\mu$ l of mouse blood containing  $3 \times 10^5$  trypomastigotes of *T.*

*cruzi*, Y strain. Fresh blood sampled from the tail showed living trypomastigotes in all animals 6 days after inoculation.

### **Lipid body staining and enumeration**

Murine macrophages adhered in cover slides in 24-well plates from control and treated groups were fixed with 3.7% formaldehyde at room temperature for 10 min and stained by osmium tetroxide and numerated exactly as described (Bozza et al., 1996).

### **TGF- $\beta$ production**

The content of TGF- $\beta$ 1 in supernatants from control and treated groups was evaluated by sandwich ELISA according to the manufacturer's instructions (R&D Systems).

### **Prostaglandin E<sub>2</sub> Measurement**

PGE<sub>2</sub> levels were measured directly in the supernatant from culture of macrophages from control and stimulated groups by enzyme-linked immunoassay (EIA), according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical CO.).

### **COX-2 Immunolocalization**

Murine macrophages adhered in cover slides were fixed in 3.0 % formaldehyde at RT for 10 min, permeabilized with 0.05% saponin/HBSS<sup>-/-</sup> solution (5 min) and then blocked with 10 % normal goat serum. After washing, slides were incubated for 1 h at RT with anti-COX-2 (1:150) polyclonal antibody diluted in 0.05 % saponin/HBSS<sup>-/-</sup> solution. Non-immune rabbit serum (1:150) was used as control. After three washes of 5 min, the preparations were incubated 1h at RT with the secondary antibody, biotin-conjugated goat anti-rabbit IgG. The cell immunoreactivity was then identified by ABC Vectastatin glucose-oxidase kit as the manufacturer's instructions. The glucose-oxidase immunostaining was visualized under bright microscopy.

### **Immunodetection of PGE<sub>2</sub> at its site of production**

Immunolocalization of PGE<sub>2</sub> at its formation sites within stimulated macrophages were performed as described (Bandeira-Melo et al., 2001; Liu et al., 1992) and modified as follows. Briefly, control macrophages and macrophages treated with apoptotic cells were fixed and permeabilized with 0.5 % EDAC for 15 min at 37 °C,

washed once in HBSS<sup>-</sup> and incubated with mouse anti-PGE<sub>2</sub> (1:100) in 0.1 % normal goat serum and guinea pig polyclonal anti-mouse ADRP (1:1000) in 0.1 % normal donkey serum simultaneously for 1 h at RT. MOPC 21 and non immune guinea pig serum was used as control. Cells were washed twice and incubated with secondary antibodies, CY3- conjugated donkey anti-mouse (1:1000) and CY3-conjugated donkey anti-guinea pig (1:1000). The cells were washed (3 times, 10 min each) and mounted with aqueous mounting medium (Polysciences). Cells were analyzed by both phase-contrast and fluorescence microscopy.

### **Western Blotting for COX-2**

Cell lysates were prepared in reducing and denaturing conditions before being subjected to SDS-PAGE. Protein concentrations were normalized in each fraction after micro BCA assay. Samples were prepared in denaturing conditions and separated by electrophoresis in 10% SDS-PAGE gels. After transfer onto nitrocellulose membranes, non-specific binding sites were blocked with 5% non-fat milk (Bio-Rad, Hercules, CA) in Tris buffered saline-Tween (TBST; 50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20). Membranes were probed with anti-COX-2 antibody (1 $\mu$ g/mL) in TBST with 1% non-fat dry milk. COX-2 was then identified by incubating the membrane with HRP-conjugated secondary antibodies (1/30,000) in TBST with 1% milk, followed by detection of antigen-antibody complexes by Supersignal Chemiluminescence (Pierce Chemical, Rockford,IL) and the membrane was exposed to film (MR biomax, Kodak).

### **Electron Microscopy**

The morphology of heart macrophages was evaluated in infected rats at 12 days postinfection. Fragments of atria of infected animals were fixed in phosphate-buffered 1% paraformaldehyde and 1% glutaraldehyde, pH 7.3, overnight at 4° C (Karnovsky, 1965). Tissue fragments were post-fixed in a mixture of 1% phosphate-buffered osmium tetroxide and 1.5 % potassium ferrocyanide (final concentration). Cells were dehydrated and embedded in Epon (PolyBed 812, Polysciences, Inc., Warrington, PA). The sections were mounted on uncoated 200-mesh copper grids (Ted Pella, Inc., Redding, CA) before staining with uranyl acetate and lead citrate and viewed with a transmission electron microscope (EM 10; Zeiss, Germany) at 60 KV.

### **Image acquisition**

The images were obtained using an Olympus BX-FLA fluorescence microscope equipped with a Plan Apo 100× 1.4 Ph3 objective (Olympus Optical CO., Japan) and CoolSNAP-Pro CF digital camera in conjunction with Image-Pro Plus version 4.5.1.3 software (MediaCybernetics, San Diego, CA). The images were edited using Adobe Photoshop 5.5 software (Adobe Systems, San Jose, CA).

### **Statistical analysis**

The results were expressed as mean  $\pm$  SEM and were analyzed statistically by means of ANOVA followed by the Neuman-Keuls - Student test with the levels of significance set at  $P < 0.05$ .



## Results and Discussion

Previous works we have shown that there is intense lymphocyte apoptosis in an experimental model of Chagas' disease and that the interaction of apoptotic, but not necrotic T lymphocytes with *T. cruzi*-infected macrophages exacerbates parasite growth (Freire-de-Lima et al., 2000; Lopes et al., 1995). To investigate whether the phagocytosis of apoptotic cells predisposes human macrophages to *T. cruzi* infection, human PBMC were infected with *T. cruzi* and after 24h, exposed to apoptotic or viable lymphocytes. Apoptotic, but not living cells increased *T. cruzi* growth in PBMC cultures (Figure 1). Importantly, no increase in *T. cruzi* growth was noted when necrotic cells were added after *T. cruzi* infection (data not shown).

Freire-de-Lima et al (Freire-de-Lima et al., 2000) demonstrated that the cyclooxygenase (COX) metabolite, prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>), was implicated as important molecule involved in the mechanism that promoted *T. cruzi* growth in macrophages after uptake of apoptotic cells. We, for this reason, tested two non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): aspirin, an inhibitor of both constitutive and inducible cyclooxygenases (Meade et al., 1993) and celecoxib, a specific antagonist of inducible COX, (COX-2) (van Ryn and Pairet, 1997). Both aspirin and celecoxib completely abolished the increased *T. cruzi* growth after incubation of macrophages with apoptotic cells without affecting basal parasite replication (Figure 1). These data reinforce our previous finds (Freire-de-Lima et al., 2000) and indicate that cyclooxygenase metabolites are crucial for parasite growth-promoting activity of apoptotic cells in human macrophages *in vitro*.

We have recently identified that the *in vivo* acute infection with *T. cruzi* induces increased lipid body formation in inflammatory macrophages of the heart, a target organ of the disease (Melo et al., 2003), (Melo et al., 2006 submitted). Also, we provided evidence that lipid bodies are functionally active organelles involved with PGE<sub>2</sub> synthesis since eicosanoid forming enzymes and newly formed PGE<sub>2</sub> are co-localized within lipid bodies during innate immune responses. (Bozza and Bandeira-Melo, 2005; D'Avila et al., 2006; Pacheco et al., 2002). Here, we investigated whether lipid bodies would be involved in prostaglandin production after the uptake of apoptotic cells by *T. cruzi* infected macrophages. With this purpose, murine peritoneal macrophages were co-cultured with living, necrotic or apoptotic splenocytes. We observed a marked increase in the numbers of lipid bodies in macrophages at 24h after the phagocytosis of apoptotic cells. However no increase

in lipid body numbers was observed when living or necrotic splenocytes were incubated with cultured macrophages (Figure 2A). These results indicate that signals transduced after specific recognition of apoptotic cells by macrophages triggers the formation of lipid metabolizing sites within their cytoplasm. To provide additional evidence the apoptotic bodies induce lipid body formation, we analyzed heart inflammatory macrophages by transmission electron microscopy (TEM) using an *in vivo* model of *T. cruzi* infection. The acute phase of Chagas' disease is characterized by apoptosis of cardiomyocytes, which is considered important event in the pathogenesis of acute Chagasic myocarditis (de Souza et al., 2003; DosReis et al., 2005; Tostes et al., 2005; Zhang et al., 1999). Our present findings show that apoptotic cardiomyocytes were actively phagocytosed by infiltrating macrophages. Remarkably, ingested apoptotic bodies led to the formation of a large number of cytoplasmic lipid bodies (Figure 2B, C). Lipid bodies were identified surrounding morphologically typical, large apoptotic bodies containing cells in different degrees of degeneration. Of note, these lipid bodies showed distinct electron-densities as previously identified in *T. cruzi* elicited lipid bodies using the same model (Melo et al., 2003).

In order to demonstrate a relation between increased numbers of lipid bodies in macrophages stimulated with apoptotic cells and enhanced prostaglandin production we measured the secretion of PGE<sub>2</sub> in the culture supernatant. No differences in PGE<sub>2</sub> levels in the supernatant from control and macrophages co-cultured with living and necrotic cells was noted but significantly increased levels of PGE<sub>2</sub> were observed in the supernatant of cultured macrophages stimulated with apoptotic cells (Figure 2A).

The vitronectin receptor integrin ( $\alpha_v\beta_3$ ; VnR) is involved in phagocytosis of apoptotic cells by macrophages (Savill et al., 1990; Savill et al., 1992) Consequently, we investigated the role of VnR in the signal transduction after uptake of apoptotic cells *in vitro* by infected macrophages and its effect on parasite replication. After 24h, infected macrophages presented exacerbated parasite replication when co-cultured with apoptotic cells, similarly the engagement of VnR by anti- $\alpha_v$  or anti- $\beta_3$  monoclonal antibodies, markedly increased *T. cruzi* growth in macrophages in the absence of apoptotic cells (Figure 3A). Moreover, both antibodies induced lipid body formation and enhanced PGE<sub>2</sub> synthesis in macrophages (Figure 3B). In order to investigate whether enhanced PGE<sub>2</sub> production induced by anti- $\alpha_v$  or anti- $\beta_3$  monoclonal antibodies was accompanied by increased COX-2 expression, macrophages were

stimulated with antibodies against VnR for 24h. Western Blotting analysis showed that anti  $\alpha_v\beta_3$  antibodies induced increase in COX-2 protein expression similar to the positive control with LPS (Figure 3C). To confirm the involvement of this receptor, macrophages were pre-treated with flavridin, a desintegrin that blocks the binding via VnR (Pfaff et al., 1994). Remarkably, flavridin blocked lipid body formation (Figure 3D) and COX-2 expression (Figure 3E) induced by incubation of macrophages with apoptotic cells. These results demonstrate that the signaling to induce lipid body formation, PGE<sub>2</sub> production and COX-2 expression in macrophages during uptake of apoptotic cells requires recognition via VnR receptors.

We next aimed to assess whether COX-2 enzyme was associated with cytoplasmic lipid bodies in infected macrophages stimulated with apoptotic cells using immunostaining techniques. As illustrated in Figure 4A-C, infected macrophages incubated with apoptotic cells or both showed immunolabeling for COX-2 that appeared as a punctate immunostaining found within the macrophage cytoplasm, which is suggestive of COX-2 localization within lipid bodies. This finding is consistent with our previous work showing that COX-2 co-localizes within lipid bodies in macrophages subjected to inflammatory stress (Bozza and Bandeira-Melo, 2005; D'Avila et al., 2006). Importantly, this result also confirms, using a different methodology, that the expression of COX-2 is increased after incubation of macrophages with apoptotic cells. There was no immunoreactivity when control non-immune rabbit serum was used.

Since both *T. cruzi* infection and uptake of apoptotic cells increase lipid body and PGE<sub>2</sub> formation and COX-2 seems to co-localize within lipid bodies under these conditions, we hypothesized that lipid bodies were domains for compartmentalized PGE<sub>2</sub> synthesis. To investigate intracellular sites of newly formed PGE<sub>2</sub> we adapted a newly developed strategy for direct *in situ* immunolocalization of eicosanoids synthesis (Bandeira-Melo et al., 2001; D'Avila et al., 2006). EDAC was used to cross-link eicosanoid carboxyl groups to amines in adjacent proteins and immobilized PGE<sub>2</sub> that could thereafter be immunofluorescently detected. Adipose differentiation-related protein (ADRP) was used as a marker of lipid bodies for co-localization purpose. ADRP is ubiquitously expressed in many cells and tissues as a major component of lipid droplets (Heid et al., 1998). Recently, we demonstrated that ADRP specifically localizes at lipid bodies within inflammatory leukocytes, including macrophages, indicating that ADRP is a useful leukocyte lipid body marker for co-localization studies (Maya-Monteiro et al., submitted). Infected macrophages co-cultured with

apoptotic lymphocytes exhibited a strong localized punctate or ring shape staining for ADRP-labeled lipid bodies (Figure 4E, left panel) and showed intense and punctated immunofluorescent staining for PGE<sub>2</sub> (Figure 4E, center panel). As shown in Figure 4E right panel, PGE<sub>2</sub> intracellular site of production perfectly match ADRP-stained lipid bodies. The specificity of immunofluorescent staining for PGE<sub>2</sub> was supported by the absence of immunostaining when an isotype control antibody replaced the anti-PGE<sub>2</sub> mAb (data not shown). These findings place lipid bodies as the major localization site for newly formed PGE<sub>2</sub> after uptake of apoptotic cells by macrophages infected with *T. cruzi*.

Fadok et al (Fadok et al., 1998a) demonstrated that the interaction with apoptotic neutrophils leads macrophages to secrete TGF- $\beta$ , which in turn suppresses their pro-inflammatory cytokine response. TGF- $\beta$ 1 also renders both phagocytic and nonphagocytic cells permissive to *T. cruzi* infection (Ming et al., 1995; Silva et al., 1991). We evaluated the role of TGF- $\beta$ 1 in lipid body formation in macrophages treated with apoptotic cells and showed that cultured macrophages produced significant levels of TGF-  $\beta$ 1 in response to apoptotic, but not necrotic cells (Figure 5A) and that exogenous TGF-  $\beta$ 1 marked induced lipid body formation at levels similar to apoptotic cells (Figure 5B). Moreover, neutralization of TGF-  $\beta$ 1 with anti-TGF- $\beta$ 1 neutralizing antibody inhibited lipid body formation induced by apoptotic cells (Figure 5C). Although the involvement of other co-receptors cannot be ruled out, the present results indicate that uptake of apoptotic cells by macrophages through interaction with VnR triggers TGF-  $\beta$ 1-dependent increase in lipid body formation and subsequent increase in PGE<sub>2</sub> synthesis.

We also investigated the involvement of nuclear receptors, such as PPAR (peroxisome proliferator-activated receptors) in the mechanism of lipid body formation induced by apoptotic cells. Nuclear receptors are member of a superfamily of transcriptional factors, that after activation, modulate macrophage functions (Henson, 2003; Welch et al., 2003). There is evidence for a role of some PPAR subtypes in the regulation of lipid metabolism and cholesterol efflux in the cells (Henson, 2003; Lee and Evans, 2002). In fact, PPAR  $\gamma$  activation induces CD36 expression an important receptor for apoptotic cells in macrophages (Kavanagh et al., 2003; Tontonoz et al., 1998); induces formation of foamy cells (Nagy et al., 1998); and potentiates anti-inflammatory effects in macrophages (Henson, 2003; Welch et al., 2003). We observed that the pretreatment with PPAR  $\gamma$  antagonist, GW 9962,

inhibited lipid body formation, PGE<sub>2</sub> and TGF-β1 synthesis after stimulation of macrophages with apoptotic cells (Figure 6). These results suggest that activation of PPAR γ in macrophages exposed to apoptotic cells is a necessary step for TGF-β1 production and downstream events leading to increased lipid body production and PGE<sub>2</sub> synthesis.

In conclusion, the uptake of apoptotic cells induces rapid macrophage lipid body formation in a mechanism dependent of VnR receptor, PPAR activation and TGF-β1 synthesis. Macrophage lipid bodies formed during *T. cruzi* infection with apoptotic cell stimulation are specialized, inducible intracellular domains that may function as signaling platforms in inflammatory mediator production in the sense that the compartmentalization of substrate and key enzymes within intracellular lipid bodies have direct impact on the capacity of macrophages to generate increased amounts of PGE<sub>2</sub>. Indeed, lipid bodies are the main intracellular sites for PGE<sub>2</sub> synthesis during intracellular pathogen infection, which may have major impact on the ability of the cell to fight infection. Together, our observations suggest that lipid bodies carry out specific functions in PGE<sub>2</sub> generation in the course of intracellular pathogen infection that go beyond those of simple lipid storage organelles and that it might have implications to the pathogenesis of *T. cruzi* infection.

## References

- Bandeira-Melo, C., M. Phoofolo, and P.F. Weller. 2001. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 276:22779-87.
- Bozza, P.T., and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:113-120.
- Bozza, P.T., J.L. Payne, J.L. Goulet, and P.F. Weller. 1996. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183:1515-25.
- D'Avila, H., R.C. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro Faria Neto, and P.T. Bozza. 2006. Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology.* 176:3087-3097.
- de Freitas Balanco, J.M., M.E. Moreira, A. Bonomo, P.T. Bozza, G. Amarante-Mendes, C. Pirmez, and M.A. Barcinski. 2001. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Curr Biol.* 11:1870-3.
- de Souza, E.M., T.C. Araujo-Jorge, C. Bailly, A. Lansiaux, M.M. Batista, G.M. Oliveira, and M.N. Soeiro. 2003. Host and parasite apoptosis following Trypanosoma cruzi infection in in vitro and in vivo models. *Cell Tissue Res.* 314:223-35.
- DosReis, G.A., C.G. Freire-de-Lima, M.P. Nunes, and M.F. Lopes. 2005. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends Parasitol.* 21:237-43.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, L. Guthrie, and P.M. Henson. 2001a. Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol.* 166:6847-54.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. 1998a. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 101:890-8.
- Fadok, V.A., A. de Cathelineau, D.L. Daleke, P.M. Henson, and D.L. Bratton. 2001b. Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblasts. *J Biol Chem.* 276:1071-7.
- Fadok, V.A., M.L. Warner, D.L. Bratton, and P.M. Henson. 1998b. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v beta 3). *J Immunol.* 161:6250-7.
- Freire-de-Lima, C.G., D.O. Nascimento, M.B. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. de Mello, G.A. DosReis, and M.F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature.* 403:199-203.
- Griffith, T.S., X. Yu, J.M. Herndon, D.R. Green, and T.A. Ferguson. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity.* 5:7-16.
- Heid, H.W., R. Moll, I. Schwetlick, H.R. Rackwitz, and T.W. Keenan. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res.* 294:309-21.

- Henson, P. 2003. Suppression of macrophage inflammatory responses by PPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6295-6.
- Hoffmann, P.R., A.M. deCathelineau, C.A. Ogden, Y. Leverrier, D.L. Bratton, D.L. Daleke, A.J. Ridley, V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 155:649-59.
- Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109:41-50.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol.* 27:137A-138A.
- Kavanagh, I.C., C.E. Symes, P. Renaudin, E. Nova, M.D. Mesa, G. Boukouvalas, D.S. Leake, and P. Yaqoob. 2003. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis.* 168:271-82.
- Lee, C.H., and R.M. Evans. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab.* 13:331-5.
- Liu, L.X., J.E. Buhlmann, and P.F. Weller. 1992. Release of prostaglandin E2 by microfilariae of *Wuchereria bancrofti* and *Brugia malayi*. *Am J Trop Med Hyg.* 46:520-3.
- Lopes, M.F., V.F. da Veiga, A.R. Santos, M.E. Fonseca, and G.A. DosReis. 1995. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol.* 154:744-52.
- Lopes, M.F., and G.A. DosReis. 2000. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis.* 5:221-4.
- McDonald, P.P., V.A. Fadok, D. Bratton, and P.M. Henson. 1999. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol.* 163:6164-72.
- Meade, E.A., W.L. Smith, and D.L. DeWitt. 1993. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem.* 268:6610-4.
- Melo, R.C., H. D'Avila, D.L. Fabrino, P.E. Almeida, and P.T. Bozza. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 35:59-67.
- Ming, M., M.E. Ewen, and M.E. Pereira. 1995. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell.* 82:287-96.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, and R.M. Evans. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 93:229-40.
- Pacheco, P., F.A. Bozza, R.N. Gomes, M. Bozza, P.F. Weller, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169:6498-506.
- Pfaff, M., M.A. McLane, L. Bevilgia, S. Niewiarowski, and R. Timpl. 1994. Comparison of disintegrins with limited variation in the RGD loop in their binding to purified integrins alpha IIb beta 3, alpha V beta 3 and alpha 5 beta 1 and in cell adhesion inhibition. *Cell Adhes Commun.* 2:491-501.

- Platt, N., H. Suzuki, Y. Kurihara, T. Kodama, and S. Gordon. 1996. Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:12456-60.
- Ruscetti, F., L. Varesio, A. Ochoa, and J. Ortaldo. 1993. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 685:488-500.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343:170-3.
- Savill, J., N. Hogg, Y. Ren, and C. Haslett. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest.* 90:1513-22.
- Silva, J.S., D.R. Twardzik, and S.G. Reed. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med.* 174:539-45.
- Tontonoz, P., L. Nagy, J.G. Alvarez, V.A. Thomazy, and R.M. Evans. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 93:241-52.
- Tostes, S., Jr., D. Bertulucci Rocha-Rodrigues, G. de Araujo Pereira, and V. Rodrigues, Jr. 2005. Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 99:233-7.
- van Ryn, J., and M. Pairet. 1997. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: pharmacology, clinical effects and therapeutic potential. *Expert Opin Investig Drugs.* 6:609-14.
- Welch, J.S., M. Ricote, T.E. Akiyama, F.J. Gonzalez, and C.K. Glass. 2003. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6712-7.
- Zhang, J., Z.A. Andrade, Z.X. Yu, S.G. Andrade, K. Takeda, M. Sadirgursky, and V.J. Ferrans. 1999. Apoptosis in a canine model of acute Chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol.* 31:581-96.



## 1 –Introdução

Nas últimas décadas, avanços importantes foram feitos no sentido de se elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nas vias de produção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune. Destacam-se estudos sobre a caracterização da estrutura e regulação da expressão das diferentes enzimas relacionadas com a geração de mediadores lipídicos, como as enzimas formadoras de eicosanóides, fosfolipases e quinases e fosfatases reguladoras e o “pool” de precursores lipídicos (Bozza et al., 1997b; Yu et al., 1998). Entretanto, os mecanismos de regulação tempo-espacial da sinalização celular ainda não se encontram bem estabelecidos.

Evidências recentes têm indicado um papel importante para os *microdomínios lipídicos* nos mecanismos de ativação celular na resposta imune inata e adaptativa. Estes domínios lipídicos funcionam como estruturas dinâmicas capazes de compartimentalizar diferentes proteínas envolvidas na sinalização celular. Os domínios lipídicos ricos em colesterol e esfingolipídios associados a membrana, que incluem os “rafts” e cavéolas, são os mais bem estudados. Os “rafts” apresentam função no reconhecimento de patógenos e na sinalização envolvendo proteínas ancoradas por GPI (glicosilfosfatidilinositol); as cavéolas estão envolvidas no tráfego celular de colesterol, endocitose, e sinalização de RAS e NO sintase entre outros efeitos importantes (para revisão ver (Helms and Zurzolo, 2004; van Deurs et al., 2003). Diferentes patógenos, incluindo bactérias, vírus e protozoários utilizam domínios lipídicos como mecanismo de invasão celular, transporte intracelular e seqüestro de vias de sinalização, favorecendo mecanismos de escape e de sobrevivência destes patógenos (Manes et al., 2003).

O papel de domínios lipídicos citoplasmáticos, não delimitados por membrana, os corpúsculos lipídicos, tem sido investigado com relação à compartimentalização de sinais envolvidos na geração de mediadores inflamatórios, metabolismo lipídico celular e resposta do hospedeiro frente à infecções. Estes estudos têm como foco a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação e função dos corpúsculos lipídicos em leucócitos e em outras células envolvidas na resposta inflamatória. Neste sentido, demonstrou-se que a formação dos corpúsculos lipídicos e a compartimentalização de enzimas nessas organelas é um evento celular altamente regulado e que os corpúsculos lipídicos realmente desempenham papel relevante na geração de eicosanóides em leucócitos, em

condições inflamatórias *in vivo* (Melo et al., 2003; Pacheco et al., 2002; Silva et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005).

A nossa hipótese central é que os corpúsculos lipídicos são domínios intracelulares especializados e indutíveis, envolvidos no metabolismo lipídico e tráfego intracelular de macromoléculas, uma vez que os corpúsculos lipídicos parecem funcionar como plataformas de sinalização celular envolvidas na produção de mediadores inflamatórios e podem ter um impacto direto na capacidade de leucócitos ativados em responder a infecção por patógenos intracelulares. Entretanto, o entendimento dos mecanismos envolvidos na sua biogênese, dinâmica e função em diferentes sistemas celulares ainda são muito limitados. Com este trabalho, pretendemos investigar os mecanismos envolvidos na biogênese e composição de corpúsculos lipídicos induzidos por patógenos intracelulares, a fim de entender a função dos corpúsculos lipídicos na resposta imune inata do hospedeiro e nos mecanismos de escape de patógenos intracelulares como o *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*.

## **1.1 - Corpúsculos lipídicos**

### **1.1.1 - Aspectos gerais**

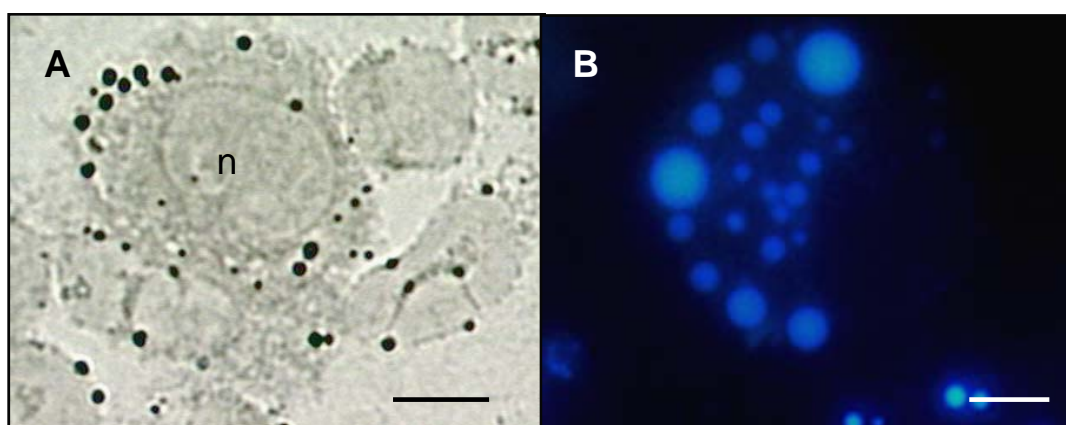
Os corpúsculos lipídicos são domínios lipídicos citoplasmáticos, não delimitados por membrana, mas que freqüentemente apresentam uma zona periférica e osmiofílica. Ultraestruturalmente, os corpúsculos lipídicos apresentam-se como organelas heterogêneas, elétrôn-lúcidas ou totalmente e elétrôn-densas, dependente do tipo celular (Dvorak et al., 1992; Dvorak et al., 1993; Fawcett, 1981; Galli et al., 1985; Weller, 1991). Estas estruturas podem ser encontradas nas células de diversos organismos desde fungos a mamíferos, incluindo plantas e parasitas (Dvorak et al., 1992; Fawcett, 1981; Galli et al., 1985; Murphy, 2001).

Em número pequeno (1 a 5), são constituintes citoplasmáticos normais de numerosos tipos celulares, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, linfócitos, mastócitos e células endoteliais, plaquetas, etc. Morfologicamente, os corpúsculos lipídicos são esféricos e com dimensões muito variadas em células não ativadas. Mas em células associadas com inflamação e neoplasias podem aumentar em número e tamanho (Dvorak et al., 1992; Dvorak et al., 1993; Reginato et al., 1985; Robinson et al., 1982; Weller et al., 1999). Nestas situações, os corpúsculos lipídicos podem

coalescer formando grandes estruturas de cerca de 7  $\mu\text{m}$  (D'Avila et al., 2006; Pacheco et al., 2002)

Os corpúsculos lipídicos recebem diversas denominações na literatura, dependendo do tipo celular, como por exemplo: gotas lipídicas (“lipid droplets”) em adipócitos, glóbulos lipídicos (“lipid globules”) em células mamárias, corpúsculos lipídicos ou partículas lipídicas (“lipid bodies ou particles”) em várias células animais e fungos, e corpos oleosos (“oil bodies”) em sementes de plantas superiores (Martin and Parton, 2005; Murphy, 2001).

No passado, os corpúsculos foram erroneamente confundidos com vacúolos ou fagossomos, pois eram vistos como imagens negativas após colorações que não preservavam lipídios. Atualmente, com o uso de fixação apropriada e coloração ou contraste específicos para lipídios celulares, como sudan black ou tetróxido de ósmio, os corpúsculos lipídicos são claramente visualizados tanto na microscopia de luz como na eletrônica (Figura 1). Os corpúsculos lipídicos também podem ser reconhecidos através da utilização de marcadores fluorescentes, incluindo Nile red (Greenspan et al., 1985), lipídios contendo sondas fluorescentes como ácido pirenododecanóico (P96), (Kasurinen and Somerharju, 1992; Yu et al., 1998) (Figura 1) e 2-(4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4-diaza-s-indacene-3-pentanoil)-1-hexadecanoil-sn-glicerol-3-fosfato, diammonium salt ( $\beta$ -Bodipy®FL C<sub>5</sub>-HPA) (Bozza et al., 1997b).



**Figura 1** – Corpúsculos lipídicos no citoplasma de macrófagos peritoneais murinos observados ao microscópio de campo claro (A) ou de fluorescência (B) após coloração com tetróxido de ósmio ou marcação com P96, respectivamente. Macrófagos foram estimulados com LPS (A) ou tioglicolato (B). Figura 1A foi reproduzida a partir de Pacheco e col. (2002). n, núcleo. Barras= 10  $\mu\text{m}$

### 1.1.2 - Formação de corpúsculos lipídicos

Embora sejam comumente encontrados em células associadas com reações inflamatórias, o mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos não se encontra totalmente esclarecido. Tem-se demonstrado que a formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos é um evento altamente regulado e que se desenvolve rapidamente (15- 60 minutos) após estimulação por ácidos graxos *cis* insaturados, fator ativador de plaquetas (PAF) ou indutores de PKC (proteína quinase C) *in vitro* (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1996b; Weller et al., 1989; Weller et al., 1991). Além disso, é um fenômeno restrito a determinados agonistas e envolvendo diferentes cascatas de ativação (Bozza et al., 1997b).

A formação de corpúsculos lipídicos em leucócitos e outras células *in vitro* desenvolve-se rapidamente em resposta a agentes indutores específicos como PAF, ácidos graxos *cis* polinsaturados como ácido araquinônico (AA) e ácido oléico (AO) e diglicerídios (como, 1 -oleil-2-acetilglicerol - OAG) (Bozza et al., 1997b). Já os ácidos graxos *trans* insaturados exibem pouca atividade na indução da formação dos corpúsculos lipídicos (Weller et al., 1991). A formação de corpúsculos lipídicos pode também ser independente de lipídios exógenos, e dependente de citocinas como GM-CSF, eotaxina e RANTES; ou ainda pode ser induzido pelo LPS da parede celular de bactérias gram-negativas (Bandeira-Melo et al., 2001a; Bozza et al., 1996a; Pacheco et al., 2002).

*In vitro*, a formação de corpúsculos lipídicos não está relacionada a eventos tóxicos, mas sim a ativação celular. Neutrófilos expostos ao AA ou ao AO iniciam a formação de corpúsculos lipídicos em 30 minutos (Bozza et al., 1996a; Weller et al., 1991). O mecanismo de indução de corpúsculos lipídicos por ácidos graxos *cis* polinsaturados e pelo OAG envolve ativação de proteína quinase C (Bozza et al., 1997b; Weller et al., 1991). O papel desta enzima não é simplesmente o de contribuir para a liberação intracelular de ácidos graxos, mas também o de formar corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 1997b).

Assim como os ácidos graxos insaturados, o PAF é um importante indutor de corpúsculos lipídicos. A indução pelo PAF é um fenômeno dependente de receptor. Estudos com antagonista de receptor de PAF, o WEB 2086, demonstraram inibição da formação de corpúsculos lipídicos induzida por PAF. Além disso, o liso-PAF, precursor do PAF, que se difere pela ausência de um grupo acetato na posição sn-2,

e que não se liga ao receptor de PAF, foi incapaz de induzir corpúsculos lipídicos em neutrófilos ou eosinófilos (Bartemes et al., 1999; Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997b; de Assis et al., 2003; Silva et al., 2002). A dependência de ligação com o receptor também foi observada quando eosinófilos foram estimulados por PGD<sub>2</sub> (Mesquita-Santos et al., 2006). Porém, LTB<sub>4</sub> (Bozza et al., 1996a) e Cis-LTs, que semelhante ao PAF sinalizam através de receptores acoplados à proteína G, falharam em induzir a formação de corpúsculos lipídicos.

Estudos sobre as vias de formação de corpúsculos lipídicos induzidas pelo PAF demonstraram que inibidores de ciclooxigenase não foram capazes de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzida por PAF (Bozza et al., 1996a). Por outro lado, inibidores de 5 - lipoxigenase, como zileuton e MK886, e um inibidor de proteína ativadora de 5-lipoxigenase (FLAP), inibiram a formação de corpúsculos lipídicos; sugerindo que 5-LO e FLAP estariam envolvidas na indução de corpúsculos lipídicos por PAF (Bozza et al., 1996a). A formação de corpúsculos lipídicos induzida por lipídios semelhantes ao PAF, como os fosfolipídios bioativos obtidos da LDL oxidada (Marathe et al., 1999; Tsoukatos et al., 2002) também envolve ativação da 5-LO e da proteína quimiotática para monócito do tipo 1 (MCP-1) (Silva et al., 2002) e da ativação de receptores nucleares como PPAR<sub>γ</sub> (de Assis et al., 2003). Esses dados indicam que a formação de corpúsculos lipídicos depende da síntese de novas proteínas (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1996b; Bozza et al., 1997b), uma vez que inibidores de transcrição (actinomicina D) e tradução (cicloheximida) inibiram a formação de corpúsculos lipídicos induzida por PAF.

A participação de ciclooxigenases na formação de corpúsculos lipídicos foi investigada também com o uso de drogas antiinflamatórias não esteroidais (DAINEs). A aspirina que atua principalmente por inibição de ciclooxigenase foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzida por AA e AO. No entanto, o salicilato de sódio, que não inibe COX, foi tão potente quanto à aspirina na inibição de corpúsculos lipídicos. Estes estudos sugerem que a formação de corpúsculos lipídicos é independente de COX (Bozza et al., 1996b; Weller et al., 1999). Além disso, o papel das isoformas de COX na formação de corpúsculos lipídicos foi avaliado utilizando camundongos deficientes de COX-1 ou COX-2. Este estudo demonstrou que a indução de corpúsculos lipídicos por AA e AO em animais deficientes de COX-1 ou COX-2 não foi diferente daquela observada em animais normais, demonstrando que a formação de corpúsculos lipídicos é independente da atividade de COX-1 e de COX-2 (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997b).

Além destes estímulos, diversas proteínas podem induzir a formação de corpúsculos lipídicos *in vitro*, como quimiocinas da família CC, eotaxina e RANTES, via receptor CCR3 (Bandeira-Melo et al., 2001b), IL-5 (Bozza et al., 1998), IL-16 (Bandeira-Melo et al., 2002b) em eosinófilos, mas não em macrófagos; fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) (Vieira-de-Abreu et al., 2005), Pacheco e col. Em preparação) em eosinófilos e macrófagos, além de leptina em macrófagos, mas não em eosinófilos e neutrófilos (Maya-Monteiro, submetido). No entanto, IL-8, fragmento 5a do sistema complemento (C5a), formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) que sinalizam através de receptores acoplados à proteína G falharam em induzir a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 1996a).

Todas essas investigações demonstram que a formação de corpúsculos lipídicos representa uma resposta coordenada, célula- e estímulo-específica, realizada por vias específicas e mediada por ativação de proteína quinase C e fosfolipase C, as quais participam da mobilização e depósito de lipídios e proteínas.

### **1.1.3 – Composição dos corpúsculos lipídicos:**

Embora não apresentem uma membrana típica, caracterizada por bicamada lipídica clássica (Fawcett, 1981; Galli et al., 1985), estudos recentes têm demonstrado que os corpúsculos lipídicos são delimitados por uma hemi-membrana elétron densa, formada por uma monocamada hidrofílica composta por fosfolipídios (glicolipídios e/ou esterois), envolvendo uma região central (“core”) hidrofóbica, constituída principalmente de lipídios neutros, tais como triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG) e colesterol éster (Johnson et al., 1999; Murphy, 2001; Tauchi-Sato et al., 2002). Os corpúsculos lipídicos apresentam “pools” de fosfolipídios, como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e fosfatidilserina (Triggiani et al., 1994).

Corpúsculos lipídicos podem ser caracterizados como depósitos de produtos derivados de lipídios exógenos. Dvorak e colaboradores (Dvorak et al., 1983) demonstraram, por autorradiografia ultraestrutural, que macrófagos peritoneais de cobaias incorporavam ácido palmítico [ $H^3$ ], metilcolina [ $H^3$ ] ou minositol [ $H^3$ ] nos corpúsculos lipídicos. Posteriormente, foi demonstrada a incorporação de derivados de ácido arquidônico exógeno em corpúsculos lipídicos de vários tipos celulares (Dvorak et al., 1983; Yu et al., 1998).

Outros estudos têm demonstrado incorporação de ácido araquidônico (AA) marcado com  $[H^3]$  e ácido oléico em grande variedade de células, incluindo mastócitos de pulmões humanos, macrófagos alveolares, neutrófilos, células epiteliais ciliadas e eosinófilos (Dvorak et al., 1992; Weller et al., 1999). Estes estudos indicaram que os corpúsculos lipídicos constituem um importante sítio intracelular de ácido araquidônico.

A localização de grandes quantidades de ácido araquidônico em corpúsculos lipídicos sugere que estas estruturas podem ser compartimentos citoplasmáticos ricos de substrato para a síntese de eicosanóides. Além disso, precursores lipídicos e enzimas como peroxidases, esterases e fosfatases alcalinas também foram observados em corpúsculos lipídicos de muitas células de mamíferos (Dvorak et al., 1992).

Os corpúsculos lipídicos também podem apresentar uma série de proteínas específicas associadas a eles. As principais proteínas identificadas nas células de mamíferos pertencem aos membros da família de proteínas designadas PAT e as caveolinas. As PAT são as **Perilipinas**, as proteínas relacionadas com a diferenciação de adipócitos (**ADRP**) ou **Adipofilinas**, e as **TIP47** (Londos et al., 1999; Miura et al., 2002) e **S3-12** (Scherer et al., 1998). As perilipinas são encontradas somente em adipócitos (Blanchette-Mackie et al., 1995; Greenberg et al., 1991) e células esteroidogênicas (Servetnick et al., 1995), enquanto que a ADRP (Heid et al., 1998) é amplamente encontrada em vários tipos celulares (Brasaemle et al., 1997; Greenberg et al., 1993; Servetnick et al., 1995), Maya-Monteiro, submetido).

Trabalhos recentes de nosso grupo, vêm demonstrando que a ADRP está presente em corpúsculos lipídicos de leucócitos, incluindo macrófagos estimulados com LPS, tioglicolato e BCG (Maya-Monteiro, em preparação; (D'Avila et al., 2006)). Acredita-se que a ADRP possa estar associada aos estágios iniciais da formação dos corpúsculos lipídicos, agindo como um transportador de ácidos graxos da membrana plasmática ou do citosol para a periferia destas inclusões (Gao and Serrero, 1999; Imamura et al., 2002) e, que a perilipina estaria envolvida em processos mais tardios da maturação destas estruturas, participando da modulação do metabolismo do TAG (Brasaemle et al., 2000; Martinez-Botas et al., 2000). Ambas são proteínas estruturais associadas aos lipídios neutros dos corpúsculos lipídicos (Murphy and Vance, 1999). Atualmente, a ADRP, principal componente protéico presente nos corpúsculos lipídicos (Heid et al., 1998) vem sendo utilizada em nosso laboratório como um marcador intracelular destas estruturas.

Outra família de proteínas que se encontra associada aos corpúsculos lipídicos são as caveolinas (Fujimoto et al., 2001; Ostermeyer et al., 2001; Pol et al., 2001), responsáveis pela biogênese de cavéolas, transporte de colesterol, endocitose e transdução de sinal (van Deurs et al., 2003; van Meer, 2001). Caveolinas-1 e -2, representantes desta família, são amplamente distribuídas entre as células de mamíferos, embora caveolina-3 seja encontrada especificamente em células musculares (Ostermeyer et al., 2004).

Além de serem sítios de ácido araquidônico esterificado, as principais enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides, como 5-lipoxigenase, leucotrieno sintase (LTC<sub>4</sub>) e ciclooxigenase estão co-localizadas em corpúsculos lipídicos de leucócitos (Bozza et al., 1998; Bozza et al., 1997a; de Assis et al., 2003; Pacheco et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005). Além destas, foram isoladas de corpúsculos lipídicos enzimas envolvidas na liberação de ácido araquidônico como fosfolipase A<sub>2</sub>, MAP quinases (*mitogen-activating protein kinases*), citosólica, ERK1, ERK2, p85, p38 e PI3K (Chen et al., 2002; Weller et al., 1999; Yu et al., 1998; Yu et al., 2000).

Notavelmente, os corpúsculos lipídicos podem estar associados com outras funções além da síntese de eicosanóides, pois também são sítios de armazenamento de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na patogênese da sepse, como TNF- $\alpha$  e MIF (Pacheco et al., 2002), Pacheco e col., em preparação) e na alergia, como RANTES (Bandeira-Melo et al., 2001b; Vieira-de-Abreu et al., 2005). A co-localização de enzimas envolvidas na síntese de eicosanóides e de citocinas em corpúsculos lipídicos indica que estas estruturas podem funcionar como sítios intracelulares de síntese parácrina de eicosanóides e de armazenamento de citocinas durante condições inflamatórias.

Além destas, diversas outras proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos humanos foram identificadas, incluindo proteínas transportadoras, proteínas reguladoras, componentes do citoesqueleto, como vimentina (Fujimoto et al., 2004; Umlauf et al., 2004) e proteínas capsulares (Fong and Wang, 1997; Fong et al., 1996; Wang and Fong, 1995; Wang et al., 1997). Destacam-se também enzimas metabolizadoras de lipídios, ACS3, ACS4 e 17 $\beta$ HSD11, além da lanostrol sintetase, NSDHL (Fujimoto et al., 2004), hidrolase TG (Lehner et al., 1999), fosfatidiletanolamina N-metil-transferase (Cui et al., 1993) que são encontradas em corpúsculos lipídicos de diversas linhagens celulares; a ACS3, produz acetil coenzima A (acilCoA), que pode ser utilizada na síntese de TG e colesterol éster (Fujimoto et al., 2004).



Múltiplas proteínas da família das Rab GTPases, como Rab 1, 6, 7 e 10 são encontradas em corpúsculos lipídicos sugerindo um envolvimento destas estruturas na regulação do tráfego de membranas e sinalização celular. Em conjunto, estes dados sugerem que os corpúsculos lipídicos não são apenas estruturas de estoque de lipídios, mas também participam ativamente na rede de sinalização celular e na homeostasia de lipídios.

#### **1.2.4 - Envolvimento de corpúsculos lipídicos com a síntese de eicosanóides:**

Os eicosanóides são mediadores lipídicos biologicamente ativos, derivados da metabolização de ácidos graxos, principalmente do ácido araquidônico. Os eicosanóides funcionam como mediadores parácrinos da resposta inflamatória, e também como mediadores intracelulares, desempenhando um papel central na patogênese de várias doenças inflamatórias e neoplasias (Samuelsson et al., 1987; Serhan, 1994). Prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanas e lipoxinas são exemplos de eicosanóides que apresentam síntese aumentada em doenças como asma, psoríase, choque endotóxico e artrite reumatóide (Christie and Henderson, 2002; Samuelsson et al., 1987; Serhan, 1994).

A síntese de eicosanóides é catalisada basicamente por dois grupos de enzimas. A enzima lipoxigenase leva à formação de leucotrienos, ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs) e lipoxinas; e a enzima prostaglandina endoperóxido H sintetase, também conhecida como ciclooxigenase (COX), metaboliza o ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos (Samuelsson et al., 1987; Smith et al., 2000).

Estudos recentes apontaram para um papel central dos corpúsculos lipídicos na formação de eicosanóides. Como citado anteriormente, os corpúsculos lipídicos são sítios intracelulares de enzimas formadoras de eicosanóides (D'Avila et al., 2006; Dvorak et al., 1994; Pacheco et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005) e de ácido araquidônico (Weller et al., 1989; Weller, 1991; Yu et al., 1998). Por esse motivo, nosso grupo tem investigado a correlação da formação de corpúsculos lipídicos com aumento da produção de leucotrienos e prostaglandinas. Baseados na importância dos eicosanóides como agentes moduladores da inflamação causada por patógenos intracelulares como micobactérias e *T. cruzi*, o entendimento dos

sítios celulares e dos mecanismos envolvidos na sua produção tornam-se necessários.

Inicialmente, a síntese de eicosanóides foi relacionada com substrato de natureza fosfolipídica, presente em membranas celulares, o qual é extraído a partir de fosfolipases citosólicas. Estudos posteriores, utilizando autorradiografia e microscopia eletrônica, demonstraram a localização de enzimas formadoras de eicosanóides e seus substratos também em inclusões celulares denominadas de corpúsculos lipídicos (para revisão (Bandeira-Melo et al., 2002a; Bozza and Bandeira-Melo, 2005).

Alguns trabalhos demonstraram que indutores da formação de corpúsculos lipídicos, como o PAF e ácidos graxos insaturados *cis*, também induziram aumento na produção de eicosanóides (Bandeira-Melo et al., 2001b; Bozza et al., 1996a; Weller et al., 1999). Além disso, agentes inibidores da formação de corpúsculos lipídicos (actinomicina D e cicloheximida) também foram capazes de inibir a produção de eicosanóides (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997a; Bozza et al., 1997b). Por outro lado, Bozza e colaboradores (Bozza et al., 1997b) demonstraram que após re-stimulação com ionóforo de cálcio foi observado aumento nos níveis de PGE<sub>2</sub> e LTC<sub>4</sub> e que este aumento está relacionado com o aumento na formação de corpúsculos lipídicos. É interessante notar que os agentes que estimulam o *priming* para a produção de eicosanóides (Bauldry et al., 1991; Stewart et al., 1990) estimulam também a formação de corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 1996a). Bandeira-Melo e colaboradores (Bandeira-Melo et al., 2000) também mostraram a formação de LTC<sub>4</sub> em corpúsculos lipídicos de eosinófilos.

Com a finalidade de se investigar o papel de corpúsculos lipídicos na formação de eicosanóides independente de enzimas de origem nuclear, citoplastos de eosinófilos, sem núcleo, foram estudados. Similarmente ao que ocorreu com eosinófilos intactos, o PAF induziu formação de corpúsculos lipídicos acompanhado por aumento na produção de eicosanóides (Bozza et al., 1997b). Estes resultados sugerem que corpúsculos lipídicos são sítios citoplasmáticos, onde a formação de eicosanóides acontece independente do núcleo celular.

#### **1.1.5 – Corpúsculos lipídicos e a resposta imune inata:**

Diversos trabalhos apresentam evidências que os corpúsculos lipídicos funcionam como sítios intracelulares específicos e dinâmicos, envolvidos na produção de eicosanóides *in vivo* por leucócitos durante processos inflamatórios.

Na reação inflamatória local induzida por endotoxina ou lipopolissacarídeo (LPS), principal componente da parede celular de bactérias Gram-negativas (Schletter et al., 1995; Ulevitch and Tobias, 1995), observa-se aumento da geração de mediadores inflamatórios secretados por leucócitos, incluindo citocinas, mediadores lipídicos e espécies reativas do oxigênio, desencadeando uma grande diversidade de respostas (Morrison and Raziuddin, 1982; Morrison and Ryan, 1987; Rietschel and Brade, 1992), incluindo a migração celular (Issekutz and Szpejda, 1986; Rylander et al., 1988). Quando a infecção por bactérias Gram-negativas é severa e grandes quantidades de LPS são liberadas na corrente sanguínea ocorrem diversas alterações e sepse, choque séptico e falência múltipla dos órgãos podem ser desencadeados (Bone, 1993).

Trabalhos prévios demonstram que o LPS aumenta a disponibilidade do AA e induz a expressão de enzimas formadoras de eicosanóides, possibilitando o aumento da síntese de mediadores lipídicos durante processos inflamatórios (Lin, 1997; O'Sullivan et al., 1992; Surette and Chilton, 1998; Surette et al., 1993). Neste processo, Pacheco e colaboradores (Pacheco et al., 2002) demonstraram a compartimentalização de enzimas envolvidas no metabolismo do AA em corpúsculos lipídicos induzidos por LPS, cuja formação foi dependente da dose e do tempo de estimulação. Os autores demonstraram ainda que a formação de corpúsculos lipídicos induzida por LPS envolveu reconhecimento mediado por receptores TLR4 e CD14, bem como da integrina  $\beta_2$  integrina, CD11b/CD18, indicando que a formação de corpúsculos lipídicos induzida por LPS depende de receptores específicos para LPS.

Vários dos efeitos do LPS ocorrem indiretamente através da geração endógena de PAF (Chang et al., 1987; Rouzer, 1987). Pacientes que sofreram choque séptico e síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) apresentavam níveis plasmáticos elevados de PAF ou substâncias semelhantes ao PAF (Imaizumi et al., 1995). Interessantemente, demonstrou-se que o PAF participa da migração de neutrófilos induzida por LPS no modelo murino de pleurisia (Bozza et al., 1994) e PAF e outros lipídios semelhantes a ele induzem formação de corpúsculos lipídicos via receptor de PAF, em leucócitos humanos e murinos (Bartemes et al., 1999; Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997b; Silva et al., 2002), sugerindo que o PAF

endógeno tem um papel importante neste fenômeno. Confirmando estes resultados, estudos complementares utilizando pré-tratamento com PAF-AH (Pacheco e col., em preparação), enzima que hidrolisa o PAF foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos induzida por LPS, sugerindo que o PAF endógeno está agindo de maneira parácrina/autócrina na indução da formação de corpúsculos lipídicos, uma vez que antagonistas do receptor de PAF, bem como a PAF-AHr utilizados neste estudo são capazes de inibir o efeito do LPS sobre a formação de corpúsculos lipídicos (Pacheco e col., em preparação).

A quimiocina MCP-1/CCL2, essencial para o recrutamento de monócitos em processos inflamatórios (Lu et al., 1998), está diretamente relacionada no mecanismo de indução de corpúsculos lipídicos, expressão de 5-LO e síntese do LTB<sub>4</sub> por PAF, amplificando a resposta inflamatória através do recrutamento de neutrófilos (Silva et al., 2002). Na sepse experimental, utilizando modelo de laparotomia seguida de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou endotoxemia em camundongos, Pacheco e colaboradores (em preparação) demonstraram que células de animais deficientes de MCP-1 (MCP-1<sup>-/-</sup>) foram incapazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, bem como de induzir a síntese de eicosanóides, fato que foi restaurado pela administração exógena da rMCP-1. Esses dados sugerem que a molécula MCP-1/CCL2 exerce um papel fundamental na sinalização envolvida na formação de corpúsculos lipídicos e geração de mediadores inflamatórios.

A influência da dieta foi analisada sobre os leucócitos de camundongos alimentados por 6 semanas com ração contendo composição de ácidos graxos diferentes (óleo de gergelim, soja, oliva e canola) e subseqüentemente, submetidos a endotoxemia. Eles observaram que a dieta contendo óleo de oliva exerceu um importante papel modulador na resposta inflamatória comparado com as demais dietas. A formação de corpúsculos lipídicos e a síntese de eicosanóides foram reduzidas nestes animais, bem como a produção de MCP-1. O efeito benéfico da dieta com óleo de oliva parece então estar associado com a importante modulação existente entre LTB<sub>4</sub> e MCP-1 (Leite et al., 2005).

De forma interessante, citocinas pró-inflamatórias, como o MIF, foram também localizados em corpúsculos lipídicos de leucócitos formados após a estimulação com LPS e de pacientes sépticos (Pacheco et al., 2002), Pacheco e col., em preparação). A citocina MIF tem um importante papel no controle da resposta inflamatória. A localização de enzimas formadoras de eicosanóides, TNF- $\alpha$  e MIF nos corpúsculos

lipídicos pode ser importante na sinalização intracelular envolvida com a sepse. Trabalhos não publicados demonstram a presença de ambas as citocinas nos corpúsculos lipídicos, envolvendo outras patologias, incluindo artrite reumatóide e dengue (Roimicher e col. em preparação; Pacheco e col. em preparação). A translocação e a função destas citocinas nos corpúsculos lipídicos ainda não estão esclarecidas, porém postula-se um envolvimento com a sinalização intracelular, precisando de investigações adicionais para o seu esclarecimento.

De forma geral, estes estudos indicam que os corpúsculos lipídicos de leucócitos são sítios de localização de enzimas formadoras de eicosanóides e de citocinas pró-inflamatórias e pode desenvolver e funcionar como estruturas distintas, sítios intracelulares para a produção parácrina de síntese de eicosanóides na resposta imune inata.

## 1.2 – Resposta do hospedeiro a infecções por patógenos intracelulares

A ocorrência e o significado funcional dos corpúsculos lipídicos em células presentes na reação inflamatória induzida por microorganismos intracelulares, como micobactérias e *Trypanosoma cruzi*, não são relatados na literatura. Tanto a tuberculose quanto a doença de Chagas são causadas por patógenos que invadem e/ou são endocitados por fagócitos. Estes microorganismos são capazes de desenvolver um mecanismo de escape, que permite sua adaptação e multiplicação dentro das células inflamatórias (Araujo-Jorge et al., 1992; Griffith et al., 1996; Tafuri, 1987). Além disso, os mecanismos envolvidos nas interações entre micobactérias ou *Trypanosoma cruzi* e suas respectivas células-alvo do hospedeiro não se encontram esclarecidos. O conhecimento dessas interações celulares mostra-se de fundamental importância para o desenvolvimento de terapias para o controle tanto da tuberculose como da doença de Chagas.

Os macrófagos protegem seus hospedeiros através da fagocitose de microorganismos que ficam contidos em fagossomos, que rapidamente se desenvolvem em organelas digestivas. Numerosos patógenos intracelulares conseguem burlar as defesas dos hospedeiros por diferentes estratégias. Dentre os mecanismos, alguns patógenos estabelecem vacúolos que excluem as proteínas do hospedeiro que conduzem à acidificação e fusão com a rede endossomal (Mordue et al., 1999; Sibley et al., 1985). Outros patógenos parecem manipular componentes do citoesqueleto da célula hospedeira para gerar um nicho especializado. *Leishmania*

*donovani*, por exemplo, progressivamente reveste a região perifagossomal de actina que bloqueia o tráfego de vesículas entre o fagossoma e os compartimentos endossomais (Holm et al., 2001). Outros patógenos, como *Salmonella typhimurium* e micobacterias retém GTPases da família Rab, como a Rab 5 e excluem Rab 7 e Rab 9 que são moléculas padrão para continuar a interação do fagossoma com compartimentos endossomais e constituintes lisossomais (Fratti et al., 2001; Hashim et al., 2000; Vergne et al., 2004a; Vergne et al., 2004b). Outros ainda alteram as propriedades biofísicas da membrana do fagossomo tornando-o menos fusogênico (Amer and Swanson, 2002). Em geral, muitas estratégias são utilizadas pelos diferentes grupos de patógenos intracelulares e dentre estes destacamos as micobactérias e o *Trypanosoma cruzi* que foram alvo de estudo no presente trabalho.

### 1.2.1 - Tuberculose

A tuberculose é uma infecção causada por *M. tuberculosis*, *M. bovis* ou *M. africanum*. Por suas íntimas relações filogenéticas e patogênicas, estes organismos são agrupados como Complexo *M. tuberculosis*, e se intercambiam como agentes etiológicos da tuberculose humana e animal (Frieden et al., 2003; Griffin et al., 1995). A literatura sobre tuberculose, tanto humana quanto experimental, demonstra que esta é uma doença de patogenia complexa, onde aspectos de interações celulares e moleculares entre micobactérias e células hospedeiras não se encontram totalmente esclarecidos.

Esta doença leva à morte aproximadamente 3 milhões de pessoas por ano em todo o mundo (Fenton and Vermeulen, 1996). No final do século XIX, a maioria dos óbitos entre adultos, inclusive no Brasil entre os anos de 1860 a 1885, foi causada pela tuberculose. No Brasil, fatores como as péssimas condições de habitação e trabalho e o estado de miséria da população favoreceram a disseminação da doença e mantiveram as elevadas taxas de mortalidade. A partir da década de 50, o número de casos de tuberculose diminuiu drasticamente, devido à implantação de medidas de controle da doença como, pasteurização do leite, programa de erradicação da tuberculose bovina, programas efetivos de controle da tuberculose humana, além do desenvolvimento de drogas anti-micobacterianas para o combate da infecção (Griffin et al., 1995).

Nos últimos anos, entretanto, observou-se uma tendência mundial de aumento dos casos da tuberculose. Este aumento vem sendo atribuído a formas de doença resistentes a quimioterapia, ao impacto da epidemia da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), e à combinação de fatores demográficos e sócio-econômicos. Um relatório da Organização Mundial da Saúde estimou que nos próximos anos cerca de 4 milhões de pessoas morrerão de tuberculose anualmente.

A relação AIDS/Tuberculose vem alterando a história natural de ambas as infecções. A infecção por HIV pode afetar a taxa de progressão da doença clínica em indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis* (*M. tb*), uma vez que pacientes com imunossupressão avançada apresentam elevada susceptibilidade ao bacilo tuberculoso, provocando também um aumento na taxa de transmissão da tuberculose. Alguns estudos demonstraram que a infecção por HIV aumenta substancialmente o risco de desenvolvimento da tuberculose primária e da reativação do bacilo latente (Selwyn et al., 1989; Whalen et al., 1995). Acredita-se, também, que esta reativação do foco endógeno latente seja o mecanismo predominante do adoecimento dos pacientes com HIV. Além disso, indivíduos co-infectados apresentam uma evolução para a tuberculose doença muito mais rápida do que indivíduos soronegativos para o HIV (Whalen et al., 1995). Por outro lado, a tuberculose pode acelerar o desenvolvimento da imunossupressão em pacientes HIV positivos, o que pode resultar em aumento da replicação viral em indivíduos co-infectados por HIV/*M. tuberculosis* (Whalen et al., 1995).

A doença é causada por micobactérias que são pequenos bacilos, aeróbios obrigatórios, sem mobilidade, não formadores de esporos e que se multiplicam lentamente. No gênero *Mycobacterium* incluem-se espécies patogênicas e saprófitas, como o *M. microti*. (Griffin et al., 1995; Hines et al., 1995). Estes bacilos são caracterizados por sua resistência a colorações álcool-ácidas e podem ser facilmente identificadas através da coloração pelo método de Ziehl-Nielsen ou pela auramina (Lavalley, 1973) Além das micobactérias causadoras da tuberculose, as espécies *M. avium* e *M. kansasii* podem causar infecções em pacientes imunocomprometidos (Pintado et al., 1999) e o *M. leprae* causa a hanseníase (para revisão (Hines et al., 1995).

A contaminação se dá por inalação de aerossóis infectados provenientes de indivíduos doentes. O foco primário da infecção é pulmonar, e localiza-se, mais freqüentemente, em regiões periféricas dos pulmões próximas às zonas médias e

inferiores dos pulmões, para onde a maioria do ar inalado a cada inspiração é direcionado (Moreno et al., 1989).

Os bacilos que chegam nos pulmões são fagocitados por macrófagos alveolares, podendo ser mortos por estas células ou sobreviver em seu interior iniciando a infecção. Após 2 ou 3 semanas, os microorganismos que sobrevivem no interior do fagócito se multiplicam e, em seguida, matam o macrófago hospedeiro. Este passo é seguido por liberação da micobactéria para o meio extracelular, e subsequente infecção de outras células (Dannenberg, 1994; Schluger and Rom, 1998).

O processo de fagocitose de *M. tuberculosis* compreende várias etapas. A primeira delas é a adesão do bacilo à célula hospedeira. Diversos receptores participam da interação do bacilo-fagócito. Dentre eles, destacam-se os receptores de manose de macrófagos (MMRc). Estes receptores participam da fagocitose não mediada por opsonina, reconhecendo resíduos de manose nas partículas alvo (Fenton and Vermeulen, 1996). A expressão de receptores de manose na superfície da célula é regulada por uma variedade de mediadores que desempenham um papel na patogênese da tuberculose, como o Interferon -  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) e Interleucina - 4 (Fenton and Vermeulen, 1996; McDonough et al., 1993a). Outra via de internalização é a da proteína surfactante A, que serve como uma opsonina para microorganismos inalados, e pode ser uma via alternativa para a micobactéria infectar a célula (Downing et al., 1995; Gaynor et al., 1995). Existem também evidências do envolvimento de CD14 na adesão de *M. tuberculosis* às células hospedeiras. A ligação do bacilo à célula hospedeira mediada por receptores de manose ou CD14 ocorre pela ligação destes a um componente da parede micobacteriana chamado de lipoarabinomanana (LAM). O reconhecimento da LAM via CD14 é semelhante ao lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas, havendo pontos em comum nos sistemas de sinalização desencadeados por esses produtos (Hoheisel et al., 1995; Schluger and Rom, 1998).

Vários estudos têm indicado a participação de receptores do tipo "Toll" (TLR) no processo de ativação de macrófagos por antígenos micobacterianos (Heldwein et al., 2003; Quesniaux et al., 2004; Takeuchi et al., 1999) Até o momento, foram descritos 10 membros da família do TLR em mamíferos, com funções distintas de reconhecimento na imunidade inata. Vários agonistas para estes receptores têm sido identificados, incluindo LPS, lipoproteínas, glicolipídios e LAM. Takeuchi e col. e Jones e col. (Jones et al., 2001; Takeuchi et al., 2002) demonstraram que ambos



TLR2 e TLR4 desencadeiam vias de sinalização intracelular induzidas pelo *M. tuberculosis in vitro*, e que *M.tb* viável contém distintos ligantes que ativam células via TLR2 e TLR4.

Vários trabalhos têm descrito a ativação celular via TLR2 por lipoglicanas da parede celular micobacteriana, como por exemplo, o LAM e fosfatidil mio-inositol manosídeo (PIM) (Gilleron et al., 2003; Means et al., 1999), sugerindo que TLR2 tem participação crucial na resposta inata contra micobactérias.

A vasta literatura tem mostrado que TLR2 e TLR4 podem regular diversos aspectos da resposta imune contra micobactérias (Heldwein et al., 2003; Krutzik et al., 2003). Heldwein e col. (Heldwein et al., 2003) mostraram que BCG induz a produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos deficientes de TLR4, mas não de TLR2. Macrófagos deficientes de TLR2 não expressam MHC de classe II quando infectados por *M. tuberculosis*, diferente do observado para macrófagos deficientes de TLR4 (Reiling et al., 2002). Além disso, animais deficientes de TLR2 faliram em limitar o crescimento de BCG no pulmão, mas por outro lado, a fagocitose, o crescimento intracelular e a capacidade de IFN- $\gamma$  de suprimir o crescimento intracelular não foram afetados (Heldwein et al., 2003). Há alguns trabalhos que descrevem que quando são usadas altas doses, animais deficientes de TLR2 são mais susceptíveis a infecção (Reiling et al., 2002), mas em pequenas doses camundongos deficientes de TLR4 exibem incapacidade de eliminação da micobactéria e sucumbem rapidamente à infecção (Abel et al., 2002). Esses trabalhos demonstram que TLR2 e TLR4 regulam a resposta inata e adaptativa contra infecção por BCG, embora a contribuição destas proteínas para a defesa do hospedeiro seja quantitativamente diferentes (Heldwein et al., 2003; Reiling et al., 2002).

Outras vias de adesão podem ser mediadas por receptores de complemento CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) e CR4 (CD11c/CD18) (Fenton and Vermeulen, 1996). Além destas vias, os receptores “scavenger” podem atuar em conjunto com os receptores de complemento e de manose na internalização de bactérias (Zimmerli et al., 1996).

O passo seguinte à adesão é a internalização, onde as bactérias são englobadas em fagossomos. Nesta fase, a sobrevivência e o crescimento bacteriano dependem da capacidade da bactéria em evitar a destruição por enzimas lisossomais, espécies de oxigênio reativas – ROI - e espécies de nitrogênio reativas – RNI (Kuo et al., 1996). A capacidade de bloquear a fusão do fagossomo contendo

a micobactéria com lisossomos parece ser essencial para a sobrevivência da micobactéria.

Estudos ultra-estruturais de macrófagos infectados têm investigado a dinâmica da fusão do fagolisossomo e seu efeito na replicação bacteriana (McDonough et al., 1993b). Nestes estudos, observa-se que cepas virulentas de *M. tuberculosis* possuem habilidade de inibir o desenvolvimento do fagossomo, evitando sua transformação em compartimentos ricos em hidrolases ácidas. Outra possibilidade é que as membranas do vacúolo em torno do bacilo podem ser deficientes da enzima Próton ATPase, a qual parece ser responsável pela acidificação fagossomal (Sturgill-Koszycki et al., 1994). Além disso, a sobrevivência de *M. tuberculosis* dentro destas vesículas especializadas pode reduzir o processamento de antígenos bacterianos e sua associação com proteínas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, diminuindo assim a possibilidade de apresentação a linfócitos.

De modo geral, as estratégias de sobrevivência dentro de fagolisossomos incluem: inibição do processo de fusão, uso preferencial de vias que não conduzam a fusão de fagolisossomos, resistência a conteúdos lisossomais, inativação de enzimas, modificação de fagolisossomos para facilitar sua sobrevivência e replicação (Anes et al., 2003; Beatty et al., 2002; McDonough et al., 1993b; Russell, 2003; Walburger et al., 2004).

Na resposta inflamatória na infecção por micobactéria os neutrófilos são as primeiras células a aparecerem no exsudato tuberculoso, muito embora a tuberculose seja caracterizada por predominante migração de células do sistema monócito/macrófago. Por serem fagócitos profissionais, os neutrófilos são capazes de rapidamente fagocitar os bacilos e liberar potentes mediadores inflamatórios, indicando que estas células podem iniciar a resposta inflamatória ao bacilo tuberculoso, liberando quimiocinas que atraem monócitos e outras células para o sítio inflamatório (Antony et al., 1985; Kasahara et al., 1998).

No modelo de pleurisia induzida por *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos observou-se acúmulo bifásico de leucócitos após 24 h e 15 dias de infecção, caracterizado principalmente por aumento no número de neutrófilos e células mononucleares (Moura et al., 1999; Werneck-Barroso et al., 2000). Silva e colaboradores (Silva et al., 1989) também demonstraram um influxo inicial de neutrófilos na cavidade peritoneal de camundongos, após injeção de micobactérias, que pode durar cerca de 10 dias, seguido por novo acúmulo que persiste durante

mais de 3 meses. Como os neutrófilos têm uma meia vida curta, seu achado em várias fases da infecção sugere quimiotaxia e migração contínua deste tipo celular.

Na resposta a infecções micobacterianas, os macrófagos são as principais agentes de defesa do hospedeiro. Os macrófagos são capazes de produzir espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio capazes de matar o bacilo, embora as espécies reativas de nitrogênio parecerem mais efetivas nesta função (Bonecini-Almeida et al., 2004; Schluger and Rom, 1998) (Fenton and Vermeulen, 1996; MacMicking et al., 1997a). MacMicking e col. (MacMicking et al., 1997b) demonstraram que a ativação da enzima óxido nítrico sintase é essencial para conter a replicação de *M. tuberculosis* no macrófago hospedeiro. Em paralelo, Kuo e col. (Kuo et al., 1996) utilizando macrófagos alveolares, demonstraram alta capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio em pacientes com tuberculose primária em comparação com células obtidas de indivíduos normais. De forma geral, NO secretado por macrófagos ativados é um efetivo mecanismo de controle da proliferação e disseminação de patógenos intracelulares e, a inibição da expressão de NO sintase por células epitelióide pode facilitar a persistência e proliferação de BCG no granuloma (Kreuger et al., 1998).

A habilidade da micobactéria de escapar da ação destas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio parece ser essencial no estabelecimento do estado latente de infecção. Além dos mecanismos de escape citados anteriormente, substâncias produzidas por micobactérias podem inativar espécies de oxigênio e nitrogênio reativos ou inibir a transcrição de genes, como o gene da enzima óxido nítrico sintase. Dessa forma, conseguem se multiplicar dentro dos fagócitos do hospedeiro impedindo a síntese de substâncias anti-microbianas (Wayne, 1994).

Outras células que participam da resposta a micobactérias, em cooperação com os macrófagos, são os linfócitos. Linfócitos T citotóxicos podem ser recrutados por macrófagos e são capazes de lisar macrófagos que contenham micobactérias (Schluger and Rom, 1998; Stenger et al., 1997). Os linfócitos têm grande importância no mecanismo de resistência do hospedeiro a micobactérias, participando também da formação de granulomas (Schluger and Rom, 1998).

Outros estudos têm indicado que micobactérias exercem influência sobre as células hospedeiras, limitando a apresentação de antígenos (Gercken et al., 1994; Ullrich et al., 2000), induzindo supressão da resposta de linfócitos (Prasad et al., 1987), induzindo mediadores pró-inflamatórios e imunossupressivos (Rhoades et al., 1995; Wallis and Ellner, 1994). Russell e col. (Russell, 2001) demonstraram que a

progressão de vacúolos contendo micobactérias é limitada pela capacidade de acidificação do compartimento, facilitando o acesso a nutrientes internalizados pela célula hospedeira e restringindo a interface entre o patógeno e a maquinaria de processamento e apresentação de antígenos por macrófagos.

O papel dos eicosanóides em respostas inflamatórias causadas por agentes infecciosos vem sendo estudado. Macrófagos, em resposta a micobactérias e outros patógenos, produzem citocinas e mediadores lipídicos que modulam a resposta inflamatória a estes agentes. O significado funcional de prostaglandinas tem sido correlacionado com a desativação de macrófagos e a subsequente sobrevivência de micobactérias em seu interior (Hines et al., 1995). Além disso, o aumento da síntese de prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) relaciona-se com a diminuição na produção de radicais reativos de nitrogênio por macrófagos, diminuindo assim sua atividade citotóxica contra micobactérias. Prostaglandinas, juntamente com Interleucina-1, TNF- $\alpha$  e fator transformador de crescimento (TGF- $\beta$ ) podem ser produzidas por macrófagos em resposta ao LAM (lipoarabinomanana) - principal componente da parede celular de micobactérias - e a outros antígenos micobacterianos. Hsueh e col. (Hsueh et al., 1979) demonstraram que macrófagos alveolares de coelhos produzem elevados níveis de PGE<sub>2</sub> quando ativados por estímulo fagocítico, como o BCG. Em humanos, altos níveis de PGE<sub>2</sub> no lavado bronco-alveolar são identificados em pacientes tuberculosos (Kaminskaia et al., 1993). Estudos com *Mycobacterium avium* também demonstraram altos níveis de PGE<sub>2</sub> em culturas de monócitos humanos estimulados por esta micobactéria, sugerindo que a produção de PGE<sub>2</sub> induzida por *M. avium* poderia modular a produção de citocinas e o parasitismo celular (Venkataprasad et al., 1996).

Baseados nos efeitos inibitórios que as prostaglandinas causam em macrófagos, Scott e col. (Scott et al., 1982) demonstraram que a diminuição na síntese de PGE<sub>2</sub> causou um aumento da atividade citotóxica de macrófagos murinos contra patógenos intracelulares como BCG e *Toxoplasma gondi*. Nesta mesma linha de pesquisa, Carvalho-de-Sousa e col. (Carvalho de Sousa et al., 1992) em estudos *in vitro* com monócitos e macrófagos humanos, demonstraram que o pré-tratamento destas células com indometacina e Interferon- $\gamma$  potenciou significativamente a atividade bacteriostática destas células contra *M. tuberculosis*. A utilização de inibidores da enzima ciclooxigenase aparece, então, como modelo para terapia de doenças, prevenindo os efeitos da produção de PGE<sub>2</sub>, que age desativando

macrófagos, inibindo a proliferação de linfócitos e a produção de anticorpos por estas células.

Além de prostaglandinas, outros mediadores lipídicos estão envolvidos em infecções micobacterianas. O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) é um potente agente quimiotático e ativador de neutrófilos e também de eosinófilos e células mononucleares (Nohgawa et al., 1997; Noiri et al., 2000). Como demonstrado por el-Ahmady (el-Ahmady et al., 1997) os níveis de LTB<sub>4</sub> e da citocina IL-6 no plasma de pacientes tuberculosos encontravam-se elevados em 93% dos casos, indicando importante papel deste eicosanóide na patogênese da infecção por *M. tuberculosis*. Menezes-de-Lima-Júnior e col. (Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997), no modelo de pleurisia induzida por BCG, observaram que um inibidor específico da síntese de leucotrienos, o BW A4C, inibiu o acúmulo de neutrófilos nas primeiras horas da infecção e, mais tarde, de eosinófilos e de células mononucleares. Este trabalho enfatiza o que tem sido demonstrado na literatura sobre a participação de LTB<sub>4</sub> no acúmulo de leucócitos durante o processo inflamatório.

No entanto, os mecanismos que levam à destruição do patógeno intracelular não se encontram totalmente entendidos. Evidências recentes apontam para um importante papel modulatório de lipídios derivados de bactérias e do hospedeiro (Anes et al., 2003; Gatfield and Pieters, 2000; Russell, 2003; Russell et al., 2002; Vergne et al., 2004a).

Lipídios da superfície micobacteriana são os primeiros componentes a interagir com a célula hospedeira, afetando a ativação de macrófagos e possivelmente direcionando eventos iniciais na modulação da maturação fagossomal (Goren et al., 1976). Moura e colaborador demonstraram que lipídios da parede celular de *M. leprae* causam supressão do sistema imune no modelo de edema de pata em camundongos (Moura and Mariano, 1997). Outros estudos têm caracterizado a atividade imunomodulatória do LAM, que pode inibir a produção de IFN- $\gamma$  por macrófagos ativados (Sibley et al., 1988), suprimir a ativação de linfócitos T (Ellner and Daniel, 1979), bem como inibir vias que levam a apresentação de antígenos. Moreno e col. e Fratti e col. (Fratti et al., 2000; Moreno et al., 1988) demonstraram que microesferas revestidas com LAM foram internalizadas em fagossomos, que mostraram reduzida capacidade de fusão com lisossomos, sugerindo que o LAM tem papel na modulação de da via endocítica, e também pode interferir com ativação de macrófagos mediada por IFN- $\gamma$  (Sibley et al., 1988).

Recentemente, Gatfield e col. (Gatfield and Pieters, 2000) demonstraram que vacúolos contendo micobactérias apresentam um alto conteúdo de colesterol e que a depleção de colesterol em macrófagos antes da incubação com bactérias tornam as células refratárias à infecção.

Além disso, ácido araquidônico e ceramidas internalizados pelo hospedeiro, parecem estar relacionados com a sinalização intracelular em macrófagos infectados, por modular a resposta imune do hospedeiro, através da indução da produção de citocinas (Akaki et al., 2000; Flynn and Chan, 2001), ou interferindo com os níveis de ATP intracelular, desencadeando a associação de actina e culminando com a maturação fagossomal, e conseqüente morte do patógeno (Anes et al., 2003).

Fundamentados nestes dados, Russell e col. (Russell, 2003) sugerem que o curso da infecção pode ser influenciado pela inclusão de determinados ácidos graxos na dieta. É importante ressaltar que durante um processo infeccioso, o que é alimento para o hospedeiro pode representar também uma fonte acessível de nutrientes para o patógeno.

### **1.2.2 – Doença de Chagas**

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi descoberta por Carlos Chagas em 1909 (Brenner, 1973; Chagas, 1909). De forma geral, a infecção chagásica manifesta-se nas formas aguda, indeterminada e crônica, sendo que a evolução destas formas no hospedeiro vertebrado é dependente tanto de fatores relacionados ao parasita (virulência, cepa, tropismo), como fatores relacionados com o hospedeiro (constituição genética, estado nutricional, raça, idade) que interferem no curso da doença (Prata, 2001; Tafuri, 1987).

A vasta literatura sobre a doença de Chagas, tanto humana quanto experimental, reconhece que a moléstia possui patogenia extremamente complexa, expressando lesões em diversos órgãos do hospedeiro, além de produzir amplo espectro de manifestações clínicas e funcionais.

Sob condições naturais, o protozoário *T. cruzi* é transmitido pela picada de insetos infectados (vetores) da família Reduviidae – os barbeiros. O ciclo de vida compreende a transmissão do inseto infectado para um animal vertebrado e, em humanos, é basicamente dependente das condições de vida, como co-habitação

com insetos vetores e animais domésticos.(Nickerson et al., 1989; Sarquis et al., 2004)

Considerável progresso tem sido obtido em grandes áreas da América Latina no controle da transmissão natural. No entanto, novos casos são encontrados em algumas localidades, especialmente em áreas sem medidas de controle dos vetores (Sarquis et al., 2004). Outra forma de transmissão que pode ocorrer é entre humanos durante a gravidez ou na transmissão de sangue (Nickerson et al., 1989).

Após a infecção pelas mucosas ou pela pele, formas tripomastigotas de *T. cruzi* podem ser fagocitadas por macrófagos ou penetrar diretamente em outros tipos celulares (células musculares lisas e estriadas e fibroblastos), onde se transformarão nas formas intracelulares reprodutivas – as amastigotas. Diversos autores demonstraram que, independente do *T. cruzi* invadir um fagócito profissional ou qualquer outro tipo celular o mecanismo biológico de invasão parece ser o mesmo – endocitose (Araujo-Jorge et al., 1992; Tafuri, 1987). No entanto, recentes trabalhos têm discutido este fenômeno em células não fagocíticas. Eles têm demonstrado, através de vídeo-microscopia, que o parasita poderia invadir a células de duas formas: (1) tripomastigotas recrutam lisossomos para o sítio de adesão, que gradualmente se fundem com a membrana plasmática para a formação do vacúolo parasitóforo; ou (2) o parasita promove a invaginação da membrana plasmática do hospedeiro, o que conduz à completa internalização do parasita. Interessantemente, a primeira forma permite a retenção do parasita na célula, e o segundo pode ser revertido com a liberação de tripomastigotas de volta ao meio extracelular (para revisão (Andrade and Andrews, 2005)).

Após nove ciclos de divisões binárias, amastigotas diferenciados voltam para a forma tripomastigota, as quais são liberadas após a ruptura da célula hospedeira. Esta amplificação do número de parasitas é responsável pela fase aguda, que é caracterizada pela alta parasitemia e parasitismo tecidual (Andrade and Andrews, 2005; Brener and Couch, 1973; Dvorak and Hyde, 1973; Tanowitz et al., 1992).

A resposta imunológica celular ocupa papel de destaque na defesa do hospedeiro vertebrado ao *T. cruzi*. E a complexidade desta reação sustenta diferentes hipóteses sobre a participação e o grau de envolvimento dos diferentes tipos celulares.

Dentre as células envolvidas na resposta imune inata destacam-se os macrófagos, os quais têm duplo papel na infecção chagásica. Os macrófagos residentes são permissivos à ocupação parasitária, servindo de suporte para a

multiplicação e diferenciação dos parasitas no início da infecção, mas também têm papel fundamental na resposta imune do hospedeiro contra o parasita, sendo capazes de realizar fagocitose e produzir substâncias microbicidas, como peróxido de hidrogênio (Melo and Machado, 2001) e óxido nítrico (Gazzinelli et al., 1992; Planelles et al., 2003; Vespa et al., 1994).

A importância destas células durante a fase aguda é evidenciada por diversos autores que descrevem, *in vivo*, a exacerbação da parasitemia e de índices de mortalidade em camundongos e ratas submetidos a bloqueio de macrófagos através de tratamento com sílica (Celentano and Gonzalez Cappa, 1993; Kierszenbaum et al., 1974; Melo and Machado, 2001). Além disso, observou-se em ratas Holtzman infectadas, número elevado de macrófagos no coração e de monócitos no sangue periférico na fase aguda da infecção, indicando intensa mobilização do sistema monócito/macrófago com a finalidade de combater o crescimento parasitário (Melo and Machado, 2001).

Igualmente, destaca-se a função dos macrófagos como células secretoras de citocinas pró-inflamatórias como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que estão relacionadas com a função microbicida (Abrahamsohn and Coffman, 1996; Rivas-Santiago et al., 2005; Schluger and Rom, 1998). Destaca-se ainda a produção de citocinas de perfil anti-inflamatório, como a IL-10. Silva e col (Silva et al., 2002) demonstraram que altos níveis de IL-10 produzidos por macrófagos de camundongos colaboram para susceptibilidade destes animais à infecção. Por outro lado, Jacobs e col. (Jacobs et al., 1998) argumentam que esta citocina poderia ter um papel protetor dependendo do modelo de infecção usado.

Assim como acontece em infecções por micobactérias, na infecção por *T. cruzi* trabalhos apontam o processo de apoptose como um importante fator que afeta as células hospedeiras e a resposta imune contra o parasita (DosReis and Barcinski, 2001).

### **1.2.3 - Papel da apoptose na infecção por patógenos intracelulares**

Apoptose é um tipo fisiológico de morte programada, que ao contrário da morte celular acidental ou da simples falência descontrolada que ocorre na necrose, se caracteriza por um processo ativo de alterações morfológicas e fisiológicas.

O processo de apoptose é comandado nas células por um grupo de cisteína proteinases com especificidade para resíduos de aspartato, chamadas de *caspases*.



Essas enzimas estão normalmente presentes no citoplasma sob forma inativa e podem ser ativadas por uma variedade de estímulos, incluindo glicocorticóides e a proteína p53 (Shaw and Henson, 1982; Wyllie et al., 1980). Existem duas categorias de caspases envolvidas na apoptose, distintas por suas características bioquímicas e funcionais, sendo chamadas caspases executoras e iniciadoras. As da primeira classe estão as caspases-3, -6 e -7 que existem como dímeros inativos. As enzimas responsáveis pela sua ativação são as caspases iniciadoras, como as caspase-8 e -9, por exemplo. Essas enzimas servem como marcadoras do processo apoptótico, porque as células que contêm caspases ativadas podem ser detectadas por imunoenaios. Quando as caspases são ativadas, elas clivam substratos específicos e estas clivagens produzem as mudanças morfológicas associadas com a apoptose, como fragmentação do DNA e a externalização da fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática (Boatright and Salvesen, 2003).

Normalmente, a ativação dessas proteases é bloqueada por uma família de proteínas, cujo protótipo é a Bcl-2. Essa família de proteínas consiste de membros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X<sub>1</sub>, Mcl-1, A1) e pró-apoptóticos (Bax- $\alpha$ , Bak, Bad, Bcl-X<sub>s</sub>, Bik) (Oltvai and Korsmeyer, 1994). A mudança do balanço entre um fator anti e pró-apoptótico pode levar a um produto que promove a apoptose em células humanas (Dibbert et al., 1999), entre outros fatores, pelo controle da liberação do holocitocromo c da mitocôndria. Durante a apoptose ocorre a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, que leva à liberação de organelas mitocondriais para o espaço intermembranar, incluindo o holocitocromo c, permitindo a ativação das caspases que, finalmente, executam o programa apoptótico (Kroemer et al., 1998).

A apoptose é definida tecnicamente pelas características morfológicas da célula que está morrendo, em particular pela condensação da cromatina acompanhada pela fragmentação do núcleo. A membrana plasmática é freqüentemente contorcida em bolhas e a célula pode se fragmentar formando corpos apoptóticos ligados a membrana. Esses corpos apoptóticos são rapidamente ingeridos por células fagocíticas e a morte celular não dispara uma resposta inflamatória (Wyllie et al., 1980), de maneira diferente do que ocorre na necrose. Neste último caso há perda da integridade da membrana plasmática e perda do conteúdo intracelular, que é acompanhado por infiltrado inflamatório de células fagocíticas (Searle et al., 1982).

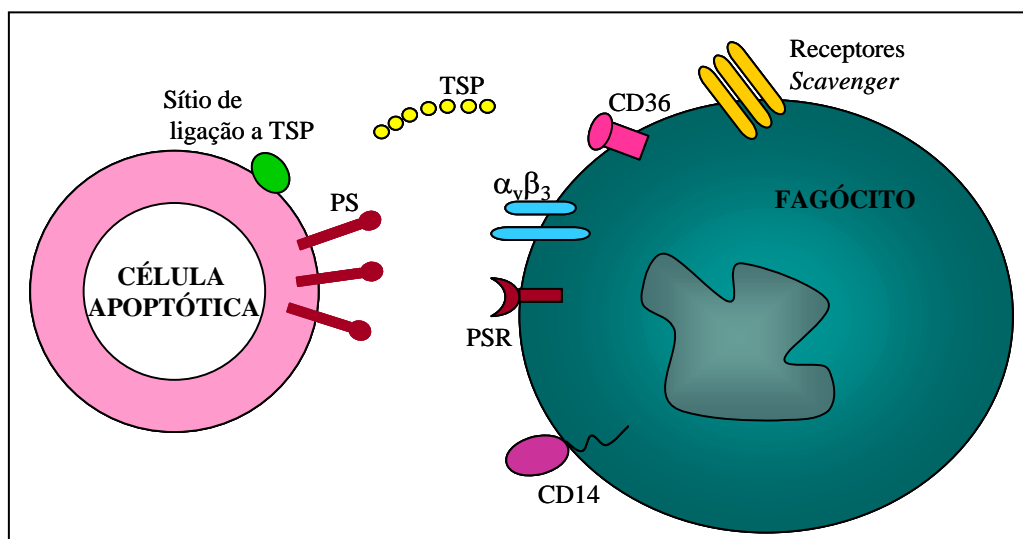
Além dos processos fisiológicos, que ocorrem em diferentes espécies animais, a apoptose pode ocorrer em células que estejam infectadas, danificadas, ou em excesso. Em infecções virais, por exemplo, a maneira mais eficiente de parar a replicação viral é matar as células infectadas através do reconhecimento dos antígenos virais por células T citotóxicas (Clouston and Kerr, 1985; Fadok et al., 1992b). Da mesma forma, o acúmulo e persistência dos leucócitos em inflamações crônicas facilitam o processo de apoptose, e a remoção destas células é um importante mecanismo modulador para a resolução da inflamação *in vivo* (Haslett, 1999; Savill and Fadok, 2000).

Células apoptóticas são rapidamente reconhecidas por macrófagos que realizam a ingestão e degradação destas células. Isto ocorre porque as células apoptóticas expressam moléculas específicas de superfície, como a fosfatidilserina (PS), que permitem seu reconhecimento e fagocitose por macrófagos (Savill and Fadok, 2000). Essa remoção fornece proteção contra o dano local que seria provocado com a liberação de conteúdo tóxico ou pró-inflamatório das células (Haslett, 1999). Como a inflamação local e injúria tecidual são evitadas, uma resposta pró-inflamatória dos macrófagos também é evitada, promovendo a resolução da inflamação (Meagher et al., 1992). Desta maneira, durante a resposta pró-inflamatória, os granulócitos recrutados que entram em apoptose retêm seus grânulos e perdem a habilidade de degranular em resposta aos estímulos pró-inflamatórios (Haslett, 1999).

A remoção de células apoptóticas por fagócitos libera mediadores anti-inflamatórios e imunossupressores, como o fator transformador de crescimento (TGF)- $\beta$ 1 em vários tipos celulares, como macrófagos derivados de monócitos humanos, a linhagem de macrófagos murinos RAW264,7 e J774, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos, fibroblastos e células epiteliais mamárias (Fadok et al., 1998b; Fadok et al., 2000; McDonald et al., 1999).

Diversos receptores podem estar envolvidos no reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos. Trabalhos descrevem o papel do receptor CD14 de lipopolissacarídeo (LPS) (Devitt et al., 1998; Flora and Gregory, 1994; Pradhan et al., 1997), lecitina e moléculas "lecitina-like" na superfície de macrófagos que reconhecem mudanças nos carboidratos da superfície de células apoptóticas (Duvall et al., 1985). Destacam-se ainda o receptor de fosfatidilserina (PSR) (Fadok et al., 1998a), os receptores *scavenger* (Fadok et al., 1998a) e o receptor de vitronectina, a

integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que coopera com o CD36 na ligação à trombospondina (TSP) na superfície das células apoptóticas (Savill et al., 1992) (Figura 2).



**Figura 2** – Representação esquemática de receptores envolvidos no reconhecimento de células apoptóticas por fagócitos. Adaptado de: *Biochim Biophys Acta*. 2003 Nov 20;1639(3):141-51.

Trabalhos demonstraram que as células apoptóticas perdem a assimetria dos fosfolípidios da membrana plasmática e expõem fosfatidilserina (PS) na camada externa da membrana, podendo ser reconhecida por macrófagos (Fadok et al., 1992a). Vários estudos têm utilizado anticorpos que mimetizam células apoptóticas para investigar o papel da fagocitose destas células na inflamação. Baseando-se neste mecanismo de interação de receptores, Hoffmann e col. desenvolveram um sistema com anticorpos contra o CD14, CD36 e integrina  $\alpha_v\beta_3$  para determinar quais os receptores fagocíticos promovem a ligação e induzem a fagocitose de células apoptóticas. Desta maneira, foi sugerido um importante papel para o PSR no reconhecimento e fagocitose de células apoptóticas (Hoffmann et al., 2001). Este receptor também parece ter um papel na secreção da citocina antiinflamatórias, TGF- $\beta$ . Huynh e col. (Huynh et al., 2002) também demonstraram que a instilação direta de lipossomas de PS e de células apoptóticas que expressavam PS provocaram secreção aumentada de TGF- $\beta$  e a resolução de lesões inflamatórias pulmonares e peritoneais de camundongos. Entretanto, não se sabe como o PSR reconhece a PS nas células apoptóticas.

Estudos também mostraram que os receptores *scavenger* (SR) poderiam ter importante papel nesse mecanismo. Os SR são uma família de glicoproteínas da

superfície celular capazes de se ligar a lipoproteínas quimicamente modificadas, como a LDL oxidada, e tem importante papel na formação da placa aterosclerótica (Krieger and Herz, 1994).

Por último destaca-se ainda o papel da integrina  $\alpha_v\beta_3$  neste processo (Ruoslahti and Pierschbacher, 1987). Savill e col. demonstraram que o receptor de vitronectina ( $\alpha_v\beta_3$ ) também está envolvido na fagocitose de neutrófilos e linfócitos apoptóticos (Savill et al., 1990) e atuam em associação com o CD36 via uma ponte de trombospondina (Savill et al., 1992). Erwig e col. (Erwig et al., 1999) mostraram que macrófagos derivados de medula óssea de ratos também fagocitam neutrófilos humanos apoptóticos através de cooperação integrina  $\alpha_v\beta_3$ /CD36/trombospondina. A ligação do receptor de vitronectina também ocorre em macrófagos murinos infectados com o parasita *T. cruzi* ao fagocitarem células apoptóticas (Freire-de-Lima et al., 2000). Neste caso, a ligação da integrina  $\alpha_v\beta_3$  levou à secreção da citocina TGF- $\beta$  e de PGE<sub>2</sub>, causando desativação dos macrófagos e tornando-os permissivos à infecção. Esta produção de TGF- $\beta$  ocorreu também com o uso de anticorpos contra o receptor, na ausência de células apoptóticas (Freire-de-Lima et al., 2000).

A fagocitose de células apoptóticas por macrófagos induz a secreção de PGE<sub>2</sub> e do fator ativador de plaquetas (PAF), que estimulam a produção de TGF- $\beta$  (Fadok et al., 1998b). Devido aos seus vários efeitos, o controle da síntese das prostaglandinas é um elemento crítico na regulação de muitos processos fisiológicos e a base da terapia antiinflamatória.

A literatura tem demonstrado que altas concentrações de PGE<sub>2</sub> tem efeitos imunossupressores significativos (Phipps, 1991), que incluem: (1) a diminuição da proliferação de linfócitos e da expressão de moléculas do MHC classe II (Snyder et al., 1982) (2) inibição da produção de citocinas com perfil Th<sub>1</sub> (Betz and Henson, 1980), (3) inibição da ativação de macrófagos (Fadok et al., 1998b); (3) e supressão da produção de IL-1 e TNF- $\alpha$  (Renz et al., 1988) que são importantes citocinas capazes de induzir ativação de macrófagos e expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS).

Fadok e col., (Fadok et al., 1998b) demonstraram que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos humanos induziu a secreção de citocinas antiinflamatórias, como TGF- $\beta$  e interleucina (IL)-10, e inibição de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 e fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . Voll e col. (Voll et al., 1997) também mostraram produção aumentada de TGF- $\beta$  e IL-10 e inibição da

secreção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  quando monócitos estimulados com LPS eram cultivados com linfócitos apoptóticos. Neste caso, macrófagos são capazes de se ligar às células apoptóticas mas não de fagocitá-las (Newman et al., 1982). Esses resultados também foram reproduzidos utilizando-se neutrófilos como células apoptóticas. Estudos inibitórios mostraram que TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub> e PAF participam de maneira parácrina e/ou autócrina na inibição da secreção de TNF- $\alpha$ . Além disso, dados *in vivo* mostram que o TGF- $\beta$  liberado de macrófagos que fagocitaram células apoptóticas tem efeito antiinflamatório em lesões pulmonares e peritoneais (Huynh et al., 2002). Por outro lado, Uchimura e col. (Uchimura et al., 1997) mostraram a liberação da citocina pró-inflamatória MIP (proteína inibidora de macrófago)-2 quando macrófagos murinos foram co-cultivados com linfócitos T apoptóticos. O sobrenadante desta cultura foi capaz de recrutar neutrófilos quando injetado na cavidade peritoneal de camundongos.

A produção de TGF- $\beta$  induzida por células apoptóticas durante a infecção por *T. cruzi* inibe a síntese de NO induzida por IFN- $\gamma$ , e a atividade tripanocida de macrófagos (Gazzinelli et al., 1992). O TGF- $\beta$  também aumenta o metabolismo da arginina em macrófagos, diminuindo a produção de NO e induzindo a enzima arginase a produzir ornitina, com subsequente biossíntese de poliaminas (Boutard et al., 1995). A enzima ornitina descarboxilase (ODC) catalisa a síntese de putrescina a partir da ornitina, levando a produção de espermidina e espermina (Pegg and McCann, 1982). O parasita *T. cruzi* pode sintetizar poliaminas utilizando putrescina adicionada exogenamente (Hunter et al., 1994). Macrófagos cultivados com células apoptóticas acumulam putrescina, favorecendo a replicação de *T. cruzi* (Freire-de-Lima et al., 2000). As células apoptóticas e a ligação de anticorpos ao VnR foram capazes de aumentar a atividade de ODC em macrófagos. Esta ligação do VnR resulta, também, em produção de TGF- $\beta$  que pode induzir a atividade de ODC nos macrófagos, promovendo o crescimento do *T. cruzi* (Freire-de-Lima et al., 2000).

A apoptose de células infectadas também é um mecanismo importante que pode modular a resposta imune inata à infecção micobacteriana. A apoptose de monócitos humanos infectados tem sido apontada como um importante mecanismo para limitar o crescimento intracelular de micobactérias (Kremer et al., 1997; Mendez-Samperio et al., 2000; Molloy et al., 1994). Outros autores, demonstraram que a morte celular por apoptose de macrófagos alveolares infectados por *M. tuberculosis*, pode facilitar uma efetiva função anti-*M. tuberculosis* por parte do hospedeiro (Keane et al., 1997). No entanto, alguns trabalhos sugerem que a morte

de células T por apoptose, após infecção por BCG, pode ser um importante componente da inefetiva resposta imune em hospedeiros susceptíveis [Kremer, 1997 #1972; Mendez-Samperio et al., 2000). Além disso, algumas espécies de micobactérias são capazes de modular diretamente a via apoptótica, tanto para atividade pró- (Keane et al., 1997; Rojas et al., 1999), quanto para anti-apoptótica (Balcewicz-Sablinska et al., 1998), o que é manifestado durante diferentes estágios da infecção e pode favorecer o estabelecimento de uma infecção persistente Estes trabalhos sugerem que o papel da apoptose nas infecções micobacterianas depende do tipo celular, enquanto que a morte por apoptose de células do sistema monócito/macrófago contribui para o controle da infecção, a apoptose de linfócitos e neutrófilos favorece o crescimento micobacteriano.

Com base nestes dados, pretendemos, com este trabalho, estudar a ocorrência e o significado funcional de corpúsculos lipídicos nos modelos experimentais de infecção por BCG e *T. cruzi*. Paralelamente, pretendemos investigar o papel da fagocitose de células apoptóticas e seu significado funcional na síntese de mediadores lipídicos durante a fase aguda destas infecções.

## 2 – Objetivos

### 2.1 – Objetivo geral:

⇒ Estudar a ocorrência e o significado funcional dos corpúsculos lipídicos após infecção por patógenos intracelulares – *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 - Objetivos específicos:

⇒ Analisar, através de microscopia ótica e eletrônica, a ocorrência e morfologia dos corpúsculos lipídicos nas células da reação inflamatória induzida por BCG e *T. cruzi*;

⇒ Estudar a participação de receptores da superfície celular, o *Toll-like receptor-2*, na sinalização e modulação da resposta inflamatória durante a infecção por BCG.;

⇒ Analisar o papel dos corpúsculos lipídicos na síntese de eicosanóides durante infecção por BCG e *T. cruzi*;

⇒ Investigar a ocorrência da fagocitose de células apoptóticas e seu envolvimento na formação de corpúsculos lipídicos e na síntese de mediadores lipídicos;

⇒ Analisar o papel dos eicosanóides nas infecções causadas por BCG e *T. cruzi*.

## 4 - Discussão

Evidências recentes têm indicado um importante papel para os corpúsculos lipídicos nos mecanismos de ativação celular na resposta imune inata e adaptativa. Estes domínios lipídicos funcionam como estruturas dinâmicas capazes de compartimentalizar diferentes proteínas envolvidas na sinalização celular. Neste trabalho nós investigamos o papel de um domínio lipídico intracelular não delimitados por membrana - os corpúsculos lipídicos - na compartimentalização de sinal envolvido na geração de mediadores inflamatórios, no metabolismo lipídico celular e na resposta do hospedeiro frente a infecções. A nossa hipótese central é que os corpúsculos lipídicos são domínios intracelulares, especializados e indutíveis, envolvidos no metabolismo lipídico e tráfego intracelular de macromoléculas. Além disso, eles parecem funcionar como plataformas de sinalização celular envolvidas na produção de mediadores inflamatórios e podem ter um impacto direto na capacidade de leucócitos ativados em responder à infecção por patógenos intracelulares. Entretanto, embora seja uma organela com papel central no metabolismo lipídico e na sinalização celular, a nossa compreensão dos mecanismos envolvidos na sua biogênese, dinâmica e função em diferentes sistemas celulares ainda é muito limitada. Neste trabalho demonstramos que a infecção pelos patógenos intracelulares *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium bovis* BCG, é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

Nós demonstramos neste estudo que a formação de corpúsculos lipídicos em infecções é um processo dinâmico, e que contribui para a síntese de mediadores inflamatórios, como PGE<sub>2</sub>, que modulam a resposta celular do hospedeiro. Além disso, identificamos vários fatores que interferem no mecanismo de formação destas organelas, como o envolvimento de receptores TLR2, tempo de infecção, indução e fagocitose de células apoptóticas e outros.

A tuberculose é uma doença de evolução complexa, e por este motivo, a escolha de um modelo experimental que consiga reproduzir o processo inflamatório inicial da tuberculose humana é essencial para a compreensão da patogênese da doença. Nesse sentido, utilizamos a pleurisia em camundongos como modelo de infecção experimental para o entendimento da dinâmica da resposta inflamatória precoce induzida por micobactérias.



Neste estudo, descrevemos que a injeção intratorácica de *Mycobacterium bovis* BCG em camundongos C57Bl/6 induziu uma resposta inflamatória inicial, caracterizada por intenso influxo celular e formação de corpúsculos lipídicos nas células da cavidade torácica. Em estudos anteriores, observou-se que o BCG induziu acúmulo de leucócitos em camundongos após 24 h e 15 dias de infecção. Este influxo foi caracterizado, principalmente, por aumento no número de neutrófilos e de células mononucleadas (Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Moura et al., 1999; Werneck-Barroso et al., 2000). De maneira semelhante, nossos resultados demonstraram um perfil semelhante na migração de células para a cavidade torácica. Contudo, com relação aos neutrófilos, observamos um pico no acúmulo dessas células 6h após a inflamação, diferente do que foi em outros trabalhos, onde o acúmulo máximo de neutrófilos aconteceu com 24h de infecção. Mesmo assim, nossos resultados estão de acordo com a literatura que tem considerado que o acúmulo de neutrófilos precede a migração de células mononucleadas e eosinófilos, em diferentes modelos de infecção (Cassatella, 1995; Riedel and Kaufmann, 1997). Posteriormente ao influxo de neutrófilos, observamos um grande influxo de eosinófilos e de células mononucleares, 24h após infecção, semelhante ao observado em outros trabalhos (Menezes-de-Lima-Junior and Henriques, 1997; Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997; Moura et al., 1999; Werneck-Barroso et al., 2000).

O papel da imunidade celular na tuberculose parece ser fundamental para a ação antimicrobiana e para a resolução da doença. A investigação sobre os mediadores inflamatórios, como os eicosanóides, que modulam a resposta do hospedeiro torna-se então de grande relevância. Para entendermos o papel destes mediadores lipídicos e os sítios intracelulares de síntese destas, investigamos a ocorrência e a ultra-estrutura de corpúsculos lipídicos nas células da cavidade torácica e sua relação com a síntese de eicosanóides.

Nós demonstramos que a infecção por BCG em camundongos induziu rápida formação de corpúsculos lipídicos nas células da cavidade torácica. Esta formação induzida por BCG ocorreu nas células da cavidade torácica já a partir da primeira hora após a infecção, quando observamos aumento no número de corpúsculos lipídicos. Trabalhos anteriores, demonstraram que os corpúsculos lipídicos podem ser rapidamente induzidos por PAF (15 minutos), e por ácidos graxos *cis* (1h) (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997a; Bozza et al., 1997b). No entanto, a formação de corpúsculos lipídicos induzida por bactérias e outros

patógenos é um processo ainda desconhecido, e tem sido investigada (Melo et al., 2003; Pacheco et al., 2002).

Semelhante ao que acontece com outros estímulos já estudados, como o PAF, LPS, oxLDL e ácidos graxos insaturados (Bozza et al., 1996a; de Assis et al., 2003; Pacheco et al., 2002), a formação de corpúsculos lipídicos ocorreu num mecanismo dependente do tempo da infecção experimental. Em nossos estudos observamos um aumento crescente no número de corpúsculos lipídicos a partir da primeira hora de infecção, atingindo um pico com 24h; e, após este tempo o número destas estruturas diminuiu, mas permaneceu significativamente maior que o controle até 15 dias de infecção. No entanto, o número aumentado de corpúsculos lipídicos induzidos por BCG permaneceu por um tempo bem mais prolongado do que observado o pela indução por LPS e PAF, em que 48 h após a estimulação número destas estruturas havia voltado a níveis normais (Bozza et al., 1996a; Bozza et al., 1997b; de Assis et al., 2003; Pacheco et al., 2002)

Além disso, observamos que o aumento na concentração de BCG provocou aumento proporcional na formação destas estruturas. Alguns trabalhos têm demonstrado que células envolvidas em processos infecciosos bacterianos incluindo artrite infecciosa, síndrome de angústia respiratória aguda e sepse, apresentam número aumentado de corpúsculos lipídicos (Bozza et al., 1996a; Pacheco et al., 2002; Triggiani et al., 1995).

Na infecção por *T. cruzi* em ratas, também é caracterizada por ativação de células do sistema monócitos/macrófago, com importante aumento no número destas células no sangue e coração (Melo and Machado, 2001), observamos intensa formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais e do infiltrado inflamatório do coração no 6° e 12° dia de infecção. Da mesma forma, a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos por *T. cruzi in vitro* levou à formação de corpúsculos lipídicos atingindo o máximo em 24h de infecção.

Além do aumento no número destas estruturas, alguns trabalhos demonstraram o aumento no tamanho dos corpúsculos lipídicos (Reginato et al., 1985; Weller et al., 1991). De forma semelhante, observamos um aumento no tamanho dos corpúsculos lipídicos nos animais infectados por BCG em relação aos controles. Além disso, o aumento do número e do diâmetro de corpúsculos lipídicos foi proporcional ao tempo de infecção e à concentração de BCG (D'Avila et al., 2006).

Células normais podem freqüentemente apresentar corpúsculos lipídicos, porém em número reduzido. Na infecção por BCG observamos que tanto neutrófilos quanto macrófagos e eosinófilos apresentavam número aumentado destas estruturas. Os corpúsculos lipídicos foram encontrados em maior número em macrófagos, enquanto neutrófilos e eosinófilos apresentavam menor formação de corpúsculos lipídicos e de diâmetro menor do que os encontrados em macrófagos. Dvorak e colaboradores (Dvorak et al., 1992) demonstraram uma relação inversa entre número de grânulos azurófilos e de corpúsculos lipídicos, e constatamos que os neutrófilos encontrados na cavidade torácica mantinham esta característica, exibindo grande número de grânulos e menor número de corpúsculo lipídicos.

A análise ultra-estrutural mostrou que os corpúsculos lipídicos, formados na primeira hora de infecção por BCG, apresentaram-se como estruturas bastante elétron-densas, devido à alta afinidade por tetróxido de ósmio. Diferentemente, os corpúsculos lipídicos observados 24h após a infecção mostraram-se como estruturas elétron-lúcidas e com uma região marginal muito elétron-densa. Notavelmente, na infecção por *T.cruzi in vivo*, macrófagos peritoneais também apresentavam, numa mesma secção, corpúsculos lipídicos de tamanho e elétron-densidade variáveis.

Estas diferenças morfológicas podem refletir diferenças na composição lipídica e na proporção fosfolipídios e lipídios neutros nos corpúsculos lipídicos. Caracteristicamente, o aumento no número e tamanho de corpúsculos lipídicos é acompanhado por acúmulo de lipídios neutros no centro (*core*) hidrofóbico (Tauchi-Sato et al., 2002; Triggiani et al., 1995). Ao mesmo tempo, análises lipídicas de macrófagos infectados por BCG demonstraram significativo aumento, na dependência do tempo, do estoque de triglicerídios e ésteres de colesterol (Maya-Monteiro, D'Avila e Bozza, observações não publicadas). Além disso, o anel periférico elétron-denso observado parece representar fosfolipídios na periferia do corpúsculo lipídico. Estudos recentes têm demonstrado que os corpúsculos lipídicos são revestidos por uma hemi-membrana ou monocamada de fosfolipídios (Dvorak et al., 1983; Murphy, 2001; Tauchi-Sato et al., 2002). Do mesmo modo, a superfície dos corpúsculos lipídicos induzidos por BCG apresentou grande quantidade da proteína ADRP, o que confirma nossas observações prévias que demonstram que a ADRP é a principal proteína que reveste os corpúsculos lipídicos de leucócitos (Heid et al., 1998), Maya-Monteiro e col., submetido)

No entanto, a contribuição de lipídios bacterianos não é descartada, uma vez que Beatty e col. (Beatty et al., 2000; Beatty et al., 2001) demonstraram o tráfego de componentes para parede celular de micobactérias para fagossomos ou outras organelas de macrófagos infectados.

Interessantemente, para ambas as infecções por patógenos intracelulares, nossos resultados indicaram que as células não precisavam estar infectadas para que ocorresse a formação de corpúsculos lipídicos, uma vez que, tanto células infectadas quanto não infectadas apresentaram número aumentado destas estruturas, sugerindo um mecanismo independente da fagocitose do patógeno para a formação de corpúsculos lipídicos. Além disso, macrófagos que fagocitaram partículas de látex, *M. smegmatis* ou *B. subtilis in vitro* não formaram corpúsculos lipídicos. Novamente, estes dados demonstraram que a fagocitose não é suficiente ou essencial para a formação de corpúsculos lipídicos. Além disso, trabalhos demonstram que na infecção por micobactérias pode ocorrer transferência de lipídios bacterianos (Russell, 2003; Russell et al., 2002) para células não infectadas, ou ainda, citocinas e outros mediadores podem agir paracrinamente para a formação de corpúsculos lipídicos.

Embora estudos tenham demonstrado que citocinas e quimiocinas, como MCP-1/CCL2, parecem mediar a migração de células e a formação de corpúsculos lipídicos na resposta inflamatória induzida na reação alérgica ou por LDL (Silva et al., 2002; Vieira-de-Abreu et al., 2005), nossos resultados demonstraram que tanto MCP-1/CCL2, quanto IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  não estão envolvidos no mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos na infecção por BCG. Dados semelhantes foram obtidos na migração celular na infecção por BCG; animais deficientes de MCP-1/CCL2, IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  apresentaram o mesmo perfil de migração de macrófagos, neutrófilos; exceto pelo fato de que os animais deficientes de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  tiveram maior migração de eosinófilos que animais normais. Realmente, a literatura demonstra que animais deficientes de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são mais susceptíveis à infecção, podendo apresentar resposta inflamatória exacerbada (Cooper et al., 1993; Erb et al., 1999).

Entretanto, nossos resultados demonstraram que tanto no mecanismo de migração de eosinófilos, quanto de formação de corpúsculos lipídicos nestas células foi observado envolvimento de eotaxina, uma importante quimiocina na migração de eosinófilos (Rothenberg, 1999). Isto se deve porque o tratamento

com anticorpos neutralizantes da eotaxina endógena e do seu receptor, o CCR3, inibiram quase que totalmente a formação de corpúsculos lipídicos e o influxo de eosinófilos induzidos pela infecção por BCG *in vivo*, indicando que a eotaxina endógena atua via CCR3 para a formação de corpúsculos lipídicos em eosinófilos inflamatórios. Dados semelhantes foram demonstrados em trabalhos anteriores num modelo de resposta inflamatória alérgica (Bandeira-Melo et al., 1999; Vieira-de-Abreu et al., 2005). No entanto, a eotaxina não teve efeito algum no mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos e neutrófilos durante a infecção por BCG.

Posteriormente, procuramos investigar o papel do reconhecimento de padrões moleculares nos mecanismos de ativação celular e formação de corpúsculos lipídicos na infecção por patógenos intracelulares. Diferentes membros da família de receptores do tipo *Toll* (TLR) têm sido implicados no reconhecimento de antígenos micobacterianos, dentre eles: TLR2, TLR-4, TLR-6 e TLR-1 (Sugawara et al., 2003; Takeuchi et al., 2002; Wieland et al., 2004). Vários trabalhos têm descrito a ativação celular via TLR2 por lipoglicanas da parede celular micobacteriana como, por exemplo, o LAM (Gilleron et al., 2003; Means et al., 1999), sugerindo que TLR2 tem participação crucial na resposta inata contra micobactérias. Trabalhos também demonstram um importante papel para os receptores do tipo “toll”, tanto TLR2 no reconhecimento ao *T. cruzi* (para revisar (Andrade and Andrews, 2005).

Nossos resultados demonstraram que a formação de corpúsculos lipídicos induzida por BCG foi drasticamente inibida em macrófagos, eosinófilos e neutrófilos de animais deficientes para o receptor TLR2, mas não em animais deficientes de TLR4. Além disso, a produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos, tanto *in vivo*, quanto *in vitro* também foi inibida em animais deficientes de TLR2. Na infecção *in vitro* por *T. cruzi* obtivemos resultados semelhantes, com total inibição da formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais de animais deficientes de TLR2.

De mesma maneira, observamos que em animais deficientes de TLR2 houve total inibição do influxo de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos durante infecção por BCG em comparação com animais normais, enquanto que nenhuma diferença significativa foi observada em animais deficientes de TLR4, demonstrando que a migração destes três tipos celulares é dependente de reconhecimento e ativação via TLR2.

Em camundongos infectados por BCG trabalhos demonstraram que o recrutamento de eosinófilos foi dependente de leucotrienos, PAF, NO e IL-5 (Menezes-de-Lima-Junior et al., 1997). Nossos dados mostraram que em animais deficientes de TLR2 houve total inibição da síntese de IL-5, tanto *in vivo* (cavidade torácica), quanto na infecção de macrófagos por BCG *in vitro*. Estes dados demonstram que TLR2 participa na sinalização celular para a secreção de IL-5 tanto na infecção *in vivo* quanto *in vitro* por BCG.

Concomitantemente, nós analisamos o envolvimento de TLR2 na secreção de eotaxina. Notavelmente, observamos que durante a infecção de macrófagos por BCG *in vitro* houve total inibição da síntese de eotaxina pelas células de animais deficientes de TLR2. Estes resultados demonstram que a inibição da migração de eosinófilos em animais deficientes de TLR2 também parece estar relacionada com a inibição da síntese de eotaxina induzida por BCG.

De forma geral, estes dados demonstram que TLR2 está envolvido no reconhecimento e ativação celular tanto na infecção por BCG quanto por *T. cruzi*. Este receptor participa especialmente modulando a formação de corpúsculos lipídicos nos diferentes tipos celulares, bem como modulando a secreção de citocinas e de PGE<sub>2</sub>.

Weller e colaboradores (Weller et al., 1989) demonstraram que pequenos corpúsculos lipídicos de neutrófilos de pacientes com adenocarcinoma primário de pulmão fundiam-se uns com os outros formando estruturas bem maiores, ocupando grande parte do citoplasma da célula. Outros trabalhos também demonstraram que, em processos inflamatórios, como na artrite reumatóide, artrite infecciosa e psoríase, o tamanho e o número de corpúsculos aumentavam nas células de pacientes, em comparação com as células de doadores sadios (Beil et al., 1995; Coimbra and Lopes-Vaz, 1971; Schlesinger et al., 1982; Weinstein, 1980). No estudo ultra-estrutural, observamos o mesmo comportamento com o decorrer da infecção por micobactérias e em macrófagos inflamatórios no coração de animais infectados por *T. cruzi*. Pequenos corpúsculos lipídicos mostravam-se próximos uns dos outros, indicando uma tendência de fusão dessas estruturas para formar estruturas maiores. Além disso, observamos alguns corpúsculos lipídicos com imagens sugestivas de brotamento, apontando a formação de um novo corpúsculo lipídico a partir de um outro já formado. Por outro lado, esse aspecto morfológico também pode representar a mobilização do conteúdo do corpúsculo lipídico. Os achados de que a fagocitose

pode provocar a liberação de espécies derivadas do ácido araquidônico (Scott et al., 1982), sugerem que metabólitos lipídicos liberados durante a fagocitose em macrófagos podem ser derivados de corpúsculos lipídicos.

Os corpúsculos lipídicos têm sido implicados como importantes sítios de estoque de ácido araquidônico nas células. Além disso, a literatura tem demonstrado que os corpúsculos lipídicos são estruturas ricas em ácido palmítico, metilcolina ou minositol (Dvorak et al., 1983; Dvorak et al., 1992; Weller et al., 1989; Weller et al., 1999; Weller and Dvorak, 1985). A utilização do ácido araquidônico estocado em corpúsculos lipídicos tem sido investigada, porém não se sabe ao certo os mecanismos intracelulares de mobilização dos lipídios e de proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos (Bozza and Bandeira-Melo, 2005). Numa perspectiva diferente, os corpúsculos lipídicos poderiam funcionar como um compartimento para a rápida mobilização de ácido araquidônico (AA), com efeito potencialmente benéfico para a célula hospedeira, uma vez que foi demonstrado que o AA exerce funções importantes como induzir apoptose de macrófagos infectados favorecendo a maturação de fagossomos e aumentando o efeito microbicida destas células (Anes et al., 2003; Duan et al., 2001).

A hipótese de que os corpúsculos lipídicos formados por BCG e por *T. cruzi* funcionam como um novo domínio intracelular para a síntese regulada de eicosanóides é suportada por diferentes evidências. Primeiro, os corpúsculos lipídicos induzidos por BCG e por *T. cruzi* são sítios de localização de enzimas relacionadas com a síntese de eicosanóides como a COX-2. Segundo, nestes estudos nós observamos significativa correlação entre formação de corpúsculos lipídicos e síntese aumentada de PGE<sub>2</sub> no sítio inflamatório em ambas as infecções. Além disso, leucócitos que apresentaram número aumentado de corpúsculos lipídicos mostraram-se primados para a produção de grandes quantidades de PGE<sub>2</sub>, quando re-estimulados com concentração submáxima de ionóforo de cálcio, sugerindo que os corpúsculos lipídicos são estruturas envolvidas na resposta aguda com participação direta na produção de mediadores inflamatórios *in vivo*.

A avaliação direta dos sítios intracelulares de eicosanóides é complexa, uma vez que estes mediadores não são estocados e são rapidamente liberados, quando de sua síntese após estimulação. Recentemente, uma nova estratégia foi descrita para detectar LTC<sub>4</sub> por imunofluorescência no seu sítio de síntese em eosinófilos estimulados (Bandeira-Melo et al., 2001b; Vieira-de-Abreu et al., 2005).

Adaptando esta técnica para investigar a síntese intracelular de prostaglandina em leucócitos inflamatórios *in vivo*, nós demonstramos que corpúsculos lipídicos induzidos por BCG são os principais domínios para a síntese de PGE<sub>2</sub>. Esta foi a primeira demonstração direta da compartimentalização intracelular da formação de prostaglandina em condições inflamatórias *in vivo*.

Nossos resultados demonstram que corpúsculos lipídicos funcionam como sítios específicos para a formação de eicosanóides. Nesta mesma linha, Rangel Moreno e colaboradores (Rangel Moreno et al., 2002) demonstraram que macrófagos espumosos (“foamy”) identificados em regiões pulmonares de camundongos infectados por *M. tuberculosis* estavam extremamente positivos para imunolocalização de COX-2 e PGE<sub>2</sub> sintetase.

A capacidade aumentada de macrófagos em sintetizar PGE<sub>2</sub> durante infecção por BCG através da indução de corpúsculos e compartimentalização da produção de eicosanóides parece contribuir para o mecanismo que patógenos intracelulares desenvolveram para sobreviver na célula hospedeira. Além disso, PGE<sub>2</sub> em altas concentrações é um potente inibidor de respostas de perfil Th1 e produção de TNF- $\alpha$  e NO (Betz and Fox, 1991; Renz et al., 1988). Para investigar o efeito de antiinflamatórios não esteróidais na formação de corpúsculos lipídicos na síntese de PGE<sub>2</sub>, realizamos o tratamento com aspirina ou NS-398. Interessantemente, ambos antiinflamatórios inibiram a síntese de corpúsculos lipídicos e conseqüentemente, a síntese de PGE<sub>2</sub>. Com o efeito da inibição da produção de PGE<sub>2</sub> observamos ativação de uma resposta pró-inflamatória com síntese aumentada de TNF $\alpha$  e a drástica inibição da geração IL-10 induzida por BCG. Em concordância, altos níveis de PGE<sub>2</sub> favorecem o crescimento do patógeno, um fenômeno que pode ser revertido com tratamento com inibidores de COX-2 (Freire-de-Lima et al., 2000; Rangel Moreno et al., 2002).

Além disso, a síntese aumentada de prostaglandina correlacionou-se com formação de corpúsculos lipídicos tanto em macrófagos peritoneais de ratas infectadas *in vivo*, quanto em macrófagos murinos infectados *in vitro* por *T. cruzi*. A geração aumentada de eicosanóides tem sido identificada na infecção por *T. cruzi* em diversos trabalhos, e tanto leucotrieno quanto prostaglandina parecem exercer papel importante na patogênese da doença de Chagas (Borges et al., 1998; Celentano et al., 1995; Freire-de-Lima et al., 2000; Pinge-Filho et al., 1999; Talvani et al., 2002). Além disso, macrófagos peritoneais são importantes células envolvidas na produção de PGE<sub>2</sub> durante a infecção por *T. cruzi* (Borges et al.,



1998; Celentano et al., 1995; Freire-de-Lima et al., 2000; Pinge-Filho et al., 1999; Talvani et al., 2002) e, similarmente ao que foi demonstrado na infecção por BCG, durante a infecção *in vitro* por *T. cruzi* os corpúsculos lipídicos de macrófagos foram sítios de compartimentalização de COX-2 e PGE<sub>2</sub> recém-sintetizada.

De maneira interessante, como visto anteriormente, corpúsculos lipídicos de animais infectados por BCG estão freqüentemente em proximidade com fagossomos contendo micobactérias, com imagens sugestivas de interação entre estas organelas. Da mesma forma, na infecção por *T. cruzi* em ratas os corpúsculos lipídicos são identificados em interação com fagossomos em macrófagos inflamatórios no coração (Melo et al., 2003).

Embora o significado da interação entre corpúsculos lipídicos e fagossoma permaneça questionável, levantamos algumas possibilidades intrigantes. Primeiro, os corpúsculos lipídicos poderiam funcionar como estoques de carbono para o crescimento de patógenos. Segundo, estudos recentes em proteoma revelaram uma gama de funções que os corpúsculos lipídicos podem ter. De fato, nos corpúsculos lipídicos não são encontradas somente proteínas envolvidas com o transporte e metabolismo de lipídios, mas também várias pequenas GTPases da família das Rab e quinases; sugerindo que os corpúsculos lipídicos podem ter papel importante no metabolismo lipídicos, tráfego de membranas e sinalização intracelular (Brasaemle et al., 2004; Fujimoto et al., 2004; Imanishi et al., 2004; Liu et al., 2004; Yu et al., 1998; Yu et al., 2000). Além disso, Rab 5, Rab 7 e PI3 quinase, que estão compartimentalizadas em corpúsculos lipídicos, são proteínas importantes no controle da via endocítica e são implicadas no processo de maturação de fagossomos contendo patógenos intracelulares (Fratti et al., 2001; Via et al., 1997).

Além das questões envolvendo os mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos e o seu papel na patogênese da infecção por micobactérias e por *T. cruzi*, investigamos outros aspectos da resposta celular, como fagocitose, apoptose e o seu envolvimento com a formação de corpúsculos lipídicos.

Macrófagos ativados apresentam uma série de alterações morfológicas indicativas de sua ativação. Características ultra-estruturais, tais como, aumento no tamanho e na proporção de organelas e processos citoplasmáticos têm sido consideradas como indicação das atividades microbicida e fagocítica de macrófagos, tanto em humanos como em modelos experimentais sob variadas condições patológicas (Anosa and Kaneko, 1983; el Shewemi et al., 1996; Melo

and Machado, 2001; Takemura et al., 1989). Nossa análise morfológica demonstrou que, na pleurisia induzida por BCG, os macrófagos encontrados na cavidade após 1h de infecção não demonstraram diferenças morfológicas significativas quando comparados aos macrófagos de animais controles, exceto pelo aumento do número de corpúsculos lipídicos. Contudo, observamos que, após 24h de infecção, eles apresentaram mudanças morfológicas marcantes, como aumento no número de vacúolos digestivos, aumento de projeções citoplasmáticas e de organelas (D'Avila et al., 2006). Estas alterações são sinais de que estas células estão ativadas (Anosa and Kaneko, 1983; el Shewemi et al., 1996; Melo and Machado, 2001; Takemura et al., 1989).

Neste mesmo tempo de infecção (24h), observamos grande número de macrófagos com bactérias contidas em fagossomos; diferentemente da primeira hora de infecção, onde grande parte das bactérias fagocitadas encontrava-se em neutrófilos (observação pessoal). Nossos resultados demonstraram que, ao utilizarmos uma concentração de  $3,5 \times 10^5$  bacilos/cavidade, o número de células infectadas após 24h foi menor do que com 1h de infecção. Contudo, a concentração de  $3,5 \times 10^6$  bacilos/cavidade inverteu este comportamento. A elevada carga bacteriana utilizada nestes experimentos poderia ser uma justificativa para o grande número de células contendo bactérias fagocitadas neste tempo de infecção, em comparação com a primeira hora de infecção. A literatura demonstra que os bacilos são rapidamente fagocitados ao chegarem na cavidade torácica (Martin and Chaudhuri, 1952; May and Spagnuolo, 1987). No entanto, a infecção com grandes concentrações de bactéria pode prolongar o tempo até que todos os bacilos possam ser fagocitados pelas células no sítio de infecção.

Os neutrófilos, por serem fagócitos profissionais e se acumularem rapidamente nos sítios inflamatórios, seriam as células que iniciariam a resposta inflamatória na tuberculose (Antony et al., 1985; Kasahara et al., 1998). Experimentos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os neutrófilos são capazes de fagocitar as micobactérias em 30 minutos (Martin and Chaudhuri, 1952; May and Spagnuolo, 1987). Além disso, a literatura tem demonstrado que neutrófilos de pacientes com tuberculose apresentam-se ativados, com maior capacidade fagocítica e de aderência. No modelo de pleurisia induzida por BCG observamos que, com 1h de infecção, estas células apresentaram-se infectadas, confirmando os relatos da literatura que sugerem que os neutrófilos chegam rapidamente aos

sítios inflamatórios, participando na eliminação dos bacilos presentes. Os neutrófilos poderiam atuar por meio da produção de citocinas quimiotáticas para outros leucócitos, levando à amplificação da resposta inflamatória (Antony et al., 1985; Cassatella, 1995).

No estudo ultra-estrutural, após 24h de infecção, neutrófilos com morfologia sugestiva de célula em processo de degeneração foram identificados. Os neutrófilos apresentaram-se com morfologia típica de células em processo avançado de morte por apoptose (Melo, 1999). Estas alterações incluíam distribuição irregular dos grânulos de glicogênio, condensação do citoplasma, matriz citoplasmática mais elétron densa e alterações nucleares (compactação da cromatina). Nas células em estágio mais avançado de degeneração, os grânulos de glicogênio formavam grandes acúmulos no citoplasma. Alguns autores têm demonstrado que esta aglomeração de grânulos de glicogênio é um indicativo de que a célula está em processo de morte (Melo and Machado, 1998; Robinson et al., 1982). Melo e colaboradores (Melo and Machado, 1998) demonstraram cardiomiócitos infectados por *Trypanossoma cruzi* apresentando grande aglomeração de partículas de glicogênio, condensação do citoplasma e condensação da cromatina nuclear. Frequentemente, neutrófilos com estas características foram localizados dentro de fagossomos no citoplasma de macrófagos durante infecção por BCG. Estes neutrófilos, que frequentemente exibiam bactérias fagocitadas, apresentaram-se com morfologia de estágio avançado de morte celular (Melo, 1999; Robinson et al., 1982). Nosso estudo ressalta ainda a ocorrência de imagens sugestivas de corpos apoptóticos de neutrófilos, dentro dos macrófagos.

A associação entre macrófagos e neutrófilos na inflamação tem sido discutida e acredita-se que os neutrófilos avidamente fagocitam agentes infecciosos, contudo são pouco eficientes em destruir o bacilo e morreriam por apoptose. Estes neutrófilos seriam então fagocitados por macrófagos. Antony e colaboradores (Antony et al., 1985) também observaram neutrófilos infectados no citoplasma de macrófagos pleurais de coelhos infectados por BCG. O significado desta relação entre neutrófilos que rapidamente fagocitam os bacilos e morrem por apoptose, ou corpos apoptóticos que são fagocitados por macrófagos tem sido investigado.

A fagocitose de células apoptóticas é um processo fisiológico que previne a inflamação e o dano de tecidos, pela remoção de células mortas. Fadok e

colaboradores (Fadok et al., 1998b) demonstraram que macrófagos avidamente engolfam e digerem células apoptóticas prevenindo a liberação do conteúdo intracelular e subsequente inflamação do tecido. Por outro lado, ocorre a indução de uma resposta antiinflamatória, com secreção de PGE<sub>2</sub> e TGF-β<sub>1</sub>, mediadores envolvidos na desativação de macrófagos (Gomes et al., 2000; Lopes et al., 2000; Ribeiro-Gomes et al., 2004).

Alguns trabalhos também sugerem que a morte de células T por apoptose, após infecção por BCG, pode ser um importante componente indicativo da resposta imune deficiente em hospedeiros susceptíveis (Kremer et al., 2000; Mendez-Samperio et al., 2000). Por outro lado, apoptose de monócitos humanos tem sido apontada como um importante mecanismo para limitar o crescimento intracelular de BCG (Kremer et al., 1997; Molloy et al., 1994) e *M. avium in vitro* (Mendez-Samperio et al., 2000). Recentemente, tem-se demonstrado que a morte celular por apoptose de macrófagos alveolares infectados por *M. tuberculosis*, pode facilitar a função efetiva anti-*M. tuberculosis* por parte do hospedeiro (Keane et al., 1997). Contudo, o significado funcional da fagocitose de células apoptóticas por macrófagos tem sido associado com o processo de desativação de macrófagos.

Tanto na infecção por micobactérias, quanto na infecção por *T. cruzi* é identificada intensa apoptose celular (Keane et al., 1997; Kremer et al., 2000; Lopes and DosReis, 2000; Mendez-Samperio et al., 2000; Molloy et al., 1994). Na infecção por *T. cruzi* a interação de células apoptóticas, mas não de necróticas, com macrófagos murinos infectados favorece o crescimento do parasita, num mecanismo dependente de síntese de PGE<sub>2</sub> e TGF-β (Freire-de-Lima et al., 2000). Em macrófagos humanos, da mesma forma que Freire-de-Lima e col. (Freire-de-Lima et al., 2000) observaram que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos favoreceu o crescimento do parasita, e o tratamento com inibidores de COX, como a aspirina e o celecoxib reverteram o aumento da replicação do parasita. Isto ocorreu por inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> induzida pelo co-cultivo de células apoptóticas com macrófagos infectados por *T. cruzi*.

De forma semelhante, na infecção por *Leishmania major* os neutrófilos são capazes de controlar a replicação do parasita em camundongos resistentes. No entanto, em animais susceptíveis, a interação de macrófagos com neutrófilos apoptóticos exarceba a replicação do parasita em através da produção de TGF-β e PGE<sub>2</sub> (Ribeiro-Gomes et al., 2004).

Nós procuramos então investigar se os corpúsculos lipídicos poderiam estar envolvidos neste mecanismo de síntese aumentada de PGE<sub>2</sub> induzida por células apoptóticas.

Nossos dados demonstraram que o co-cultivo de macrófagos com células apoptóticas induziu a formação de corpúsculos lipídicos, enquanto que células necróticas e vivas não exerceram nenhum efeito. Além disso, o aumento de corpúsculos lipídicos foi acompanhado por aumento na síntese de PGE<sub>2</sub>. Interessantemente, a fagocitose de células apoptóticas foi capaz de potenciar os efeitos tanto da infecção por BCG, quanto por *T. cruzi*, na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE<sub>2</sub>. Estes dados foram comprovados *in vivo*, quando a apoptose de neutrófilos induzida pela infecção por BCG foi revertida pelo pré-tratamento com Zvad (inibidor de caspase). Além de inibir significativamente a apoptose de neutrófilos, o tratamento com Zvad inibiu parcialmente a formação de corpúsculos lipídicos e a síntese de PGE<sub>2</sub> no sítio inflamatório. Estes resultados demonstram que a fagocitose de células apoptóticas age em colaboração com a infecção induzindo formação corpúsculos lipídicos e síntese de PGE<sub>2</sub>.

Diversos dados suportam a nossa hipótese que os efeitos das células apoptóticas em macrófagos se dão através da formação de corpúsculos lipídicos. Primeiro, células apoptóticas foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos *in vitro* independente de infecção. Segundo, tanto COX-2, quanto PGE<sub>2</sub> foram co-localizadas em corpúsculos lipídicos induzidos pela fagocitose de células apoptóticas. Além disso, a formação aumentada de corpúsculos lipídicos coincidiu com aumento na expressão de COX-2 e aumento na replicação de *T. cruzi*.

Estudos prévios apontam para o papel do receptor de vitronectina na ingestão de células apoptóticas (Savill et al., 1990; Savill et al., 1992)). Além disso, o reconhecimento de células apoptóticas via receptor de vitronectina levou à secreção da citocina TGF- $\beta$  e de PGE<sub>2</sub>, causando desativação dos macrófagos e tornando-os permissivos à infecção por *T. cruzi* (Freire-de-Lima et al., 2000). Nossos resultados demonstraram que o “crosslink” com anticorpos anti-receptor de vitronectina foi capaz de mimetizar o efeito de células apoptóticas na formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE<sub>2</sub>, expressão de COX e replicação de *T. cruzi*. Para confirmar o papel do receptor de vitronectina neste mecanismo, macrófagos foram pré-tratados com a desintegrina flavoridina. A flavoridina é um

peptídeo de baixo peso molecular, rica em resíduos de cisteína e com grande afinidade para imobilizar  $\alpha_v\beta_3$  em ensaios de fase sólida, e que inibe significativamente a adesão por vitronectina (Juliano et al., 1996). Neste estudo observamos que a flavoridina inibiu tanto a formação de corpúsculos lipídicos, quanto a expressão de COX-2, confirmando o papel do reconhecimento de células apoptóticas via receptor de vitronectina nos mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos.

Freire-de-Lima e colaboradores (Freire-de-Lima et al., 2000) demonstraram que a desativação de macrófagos por fagocitose de células apoptóticas ocorre também por síntese de TGF- $\beta$ . De forma interessante, observamos, pela primeira vez, que TGF- $\beta$  é capaz de induzir corpúsculos lipídicos e que o efeito de células apoptóticas na formação de corpúsculos lipídicos pode ser revertido com anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$  endógeno. Estes dados demonstram que o TGF- $\beta$  produzido pela fagocitose de células apoptóticas pode atuar paracrinamente modulando a formação de corpúsculos lipídicos.

Nós também investigamos a relação de receptores nucleares, como PPAR- $\gamma$ , (receptor ativador da proliferação de peroxissomos), no mecanismo de formação de corpúsculos lipídicos induzido por células apoptóticas. Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de fatores transcricionais que, após ativação pelos seus ligantes, regulam diversos aspectos da regulação, desenvolvimento, homeostasia e funções imunes (Francis et al., 2003). Vários membros da superfamília dos receptores nucleares têm mostrado ter um importante papel fisiológico em macrófagos (Chawla et al., 2001a; Chawla et al., 2001b; Chinetti et al., 2000; Ricote and Glass, 2001). Os PPARs exercem papel-chave na resposta de proliferação de peroxissomos, mas atualmente vários trabalhos têm associado os PPARs como reguladores do metabolismo de lipídios e lipoproteínas, homeostasia da glicose e diferenciação celular (Chinetti et al., 2000; Welch et al., 2003). Particularmente o PPAR- $\gamma$  é encontrado em muitos tipos celulares, porém especialmente em adipócitos e macrófagos, onde parece exercer papel importante no desenvolvimento de tecido adiposo e no influxo e efluxo de colesterol nas células (Henson, 2003; Lee and Evans, 2002; Nagy et al., 1998; Tontonoz, 1998). Procuramos então investigar se PPAR - $\gamma$  participava do mecanismo de formação de corpúsculos lipídico pelos seguintes motivos: a ativação de PPAR  $\gamma$  induz a

expressão de CD36 (Kavanagh et al., 2003; Nicholson, 2004; Tontonoz, 1998) um importante receptor de células apoptóticas em macrófagos, induz a formação de células espumosas (“foamy cells”) (Nagy et al., 1998) e potencializa efeitos antiinflamatórios em macrófagos (Henson, 2003; Welch et al., 2003).

Na literatura atual não são encontramos relatos referentes à ativação de PPAR- $\gamma$  durante infecção por *T.cruzi*. No entanto, Almeida e col. (em preparação) têm demonstrado que PPAR- $\gamma$  apresenta importante papel na resposta à infecção por BCG. O uso do agonista (BRL 49853) e do antagonista (GW 9662) para este receptor mostraram a capacidade de, respectivamente, potenciar ou inibir a formação de corpúsculos, produção de PGE<sub>2</sub> e NO na infecção por BCG. Além disso, De Assis e col. (de Assis et al., 2003) constataram que o PPAR- $\gamma$  está envolvido em reações pró-inflamatórias e também relacionado com a formação de corpúsculos lipídicos. Estudos realizados por Nagy e col. (Nagy et al., 1998) e De Assis (de Assis et al., 2003) sugerem que ativação de PPAR- $\gamma$  leva ao acúmulo intracelular de lipídios.

Interessantemente, nossos resultados demonstraram que o antagonista de PPAR- $\gamma$ , o GW 9962, foi capaz de reverter os efeitos da fagocitose de células apoptóticas. Ele foi capaz de inibir a formação de corpúsculos lipídicos, síntese de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$  em macrófagos *in vitro*. Estes dados sugerem que ocorre ativação de PPAR- $\gamma$  na sinalização intracelular de macrófagos induzida pela fagocitose de células apoptóticas favorecendo a produção de mediadores anti-inflamatórios como PGE<sub>2</sub>.

Em conclusão, corpúsculos lipídicos formados durante infecções por patógenos intracelulares são domínios celulares especializados, que têm função importante na produção de mediadores inflamatórios, uma vez que a compartimentalização de substratos e de enzimas-chaves dentro de corpúsculos lipídicos tem impacto direto na capacidade da célula em gerar grandes quantidades de eicosanóides. A biogênese de corpúsculos lipídicos durante a infecção por patógenos intracelulares é um processo altamente regulado que é dependente de TLR2 e pode ser modulado pelo reconhecimento de células apoptóticas. De fato, corpúsculos lipídicos são os principais sítios intracelulares de síntese de PGE<sub>2</sub> durante infecções por patógenos intracelulares, tendo implicações na patogênese de infecções tanto micobacterianas, quanto por *T. cruzi*.

## 5- Conclusões

- ✓ As infecções por patógenos intracelulares induziram formação de corpúsculos lipídicos num mecanismo dependente de reconhecimento e sinalização via TLR2. No entanto, a resposta celular a organismos não patogênicos não estimulou a formação de corpúsculos lipídicos.
- ✓ Os corpúsculos lipídicos induzidos foram sítios de enzimas formadoras de eicosanóide e de síntese de PGE<sub>2</sub>, demonstrando que os corpúsculos são sítios de síntese de eicosanóides durante infecções por patógenos intracelulares.
- ✓ A inibição da formação de corpúsculos lipídicos por drogas anti-inflamatórias não esteroidais inibiu a produção de PGE<sub>2</sub> e, conseqüentemente, modulou a síntese de citocinas como TNF $\alpha$  e IL-10 por macrófagos.
- ✓ A migração de eosinófilos e a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos durante a infecção por BCG ocorre num mecanismo dependente de TLR2 e de eotaxina, esta última via ativação de ser receptor CCR3.
- ✓ A fagocitose de células apoptóticas potencia os efeitos da infecção na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . Os mecanismos envolvidos na formação de corpúsculos lipídicos pela fagocitose de células apoptóticas envolve: reconhecimento via receptor de vitronectina, ativação de PPAR $\gamma$  e secreção de TGF- $\beta$ .



## 6 - Referências

- Abel, B., N. Thieblemont, V.J. Quesniaux, N. Brown, J. Mpagi, K. Miyake, F. Bihl, and B. Ryffel. 2002. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 169:3155-62.
- Abrahamsohn, I.A., and R.L. Coffman. 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol.* 84:231-44.
- Akaki, T., K. Sato, T. Shimizu, and H. Tomioka. 2000. [Changes in antibacterial activity of murine peritoneal macrophages against *Mycobacterium tuberculosis* after prolonged in vitro precultivation]. *Kekkaku.* 75:477-82.
- Amer, A.O., and M.S. Swanson. 2002. A phagosome of one's own: a microbial guide to life in the macrophage. *Curr Opin Microbiol.* 5:56-61.
- Andrade, L.O., and N.W. Andrews. 2005. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol.* 3:819-23.
- Anes, E., M.P. Kuhnel, E. Bos, J. Moniz-Pereira, A. Habermann, and G. Griffiths. 2003. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol.* 5:793-802.
- Anosa, V.O., and J.J. Kaneko. 1983. Pathogenesis of *Trypanosoma brucei* infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*). V. Macrophage ultrastructure and function. *Vet Pathol.* 20:617-31.
- Antony, V.B., S.A. Sahn, A.C. Antony, and J.E. Repine. 1985. *Bacillus Calmette-Guerin*-stimulated neutrophils release chemotaxins for monocytes in rabbit pleural spaces and in vitro. *J Clin Invest.* 76:1514-21.
- Araujo-Jorge, T.C., M.J. Lage, M.T. Rivera, Y. Carlier, and F. Van Leuven. 1992. *Trypanosoma cruzi*: enhanced alpha-macroglobulin levels correlate with the resistance of BALB/cj mice to acute infection. *Parasitol Res.* 78:215-21.
- Balcewicz-Sablinska, M.K., J. Keane, H. Kornfeld, and H.G. Remold. 1998. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol.* 161:2636-41.
- Bandeira-Melo, C., P.T. Bozza, and P.F. Weller. 2002a. The cellular biology of eosinophil eicosanoid formation and function. *J Allergy Clin Immunol.* 109:393-400.
- Bandeira-Melo, C., A.S. Calheiros, P.M. Silva, R.S. Cordeiro, M.M. Teixeira, and M.A. Martins. 1999. Suppressive effect of distinct bradykinin B2 receptor antagonist on allergen-evoked exudation and leukocyte infiltration in sensitized rats. *Br J Pharmacol.* 127:315-20.
- Bandeira-Melo, C., A. Herbst, and P.F. Weller. 2001a. Eotaxins. Contributing to the diversity of eosinophil recruitment and activation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 24:653-7.
- Bandeira-Melo, C., M. Phoofolo, and P.F. Weller. 2001b. Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils. *J Biol Chem.* 276:22779-87.
- Bandeira-Melo, C., M.F. Serra, B.L. Diaz, R.S. Cordeiro, P.M. Silva, H.L. Lenzi, Y.S. Bakhle, C.N. Serhan, and M.A. Martins. 2000. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 and lipoxin A4 accelerate resolution of allergic edema in *Angiostrongylus costaricensis*-infected rats: relationship with concurrent eosinophilia. *J Immunol.* 164:1029-36.

- Bandeira-Melo, C., K. Sugiyama, L.J. Woods, M. Phoofolo, D.M. Center, W.W. Cruikshank, and P.F. Weller. 2002b. IL-16 promotes leukotriene C(4) and IL-4 release from human eosinophils via CD4- and autocrine CCR3-chemokine-mediated signaling. *J Immunol.* 168:4756-63.
- Bartemes, K.R., S. McKinney, G.J. Gleich, and H. Kita. 1999. Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG. *J Immunol.* 162:2982-9.
- Bauldry, S.A., C.E. McCall, S.L. Cousart, and D.A. Bass. 1991. Tumor necrosis factor-alpha priming of phospholipase A2 activation in human neutrophils. An alternative mechanism of priming. *J Immunol.* 146:1277-85.
- Beatty, W.L., E.R. Rhoades, D.K. Hsu, F.T. Liu, and D.G. Russell. 2002. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. *Cell Microbiol.* 4:167-76.
- Beatty, W.L., E.R. Rhoades, H.J. Ullrich, D. Chatterjee, J.E. Heuser, and D.G. Russell. 2000. Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic.* 1:235-47.
- Beatty, W.L., H.J. Ullrich, and D.G. Russell. 2001. Mycobacterial surface moieties are released from infected macrophages by a constitutive exocytic event. *Eur J Cell Biol.* 80:31-40.
- Beil, W.J., P.F. Weller, M.A. Peppercorn, S.J. Galli, and A.M. Dvorak. 1995. Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease. *J Leukoc Biol.* 58:284-98.
- Betz, M., and B.S. Fox. 1991. Prostaglandin E2 inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines. *J Immunol.* 146:108-13.
- Betz, S.J., and P.M. Henson. 1980. Production and release of platelet-activating factor (PAF); dissociation from degranulation and superoxide production in the human neutrophil. *J Immunol.* 125:2756-63.
- Blanchette-Mackie, E.J., N.K. Dwyer, T. Barber, R.A. Coxey, T. Takeda, C.M. Rondinone, J.L. Theodorakis, A.S. Greenberg, and C. Londos. 1995. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res.* 36:1211-26.
- Boatright, K.M., and G.S. Salvesen. 2003. Caspase activation. *Biochem Soc Symp:*233-42.
- Bone, R.C. 1993. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev.* 6:57-68.
- Bonecini-Almeida, M.G., J.L. Ho, N. Boechat, R.C. Huard, S. Chitale, H. Doo, J. Geng, L. Rego, L.C. Lazzarini, A.L. Kritski, W.D. Johnson, Jr., T.A. McCaffrey, and J.R. Silva. 2004. 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.* 72:2628-34.
- Borges, M.M., J.K. Kloetzel, H.F. Andrade, Jr., C.E. Tadokoro, P. Pinge-Filho, and I. Abrahamsohn. 1998. Prostaglandin and nitric oxide regulate TNF-alpha production during Trypanosoma cruzi infection. *Immunol Lett.* 63:1-8.
- Boutard, V., R. Havouis, B. Fouqueray, C. Philippe, J.P. Moulinoux, and L. Baud. 1995. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol.* 155:2077-84.
- Bozza, P.T., and C. Bandeira-Melo. 2005. Mechanisms of Leukocyte Lipid Body Formation and Function in Inflammation. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100:113-120.
- Bozza, P.T., H.C. Castro-Faria-Neto, A.R. Silva, A.P. Lorangeira, P.M. Silva, M.A. Martins, and R.S. Cordeiro. 1994. Lipopolysaccharide-induced pleural

- neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol.* 270:143-9.
- Bozza, P.T., J.L. Payne, J.L. Goulet, and P.F. Weller. 1996a. Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids. *J Exp Med.* 183:1515-25.
- Bozza, P.T., J.L. Payne, S.G. Morham, R. Langenbach, O. Smithies, and P.F. Weller. 1996b. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11091-6.
- Bozza, P.T., W. Yu, J. Cassara, and P.F. Weller. 1998. Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects. *J Leukoc Biol.* 64:563-9.
- Bozza, P.T., W. Yu, J.F. Penrose, E.S. Morgan, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 1997a. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. *J Exp Med.* 186:909-20.
- Bozza, P.T., W. Yu, and P.F. Weller. 1997b. Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92 Suppl 2:135-40.
- Brasaemle, D.L., T. Barber, N.E. Wolins, G. Serrero, E.J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1997. Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *J Lipid Res.* 38:2249-63.
- Brasaemle, D.L., G. Dolios, L. Shapiro, and R. Wang. 2004. Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes. *J Biol Chem.* 279:46835-42.
- Brasaemle, D.L., B. Rubin, I.A. Harten, J. Gruia-Gray, A.R. Kimmel, and C. Londos. 2000. Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem.* 275:38486-93.
- Brener, B.J., and N.P. Couch. 1973. Peripheral arterial complications of left heart catheterization and their management. *Am J Surg.* 125:521-6.
- Brener, Z. 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 27:347-82.
- Carvalho de Sousa, J.P., M. Bachelet, and N. Rastogi. 1992. Effect of indomethacin on the modulation of *Mycobacterium avium* growth in human macrophages by interferon gamma, retinoic acid and 1,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub>. *FEMS Microbiol Immunol.* 4:281-6.
- Cassatella, M.A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today.* 16:21-6.
- Celentano, A.M., and S.M. Gonzalez Cappa. 1993. In vivo macrophage function in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Acta Trop.* 55:171-80.
- Celentano, A.M., G. Gorelik, M.E. Solana, L. Sterin-Borda, E. Borda, and S.M. Gonzalez Cappa. 1995. PGE<sub>2</sub> involvement in experimental infection with *Trypanosoma cruzi* subpopulations. *Prostaglandins.* 49:141-53.
- Chagas, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1:159-218.
- Chang, S.W., C.O. Feddersen, P.M. Henson, and N.F. Voelkel. 1987. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest.* 79:1498-509.
- Chawla, A., Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, and R.M. Evans. 2001a. PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat Med.* 7:48-52.

- Chawla, A., W.A. Boisvert, C.H. Lee, B.A. Laffitte, Y. Barak, S.B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P.A. Edwards, L.K. Curtiss, R.M. Evans, and P. Tontonoz. 2001b. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 7:161-71.
- Chen, J.S., A.S. Greenberg, and S.M. Wang. 2002. Oleic acid-induced PKC isozyme translocation in RAW 264.7 macrophages. *J Cell Biochem*. 86:784-91.
- Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels. 2000. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res*. 49:497-505.
- Christie, P.E., and W.R. Henderson, Jr. 2002. Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin Allergy Immunol*. 16:233-54.
- Clouston, W.M., and J.F. Kerr. 1985. Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections. *Med Hypotheses*. 18:399-404.
- Coimbra, A., and A. Lopes-Vaz. 1971. The presence of lipid droplets and the absence of stable sudanophilia in osmium-fixed human leukocytes. *J Histochem Cytochem*. 19:551-7.
- Cooper, A.M., D.K. Dalton, T.A. Stewart, J.P. Griffin, D.G. Russell, and I.M. Orme. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. 178:2243-7.
- Cui, Z., J.E. Vance, M.H. Chen, D.R. Voelker, and D.E. Vance. 1993. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem*. 268:16655-63.
- Dannenberg, A.M., Jr. 1994. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology*. 191:461-73.
- D'Avila, H., R.C. Melo, G.G. Parreira, E. Werneck-Barroso, H.C. Castro Faria Neto, and P.T. Bozza. 2006. Mycobacterium bovis BCG induces TLR 2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology*. 176:3087-3097.
- de Assis, E.F., A.R. Silva, L.F. Caiado, G.K. Marathe, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, T.M. McIntyre, P.T. Bozza, and H.C. de Castro-Faria-Neto. 2003. Synergism between platelet-activating factor-like phospholipids and peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists generated during low density lipoprotein oxidation that induces lipid body formation in leukocytes. *J Immunol*. 171:2090-8.
- Devitt, A., O.D. Moffatt, C. Raykundalia, J.D. Capra, D.L. Simmons, and C.D. Gregory. 1998. Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*. 392:505-9.
- Dibbert, B., M. Weber, W.H. Nikolaizik, P. Vogt, M.H. Schoni, K. Blaser, and H.U. Simon. 1999. 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*. 96:13330-5.
- DosReis, G.A., and M.A. Barcinski. 2001. Apoptosis and parasitism: from the parasite to the host immune response. *Adv Parasitol*. 49:133-61.
- Downing, J.F., R. Pasula, J.R. Wright, H.L. Twigg, 3rd, and W.J. Martin, 2nd. 1995. Surfactant protein a promotes attachment of Mycobacterium tuberculosis to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:4848-52.
- Duan, L., H. Gan, J. Arm, and H.G. Remold. 2001. Cytosolic phospholipase A2 participates with TNF-alpha in the induction of apoptosis of human

- macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *J Immunol.* 166:7469-76.
- Duvall, E., A.H. Wyllie, and R.G. Morris. 1985. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology.* 56:351-8.
- Dvorak, A.M., H.F. Dvorak, S.P. Peters, E.S. Shulman, D.W. MacGlashan, Jr., K. Pyne, V.S. Harvey, S.J. Galli, and L.M. Lichtenstein. 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol.* 131:2965-76.
- Dvorak, A.M., E. Morgan, R.P. Schleimer, S.W. Ryeom, L.M. Lichtenstein, and P.F. Weller. 1992. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes, and neutrophils. *J Histochem Cytochem.* 40:759-69.
- Dvorak, A.M., E.S. Morgan, D.M. Tzizik, and P.F. Weller. 1994. Prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase): ultrastructural localization to nonmembrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human eosinophils and 3T3 fibroblasts. *Int Arch Allergy Immunol.* 105:245-50.
- Dvorak, A.M., P.F. Weller, V.S. Harvey, E.S. Morgan, and H.F. Dvorak. 1993. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. *Int Arch Allergy Immunol.* 101:136-42.
- Dvorak, J.A., and T.P. Hyde. 1973. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. 1. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol.* 34:268-83.
- el Shewemi, S., F. al-Shammary, F. al-Zamel, and R. Soliman. 1996. Ultrastructure of resting and rh-GM-CSF-treated human macrophages derived from blood monocytes. *J Electron Microsc (Tokyo).* 45:388-94.
- el-Ahmady, O., M. Mansour, H. Zoeir, and O. Mansour. 1997. Elevated concentrations of interleukins and leukotriene in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Ann Clin Biochem.* 34 ( Pt 2):160-4.
- Ellner, J.J., and T.M. Daniel. 1979. Immunosuppression by mycobacterial arabinomannan. *Clin Exp Immunol.* 35:250-7.
- Erb, K.J., J. Kirman, B. Delahunt, H. Moll, and G. Le Gros. 1999. Infection of mice with *Mycobacterium bovis*-BCG induces both Th1 and Th2 immune responses in the absence of interferon-gamma signalling. *Eur Cytokine Netw.* 10:147-54.
- Erwig, L.P., S. Gordon, G.M. Walsh, and A.J. Rees. 1999. Previous uptake of apoptotic neutrophils or ligation of integrin receptors downmodulates the ability of macrophages to ingest apoptotic neutrophils. *Blood.* 93:1406-12.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, S.C. Frasch, M.L. Warner, and P.M. Henson. 1998a. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 5:551-62.
- Fadok, V.A., D.L. Bratton, A. Konowal, P.W. Freed, J.Y. Westcott, and P.M. Henson. 1998b. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 101:890-8.

- Fadok, V.A., D.L. Bratton, D.M. Rose, A. Pearson, R.A. Ezekewitz, and P.M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 405:85-90.
- Fadok, V.A., J.S. Savill, C. Haslett, D.L. Bratton, D.E. Doherty, P.A. Campbell, and P.M. Henson. 1992a. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol*. 149:4029-35.
- Fadok, V.A., D.R. Voelker, P.A. Campbell, J.J. Cohen, D.L. Bratton, and P.M. Henson. 1992b. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*. 148:2207-16.
- Fawcett, D.W. 1981. *The cell*. Ed. 2, W.B. Saunders, Philadelphia:655-667.
- Fenton, M.J., and M.W. Vermeulen. 1996. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun*. 64:683-90.
- Flora, P.K., and C.D. Gregory. 1994. Recognition of apoptotic cells by human macrophages: inhibition by a monocyte/macrophage-specific monoclonal antibody. *Eur J Immunol*. 24:2625-32.
- Flynn, J.L., and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 19:93-129.
- Fong, T.H., and S.M. Wang. 1997. Dissection of the signaling mechanism for capsule detachment of lipid droplets in rat adrenocortical cells. *J Cell Biochem*. 65:67-74.
- Fong, T.H., S.M. Wang, and H.S. Lin. 1996. Immunocytochemical demonstration of a lipid droplet-specific capsule in cultured Leydig cells of the golden hamsters. *J Cell Biochem*. 63:366-73.
- Francis, G.A., E. Fayard, F. Picard, and J. Auwerx. 2003. Nuclear receptors and the control of metabolism. *Annu Rev Physiol*. 65:261-311.
- Fratti, R.A., J.M. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera, and V. Deretic. 2001. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol*. 154:631-44.
- Fratti, R.A., I. Vergne, J. Chua, J. Skidmore, and V. Deretic. 2000. Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block. *Electrophoresis*. 21:3378-85.
- Freire-de-Lima, C.G., D.O. Nascimento, M.B. Soares, P.T. Bozza, H.C. Castro-Faria-Neto, F.G. de Mello, G.A. DosReis, and M.F. Lopes. 2000. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*. 403:199-203.
- Frieden, T.R., T.R. Sterling, S.S. Munsiff, C.J. Watt, and C. Dye. 2003. Tuberculosis. *Lancet*. 362:887-99.
- Fujimoto, T., H. Kogo, K. Ishiguro, K. Tauchi, and R. Nomura. 2001. Caveolin-2 is targeted to lipid droplets, a new "membrane domain" in the cell. *J Cell Biol*. 152:1079-85.
- Fujimoto, Y., H. Itabe, J. Sakai, M. Makita, J. Noda, M. Mori, Y. Higashi, S. Kojima, and T. Takano. 2004. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. *Biochim Biophys Acta*. 1644:47-59.
- Galli, C., A. Petroni, and A. Borghi. 1985. Modification of brain vascular eicosanoids after pharmacological treatment and ischemia in the rat: drugs and brain vascular eicosanoids. *Cephalalgia*. 5 Suppl 2:79-81.
- Gao, J., and G. Serrero. 1999. Adipose differentiation related protein (ADRP) expressed in transfected COS-7 cells selectively stimulates long chain fatty acid uptake. *J Biol Chem*. 274:16825-30.

- Gatfield, J., and J. Pieters. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*. 288:1647-50.
- Gaynor, C.D., F.X. McCormack, D.R. Voelker, S.E. McGowan, and L.S. Schlesinger. 1995. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis by a direct interaction with human macrophages. *J Immunol*. 155:5343-51.
- Gazzinelli, R.T., I.P. Oswald, S.L. James, and A. Sher. 1992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J Immunol*. 148:1792-6.
- Gercken, J., J. Pryjma, M. Ernst, and H.D. Flad. 1994. Defective antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis-infected monocytes. *Infect Immun*. 62:3472-8.
- Gilleron, M., V.F. Quesniaux, and G. Puzo. 2003. Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin and mycobacterium tuberculosis H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. *J Biol Chem*. 278:29880-9.
- Gomes, N.A., C.R. Gattass, V. Barreto-De-Souza, M.E. Wilson, and G.A. DosReis. 2000. TGF-beta mediates CTLA-4 suppression of cellular immunity in murine kalaazar. *J Immunol*. 164:2001-8.
- Goren, M.B., P. D'Arcy Hart, M.R. Young, and J.A. Armstrong. 1976. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73:2510-4.
- Greenberg, A.S., J.J. Egan, S.A. Wek, N.B. Garty, E.J. Blanchette-Mackie, and C. Londos. 1991. Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 266:11341-6.
- Greenberg, A.S., J.J. Egan, S.A. Wek, M.C. Moos, Jr., C. Londos, and A.R. Kimmel. 1993. Isolation of cDNAs for perilipins A and B: sequence and expression of lipid droplet-associated proteins of adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90:12035-9.
- Greenspan, P., E.P. Mayer, and S.D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*. 100:965-73.
- Griffin, J.F., C.G. Mackintosh, and G.S. Buchan. 1995. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines. *Trends Microbiol*. 3:418-24.
- Griffith, T.S., X. Yu, J.M. Herndon, D.R. Green, and T.A. Ferguson. 1996. CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*. 5:7-16.
- Hashim, S., K. Mukherjee, M. Raje, S.K. Basu, and A. Mukhopadhyay. 2000. Live Salmonella modulate expression of Rab proteins to persist in a specialized compartment and escape transport to lysosomes. *J Biol Chem*. 275:16281-8.
- Haslett, C. 1999. Granulocyte apoptosis and its role in the resolution and control of lung inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 160:S5-11.
- Heid, H.W., R. Moll, I. Schwetlick, H.R. Rackwitz, and T.W. Keenan. 1998. Adipophilin is a specific marker of lipid accumulation in diverse cell types and diseases. *Cell Tissue Res*. 294:309-21.
- Heldwein, K.A., M.D. Liang, T.K. Andresen, K.E. Thomas, A.M. Marty, N. Cuesta, S.N. Vogel, and M.J. Fenton. 2003. TLR2 and TLR4 serve distinct roles in the host immune response against Mycobacterium bovis BCG. *J Leukoc Biol*. 74:277-86.
- Helms, J.B., and C. Zurzolo. 2004. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*. 5:247-54.

- Henson, P. 2003. Suppression of macrophage inflammatory responses by PPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6295-6.
- Hines, M.E., 2nd, J.M. Kreeger, and A.J. Herron. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Lab Anim Sci.* 45:334-51.
- Hoffmann, P.R., A.M. deCathelineau, C.A. Ogden, Y. Leverrier, D.L. Bratton, D.L. Daleke, A.J. Ridley, V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2001. Phosphatidylserine (PS) induces PS receptor-mediated macropinocytosis and promotes clearance of apoptotic cells. *J Cell Biol.* 155:649-59.
- Hoheisel, G., L. Zheng, H. Teschler, I. Striz, and U. Costabel. 1995. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. *Chest.* 108:1614-6.
- Holm, A., K. Tejle, K.E. Magnusson, A. Descoteaux, and B. Rasmusson. 2001. Leishmania donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol.* 3:439-47.
- Hsueh, W., C. Kuhn, 3rd, and P. Needleman. 1979. Relationship of prostaglandin secretion by rabbit alveolar macrophages to phagocytosis and lysosomal enzyme release. *Biochem J.* 184:345-54.
- Hunter, K.J., S.A. Le Quesne, and A.H. Fairlamb. 1994. Identification and biosynthesis of N1,N9-bis(glutathionyl)aminopropylcadaverine (homotrypanothione) in Trypanosoma cruzi. *Eur J Biochem.* 226:1019-27.
- Huynh, M.L., V.A. Fadok, and P.M. Henson. 2002. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- $\beta$ 1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest.* 109:41-50.
- Imaizumi, T.A., D.M. Stafforini, Y. Yamada, T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman. 1995. Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med.* 238:5-20.
- Imamura, M., T. Inoguchi, S. Ikuyama, S. Taniguchi, K. Kobayashi, N. Nakashima, and H. Nawata. 2002. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 283:E775-83.
- Imanishi, Y., V. Gerke, and K. Palczewski. 2004. Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies. *J Cell Biol.* 166:447-53.
- Issekutz, A.C., and M. Szpejda. 1986. Evidence that platelet activating factor may mediate some acute inflammatory responses. Studies with the platelet-activating factor antagonist, CV3988. *Lab Invest.* 54:275-81.
- Jacobs, F., D. Chaussabel, C. Truyens, V. Leclercq, Y. Carlier, M. Goldman, and B. Vray. 1998. IL-10 up-regulates nitric oxide (NO) synthesis by lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages: improved control of Trypanosoma cruzi infection. *Clin Exp Immunol.* 113:59-64.
- Johnson, M.M., B. Vaughn, M. Triggiani, D.D. Swan, A.N. Fonteh, and F.H. Chilton. 1999. Role of arachidonyl triglycerides within lipid bodies in eicosanoid formation by human polymorphonuclear cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:253-8.
- Jones, B.W., K.A. Heldwein, T.K. Means, J.J. Saukkonen, and M.J. Fenton. 2001. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis.* 60 Suppl 3:iii6-12.
- Juliano, D., Y. Wang, C. Marcinkiewicz, L.A. Rosenthal, G.R. Stewart, and S. Niewiarowski. 1996. Disintegrin interaction with  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin on human umbilical vein endothelial cells: expression of ligand-induced binding site on  $\beta$ 3 subunit. *Experimental Cell Research.* 225:132-142.



- Kaminskaia, G.O., G. Blonskaia, T.O. Omarov, and O.V. Lovacheva. 1993. [Metabolism of prostaglandins in the lungs of patients with various forms of tuberculosis]. *Probl Tuberk*:8-10.
- Kasahara, K., I. Sato, K. Ogura, H. Takeuchi, K. Kobayashi, and M. Adachi. 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*. 178:127-37.
- Kasurinen, J., and P. Somerharju. 1992. Metabolism of pyrenyl fatty acids in baby hamster kidney fibroblasts. Effect of the acyl chain length. *J Biol Chem*. 267:6563-9.
- Kavanagh, I.C., C.E. Symes, P. Renaudin, E. Nova, M.D. Mesa, G. Boukouvalas, D.S. Leake, and P. Yaqoob. 2003. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*. 168:271-82.
- Keane, V.P., N. de Klerk, T. Krieng, G. Hammond, and A.W. Musk. 1997. Risk factors for the development of non-response to first-line treatment for tuberculosis in southern Vietnam. *Int J Epidemiol*. 26:1115-20.
- Kierszenbaum, F., E. Knecht, D.B. Budzko, and M.C. Pizzimenti. 1974. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*. 112:1839-44.
- Kremer, L., J. Estaquier, E. Brandt, J.C. Ameisen, and C. Loch. 1997. *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. *Eur J Immunol*. 27:2450-6.
- Kremer, L., J. Estaquier, I. Wolowczuk, F. Biet, J.C. Ameisen, and C. Loch. 2000. Ineffective cellular immune response associated with T-cell apoptosis in susceptible *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect Immun*. 68:4264-73.
- Kreuger, M.R., D.R. Tames, and M. Mariano. 1998. Expression of NO-synthase in cells of foreign-body and BCG-induced granulomata in mice: influence of L-NAME on the evolution of the lesion. *Immunology*. 95:278-82.
- Krieger, M., and J. Herz. 1994. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem*. 63:601-37.
- Kroemer, G., B. Dallaporta, and M. Resche-Rigon. 1998. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol*. 60:619-42.
- Krutzik, S.R., M.T. Ochoa, P.A. Sieling, S. Uematsu, Y.W. Ng, A. Legaspi, P.T. Liu, S.T. Cole, P.J. Godowski, Y. Maeda, E.N. Sarno, M.V. Norgard, P.J. Brennan, S. Akira, T.H. Rea, and R.L. Modlin. 2003. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*. 9:525-32.
- Kuo, H.P., T.C. Ho, C.H. Wang, C.T. Yu, and H.C. Lin. 1996. Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis. *Tuber Lung Dis*. 77:468-75.
- Lavallee, P.W. 1973. A new fluorescence and Kinyoun's acid-fast stain. *Am J Clin Pathol*. 60:428-9.
- Lee, C.H., and R.M. Evans. 2002. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in macrophage lipid homeostasis. *Trends Endocrinol Metab*. 13:331-5.
- Lehner, R., Z. Cui, and D.E. Vance. 1999. Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J*. 338 ( Pt 3):761-8.
- Leite, M.S., P. Pacheco, R.N. Gomes, A.T. Guedes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.T. Bozza, and V.L.G. Koatz. 2005. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock*. 23.

- Lin, W.W. 1997. Priming effects of lipopolysaccharide on UTP-induced arachidonic acid release in RAW 264.7 macrophages. *Eur J Pharmacol.* 321:121-7.
- Liu, P., Y. Ying, Y. Zhao, D.I. Mundy, M. Zhu, and R.G. Anderson. 2004. Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 279:3787-92.
- Londos, C., D.L. Brasaemle, C.J. Schultz, J.P. Segrest, and A.R. Kimmel. 1999. Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Semin Cell Dev Biol.* 10:51-8.
- Lopes, M.F., and G.A. DosReis. 2000. Experimental Chagas disease: phagocytosis of apoptotic lymphocytes deactivates macrophages and fuels parasite growth. *Apoptosis.* 5:221-4.
- Lopes, M.F., C.G. Freire-de-Lima, and G.A. DosReis. 2000. The macrophage haunted by cell ghosts: a pathogen grows. *Immunol Today.* 21:489-94.
- Lu, B., B.J. Rutledge, L. Gu, J. Fiorillo, N.W. Lukacs, S.L. Kunkel, R. North, C. Gerard, and B.J. Rollins. 1998. Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 187:601-8.
- MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan. 1997a. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol.* 15:323-50.
- MacMicking, J.D., R.J. North, R. LaCourse, J.S. Mudgett, S.K. Shah, and C.F. Nathan. 1997b. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:5243-8.
- Manes, S., G. del Real, and A.C. Martinez. 2003. Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* 3:557-68.
- Marathe, G.K., S.S. Davies, K.A. Harrison, A.R. Silva, R.C. Murphy, H. Castro-Faria-Neto, S.M. Prescott, G.A. Zimmerman, and T.M. McIntyre. 1999. Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem.* 274:28395-404.
- Martin, S., and R.G. Parton. 2005. Caveolin, cholesterol, and lipid bodies. *Semin Cell Dev Biol.* 16:163-74.
- Martin, S.P., and S.N. Chaudhuri. 1952. Effect of bacteria and their products on migration of leukocytes. *Proc Soc Exp Biol Med.* 81:286-8.
- Martinez-Botas, J., J.B. Anderson, D. Tessier, A. Lapillonne, B.H. Chang, M.J. Quast, D. Gorenstein, K.H. Chen, and L. Chan. 2000. Absence of perilipin results in leanness and reverses obesity in *Lepr(db/db)* mice. *Nat Genet.* 26:474-9.
- May, M.E., and P.J. Spagnuolo. 1987. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 55:2304-7.
- McDonald, P.P., V.A. Fadok, D. Bratton, and P.M. Henson. 1999. Transcriptional and translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. *J Immunol.* 163:6164-72.
- McDonough, K.A., Y. Kress, and B.R. Bloom. 1993a. The interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages: a study of phagolysosome fusion. *Infect Agents Dis.* 2:232-5.
- McDonough, K.A., Y. Kress, and B.R. Bloom. 1993b. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun.* 61:2763-73.
- Meagher, L.C., J.S. Savill, A. Baker, R.W. Fuller, and C. Haslett. 1992. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B2. *J Leukoc Biol.* 52:269-73.

- Means, T.K., E. Lien, A. Yoshimura, S. Wang, D.T. Golenbock, and M.J. Fenton. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol.* 163:6748-55.
- Melo, R.C. 1999. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell.* 31:281-90.
- Melo, R.C., H. D'Avila, D.L. Fabrino, P.E. Almeida, and P.T. Bozza. 2003. Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue Cell.* 35:59-67.
- Melo, R.C., and C.R. Machado. 1998. Depletion of radiosensitive leukocytes exacerbates the heart sympathetic denervation and parasitism in experimental Chagas' disease in rats. *J Neuroimmunol.* 84:151-7.
- Melo, R.C., and C.R. Machado. 2001. *Trypanosoma cruzi*: peripheral blood monocytes and heart macrophages in the resistance to acute experimental infection in rats. *Exp Parasitol.* 97:15-23.
- Mendez-Samperio, P., M. Hernandez-Garay, and E. Garcia-Martinez. 2000. Induction of apoptosis in bacillus Calmette-Guerin-activated T cells by transforming growth factor-beta. *Cell Immunol.* 202:103-12.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., and M.d.G. Henriques. 1997. Mechanisms of cell accumulation induced by *Mycobacterium bovis* BCG. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92 Suppl 2:227-32.
- Menezes-de-Lima-Junior, O., E. Werneck-Barroso, R.S. Cordeiro, and M.G. Henriques. 1997. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin in mouse pleurisy. *J Leukoc Biol.* 62:778-85.
- Mesquita-Santos, F.P., A. Vieira-de-Abreu, A.S. Calheiros, I.H. Figueiredo, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, P.T. Bozza, B.L. Diaz, and C. Bandeira-Melo. 2006. Cutting Edge: Prostaglandin D2 Enhances Leukotriene C4 Synthesis by Eosinophils during Allergic Inflammation: Synergistic In Vivo Role of Endogenous Eotaxin. *J Immunol.* 176:1326-30.
- Miura, S., J.W. Gan, J. Brzostowski, M.J. Parisi, C.J. Schultz, C. Londos, B. Oliver, and A.R. Kimmel. 2002. Functional conservation for lipid storage droplet association among Perilipin, ADRP, and TIP47 (PAT)-related proteins in mammals, *Drosophila*, and *Dictyostelium*. *J Biol Chem.* 277:32253-7.
- Molloy, A., P. Laochumroonvorapong, and G. Kaplan. 1994. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. *J Exp Med.* 180:1499-509.
- Mordue, D.G., N. Desai, M. Dustin, and L.D. Sibley. 1999. Invasion by *Toxoplasma gondii* establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* 190:1783-92.
- Moreno, C., A. Mehlert, and J. Lamb. 1988. The inhibitory effects of mycobacterial lipoarabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin Exp Immunol.* 74:206-10.
- Moreno, C., J. Taverne, A. Mehlert, C.A. Bate, R.J. Brealey, A. Meager, G.A. Rook, and J.H. Playfair. 1989. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 76:240-5.
- Morrison, D.C., and S. Raziuddin. 1982. Lipopolysaccharides and endotoxin, In Immunopharmacology, ed. Sirois, P. & Rola-Pleszczynski. *Elsevier Biomedical Press, Amsterdam*:169-99.

- Morrison, D.C., and J.L. Ryan. 1987. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med.* 38:417-32.
- Moura, A.C., P.S. Leonardo, M.G. Henriques, and R.S. Cordeiro. 1999. Opposite effects of *M. leprae* or *M. bovis* BCG delipidation on cellular accumulation into mouse pleural cavity. Distinct accomplishment of mycobacterial lipids in vivo. *Inflamm Res.* 48:308-13.
- Moura, A.C., and M. Mariano. 1997. Lipids from *Mycobacterium leprae* cell wall suppress T-cell activation in vivo and in vitro. *Immunology.* 92:429-36.
- Murphy, D.J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res.* 40:325-438.
- Murphy, D.J., and J. Vance. 1999. Mechanisms of lipid-body formation. *Trends Biochem Sci.* 24:109-15.
- Nagy, L., P. Tontonoz, J.G. Alvarez, H. Chen, and R.M. Evans. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 93:229-40.
- Newman, S.L., J.E. Henson, and P.M. Henson. 1982. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. *J Exp Med.* 156:430-42.
- Nicholson, A.C. 2004. Expression of CD36 in macrophages and atherosclerosis: the role of lipid regulation of PPARgamma signaling. *Trends Cardiovasc Med.* 14:8-12.
- Nickerson, P., P. Orr, M.L. Schroeder, L. Sekla, and J.B. Johnston. 1989. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med.* 111:851-3.
- Nohgawa, M., M. Sasada, A. Maeda, K. Asagoe, N. Harakawa, K. Takano, K. Yamamoto, and M. Okuma. 1997. Leukotriene B4-activated human endothelial cells promote transendothelial neutrophil migration. *J Leukoc Biol.* 62:203-9.
- Noiri, E., T. Yokomizo, A. Nakao, T. Izumi, T. Fujita, S. Kimura, and T. Shimizu. 2000. An in vivo approach showing the chemotactic activity of leukotriene B(4) in acute renal ischemic-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:823-8.
- Oltvai, Z.N., and S.J. Korsmeyer. 1994. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell.* 79:189-92.
- Ostermeyer, A.G., J.M. Paci, Y. Zeng, D.M. Lublin, S. Munro, and D.A. Brown. 2001. Accumulation of caveolin in the endoplasmic reticulum redirects the protein to lipid storage droplets. *J Cell Biol.* 152:1071-8.
- Ostermeyer, A.G., L.T. Ramcharan, Y. Zeng, D.M. Lublin, and D.A. Brown. 2004. Role of the hydrophobic domain in targeting caveolin-1 to lipid droplets. *J Cell Biol.* 164:69-78.
- O'Sullivan, M.G., F.H. Chilton, E.M. Huggins, Jr., and C.E. McCall. 1992. Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem.* 267:14547-50.
- Pacheco, P., F.A. Bozza, R.N. Gomes, M. Bozza, P.F. Weller, H.C. Castro-Faria-Neto, and P.T. Bozza. 2002. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism. *J Immunol.* 169:6498-506.
- Pegg, A.E., and P.P. McCann. 1982. Polyamine metabolism and function. *Am J Physiol.* 243:C212-21.
- Phipps, R.P.E.A. 1991. A new view of prostaglandin-E regulation of the immune response. *Immunol. Today.* 12:349-352.

- Pinge-Filho, P., C.E. Tadokoro, and I.A. Abrahamsohn. 1999. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell Immunol.* 193:90-8.
- Pintado, V., A. Antela, J. Corres, and P. Martin-Davila. 1999. [Arthritis and tenosynovitis caused by *Mycobacterium kansasii* associated with human immunodeficiency virus infection]. *Rev Clin Esp.* 199:863.
- Planelles, L., M.C. Thomas, C. Maranon, M. Morell, and M.C. Lopez. 2003. Differential CD86 and CD40 co-stimulatory molecules and cytokine expression pattern induced by *Trypanosoma cruzi* in APCs from resistant or susceptible mice. *Clin Exp Immunol.* 131:41-7.
- Pol, A., R. Luetterforst, M. Lindsay, S. Heino, E. Ikonen, and R.G. Parton. 2001. A caveolin dominant negative mutant associates with lipid bodies and induces intracellular cholesterol imbalance. *J Cell Biol.* 152:1057-70.
- Pradhan, D., S. Krahling, P. Williamson, and R.A. Schlegel. 1997. Multiple systems for recognition of apoptotic lymphocytes by macrophages. *Mol Biol Cell.* 8:767-78.
- Prasad, H.K., R.S. Mishra, and I. Nath. 1987. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of in vitro concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med.* 165:239-44.
- Prata, A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1:92-100.
- Quesniaux, V.J., D.M. Nicolle, D. Torres, L. Kremer, Y. Guerardel, J. Nigou, G. Puzo, F. Erard, and B. Ryffel. 2004. Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol.* 172:4425-34.
- Rangel Moreno, J., I. Estrada Garcia, M. De La Luz Garcia Hernandez, D. Aguilar Leon, R. Marquez, and R. Hernandez Pando. 2002. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 106:257-66.
- Reginato, A.J., H.R. Schumacher, D.A. Allan, and J.L. Rabinowitz. 1985. Acute monoarthritis associated with lipid liquid crystals. *Ann Rheum Dis.* 44:537-43.
- Reiling, N., C. Holscher, A. Fehrenbach, S. Kroger, C.J. Kirschning, S. Goyert, and S. Ehlers. 2002. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 169:3480-4.
- Renz, H., J.H. Gong, A. Schmidt, M. Nain, and D. Gemsa. 1988. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol.* 141:2388-93.
- Rhoades, E.R., A.M. Cooper, and I.M. Orme. 1995. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 63:3871-7.
- Ribeiro-Gomes, F.L., A.C. Otero, N.A. Gomes, M.C. Moniz-De-Souza, L. Cysne-Finkelstein, A.C. Arnholdt, V.L. Calich, S.G. Coutinho, M.F. Lopes, and G.A. DosReis. 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 172:4454-62.
- Ricote, M., and C.K. Glass. 2001. New roles for PPARs in cholesterol homeostasis. *Trends Pharmacol Sci.* 22:441-3; discussion 444.
- Riedel, D.D., and S.H. Kaufmann. 1997. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 65:4620-3.
- Rietschel, E.T., and H. Brade. 1992. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 267:54-61.

- Rivas-Santiago, B., P. Vieyra-Reyes, and Z. Araujo. 2005. [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Invest Clin.* 46:391-412.
- Robinson, J.M., M.L. Karnovsky, and M.J. Karnovsky. 1982. Glycogen accumulation in polymorphonuclear leukocytes, and other intracellular alterations that occur during inflammation. *J Cell Biol.* 95:933-42.
- Rojas, M., M. Olivier, P. Gros, L.F. Barrera, and L.F. Garcia. 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages. *J Immunol.* 162:6122-31.
- Rothenberg, M.E. 1999. Eotaxin. An essential mediator of eosinophil trafficking into mucosal tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 21:291-5.
- Rouzer, C.A.S., B. 1987. Reversible, calcium-dependent membrane association of human leukocyte 5-lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7393.
- Ruoslahti, E., and M.D. Pierschbacher. 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science.* 238:491-7.
- Russell, D.G. 2001. Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2:569-77.
- Russell, D.G. 2003. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. *Nat Cell Biol.* 5:776-8.
- Russell, D.G., H.C. Mwandumba, and E.E. Rhoades. 2002. Mycobacterium and the coat of many lipids. *J Cell Biol.* 158:421-6.
- Rylander, R., L. Beijer, R.C. Lantz, R. Burrell, and P. Sedivy. 1988. Modulation of pulmonary inflammation after endotoxin inhalation with a platelet-activating factor antagonist (48740 RP). *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 86:303-7.
- Samuelsson, B., S.E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, and C.N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* 237:1171-6.
- Sarquis, O., J. Borges-Pereira, J.R. Mac Cord, T.F. Gomes, P.H. Cabello, and M.M. Lima. 2004. Epidemiology of Chagas disease in Jaguaruana, Ceara, Brazil. I. Presence of triatomines and index of Trypanosoma cruzi infection in four localities of a rural area. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 99:263-70.
- Savill, J., I. Dransfield, N. Hogg, and C. Haslett. 1990. Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Nature.* 343:170-3.
- Savill, J., and V. Fadok. 2000. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 407:784-8.
- Savill, J., N. Hogg, Y. Ren, and C. Haslett. 1992. Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest.* 90:1513-22.
- Scherer, P.E., P.E. Bickel, M. Kotler, and H.F. Lodish. 1998. Cloning of cell-specific secreted and surface proteins by subtractive antibody screening. *Nat Biotechnol.* 16:581-6.
- Schlesinger, P.A., M.T. Stillman, and L. Peterson. 1982. Polyarthritis with birefringent lipid within synovial fluid macrophages: case report and ultrastructural study. *Arthritis Rheum.* 25:1365-8.
- Schletter, J., H. Brade, L. Brade, C. Kruger, H. Loppnow, S. Kusumoto, E.T. Rietschel, H.D. Flad, and A.J. Ulmer. 1995. Binding of lipopolysaccharide (LPS) to an 80-kilodalton membrane protein of human cells is mediated by soluble CD14 and LPS-binding protein. *Infect Immun.* 63:2576-80.
- Schluger, N.W., and W.N. Rom. 1998. The host immune response to tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:679-91.
- Scott, W.A., N.A. Pawlowski, H.W. Murray, M. Andreach, J. Zrike, and Z.A. Cohn. 1982. Regulation of arachidonic acid metabolism by macrophage activation. *J Exp Med.* 155:1148-60.

- Searle, J., J.F. Kerr, and C.J. Bishop. 1982. Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 17 Pt 2:229-59.
- Selwyn, P.A., D. Hartel, V.A. Lewis, E.E. Schoenbaum, S.H. Vermund, R.S. Klein, A.T. Walker, and G.H. Friedland. 1989. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 320:545-50.
- Serhan, C.N. 1994. Eicosanoids in leukocyte function. *Curr Opin Hematol.* 1:69-77.
- Servetnick, D.A., D.L. Brasaemle, J. Gruia-Gray, A.R. Kimmel, J. Wolff, and C. Londos. 1995. Perilipins are associated with cholesteryl ester droplets in steroidogenic adrenal cortical and Leydig cells. *J Biol Chem.* 270:16970-3.
- Shaw, J.O., and P.M. Henson. 1982. Pulmonary intravascular sequestration of activated neutrophils: failure to induce light-microscopic evidence of lung injury in rabbits. *Am J Pathol.* 108:17-23.
- Sibley, L.D., S.W. Hunter, P.J. Brennan, and J.L. Krahenbuhl. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infect Immun.* 56:1232-6.
- Sibley, L.D., E. Weidner, and J.L. Krahenbuhl. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 315:416-9.
- Silva, A.R., E.F. de Assis, L.F. Caiado, G.K. Marathe, M.T. Bozza, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, S.M. Prescott, P.T. Bozza, and H.C. Castro-Faria-Neto. 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein. *J Immunol.* 168:4112-20.
- Silva, M.T., M.N. Silva, and R. Appelberg. 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. *Microb Pathog.* 6:369-80.
- Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-82.
- Snyder, D.S., D.I. Beller, and E.R. Unanue. 1982. Prostaglandins modulate macrophage Ia expression. *Nature.* 299:163-5.
- Stenger, S., R.J. Mazzaccaro, K. Ujemura, S. Cho, P.F. Barnes, J.P. Rosat, A. Sette, M.B. Brenner, S.A. Porcelli, B.R. Bloom, and R.L. Modlin. 1997. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science.* 276:1684-7.
- Stewart, A.G., P.N. Dubbin, T. Harris, and G.J. Dusting. 1990. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of icosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:3215-9.
- Sturgill-Koszycki, S., P.H. Schlesinger, P. Chakraborty, P.L. Haddix, H.L. Collins, A.K. Fok, R.D. Allen, S.L. Gluck, J. Heuser, and D.G. Russell. 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 263:678-81.
- Sugawara, I., H. Yamada, C. Li, S. Mizuno, O. Takeuchi, and S. Akira. 2003. Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol.* 47:327-36.
- Surette, M.E., and F.H. Chilton. 1998. The distribution and metabolism of arachidonate-containing phospholipids in cellular nuclei. *Biochem J.* 330 ( Pt 2):915-21.
- Surette, M.E., R. Palmantier, J. Gosselin, and P. Borgeat. 1993. Lipopolysaccharides prime whole human blood and isolated neutrophils for the increased synthesis of 5-lipoxygenase products by enhancing arachidonic acid availability: involvement of the CD14 antigen. *J Exp Med.* 178:1347-55.

- Tafari, W.L. 1987. [Pathogenesis of Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 29:194-9.
- Takemura, T., W.N. Rom, V.J. Ferrans, and R.G. Crystal. 1989. Morphologic characterization of alveolar macrophages from subjects with occupational exposure to inorganic particles. *Am Rev Respir Dis*. 140:1674-85.
- Takeuchi, O., K. Hoshino, T. Kawai, H. Sanjo, H. Takada, T. Ogawa, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 11:443-51.
- Takeuchi, O., S. Sato, T. Horiuchi, K. Hoshino, K. Takeda, Z. Dong, R.L. Modlin, and S. Akira. 2002. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*. 169:10-4.
- Talvani, A., F.S. Machado, G.C. Santana, A. Klein, L. Barcelos, J.S. Silva, and M.M. Teixeira. 2002. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. *Infect Immun*. 70:4247-53.
- Tanowitz, H.B., J.P. Gumprecht, D. Spurr, T.M. Calderon, M.C. Ventura, C. Raventos-Suarez, S. Kellie, S.M. Factor, V.B. Hatcher, M. Wittner, and et al. 1992. Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*. 166:598-603.
- Tauchi-Sato, K., S. Ozeki, T. Houjou, R. Taguchi, and T. Fujimoto. 2002. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique Fatty Acid composition. *J Biol Chem*. 277:44507-12.
- Tontonoz, P.N., L.; Alvarez, J.G.; Thomazy, V.A.; Evans, R.M. 1998. PPARgamma promotes monocytes/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 93:241-252.
- Triggiani, M., A. Oriente, G. de Crescenzo, G. Rossi, and G. Marone. 1995. Biochemical functions of a pool of arachidonic acid associated with triglycerides in human inflammatory cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 107:261-3.
- Triggiani, M., A. Oriente, and G. Marone. 1994. Differential roles for triglyceride and phospholipid pools of arachidonic acid in human lung macrophages. *J Immunol*. 152:1394-403.
- Tsoukatos, D.C., N. Androulakis, A.D. Tselepis, and M.J. Chapman. 2002. Formation of platelet activating factor and its bioactive analogues upon Cu<sup>2+</sup> induced LDL oxidation. *Free Radical Biol Med*. 33:S147.
- Uchimura, E., T. Kodaira, K. Kurosaka, D. Yang, N. Watanabe, and Y. Kobayashi. 1997. Interaction of phagocytes with apoptotic cells leads to production of pro-inflammatory cytokines. *Biochem Biophys Res Commun*. 239:799-803.
- Ulevitch, R.J., and P.S. Tobias. 1995. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol*. 13:437-57.
- Ullrich, H.J., W.L. Beatty, and D.G. Russell. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway. *J Immunol*. 165:6073-80.
- Umlauf, E., E. Csaszar, M. Moertelmaier, G.J. Schuetz, R.G. Parton, and R. Prohaska. 2004. Association of stomatin with lipid bodies. *J Biol Chem*. 279:23699-709.
- van Deurs, B., K. Roepstorff, A.M. Hommelgaard, and K. Sandvig. 2003. Caveolae: anchored, multifunctional platforms in the lipid ocean. *Trends Cell Biol*. 13:92-100.
- van Meer, G. 2001. Caveolin, cholesterol, and lipid droplets? *J Cell Biol*. 152:F29-34.



- Venkataprasad, N., H. Shiratsuchi, J.L. Johnson, and J.J. Ellner. 1996. Induction of prostaglandin E2 by human monocytes infected with Mycobacterium avium complex--modulation of cytokine expression. *J Infect Dis.* 174:806-11.
- Vergne, I., J. Chua, S.B. Singh, and V. Deretic. 2004a. Cell biology of mycobacterium tuberculosis phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 20:367-94.
- Vergne, I., R.A. Fratti, P.J. Hill, J. Chua, J. Belisle, and V. Deretic. 2004b. Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest: mycobacterial phosphatidylinositol analog phosphatidylinositol mannoside stimulates early endosomal fusion. *Mol Biol Cell.* 15:751-60.
- Vespa, G.N., F.Q. Cunha, and J.S. Silva. 1994. Nitric oxide is involved in control of Trypanosoma cruzi-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun.* 62:5177-82.
- Via, L.E., D. Deretic, R.J. Ulmer, N.S. Hibler, L.A. Huber, and V. Deretic. 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 272:13326-31.
- Vieira-de-Abreu, A., E.F. Assis, G.S. Gomes, H.C. Castro-Faria-Neto, P.F. Weller, C. Bandeira-Melo, and P.T. Bozza. 2005. Allergic Challenge-Elicited Lipid Bodies Compartmentalize In Vivo Leukotriene C4 Synthesis within Eosinophils. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 33:254-261.
- Voll, R.E., M. Herrmann, E.A. Roth, C. Stach, J.R. Kalden, and I. Girkontaite. 1997. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature.* 390:350-1.
- Walburger, A., A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, C. Prescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, G. Bacher, and J. Pieters. 2004. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science.* 304:1800-4.
- Wallis, R.S., and J.J. Ellner. 1994. Cytokines and tuberculosis. *J Leukoc Biol.* 55:676-81.
- Wang, S.M., and T.H. Fong. 1995. A lipid droplet-specific capsule is present in rat adrenal cells: evidence from a monoclonal antibody. *Biochem Biophys Res Commun.* 217:81-8.
- Wang, S.M., T.H. Fong, S.Y. Hsu, C.L. Chien, and J.C. Wu. 1997. Reorganization of a novel vimentin-associated protein in 3T3-L1 cells during adipose conversion. *J Cell Biochem.* 67:84-91.
- Wayne, L.G. 1994. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 13:908-14.
- Weinstein, J. 1980. Synovial fluid leukocytosis associated with intracellular lipid inclusions. *Arch Intern Med.* 140:560-1.
- Welch, J.S., M. Ricote, T.E. Akiyama, F.J. Gonzalez, and C.K. Glass. 2003. PPARgamma and PPARdelta negatively regulate specific subsets of lipopolysaccharide and IFN-gamma target genes in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:6712-7.
- Weller, P.F., S.J. Ackerman, A. Nicholson-Weller, and A.M. Dvorak. 1989. Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *Am J Pathol.* 135:947-59.
- Weller, P.F., P.T. Bozza, W. Yu, and A.M. Dvorak. 1999. Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation. *Int Arch Allergy Immunol.* 118:450-2.
- Weller, P.F., and A.M. Dvorak. 1985. Arachidonic acid incorporation by cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. *Blood.* 65:1269-74.
- Weller, P.F., S.W. Ryeom, S.T. Picard, S.J. Ackerman, and A.M. Dvorak. 1991. Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C. *J Cell Biol.* 113:137-46.

- Weller, P.F.R., S.W.; Dvorak, A.M. 1991. Lipid bodies: structurally distinct, non-membranous intracellular sites of eicosanoids formation. *Prostaglandins, Leukotrienes, Lipoxins, and PAF*.
- Werneck-Barroso, E., A.C. Moura, M.M. Monteiro, O. Menezes de Lima Junior, M.N. de Meirelles, and M.G. Henriques. 2000. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to *M. bovis* BCG in the mouse pleural cavity. *Inflamm Res*. 49:206-13.
- Whalen, C., C.R. Horsburgh, D. Hom, C. Lahart, M. Simberkoff, and J. Ellner. 1995. Accelerated course of human immunodeficiency virus infection after tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 151:129-35.
- Wieland, C.W., S. Knapp, S. Florquin, A.F. de Vos, K. Takeda, S. Akira, D.T. Golenbock, A. Verbon, and T. van der Poll. 2004. Non-Mannose-capped Lipoarabinomannan Induces Lung Inflammation via Toll-like Receptor 2. *Am J Respir Crit Care Med*. 170:1367-74.
- Wyllie, A.H., J.F. Kerr, and A.R. Currie. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 68:251-306.
- Yu, W., P.T. Bozza, D.M. Tzizik, J.P. Gray, J. Cassara, A.M. Dvorak, and P.F. Weller. 1998. Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies. *Am J Pathol*. 152:759-69.
- Yu, W., J. Cassara, and P.F. Weller. 2000. Phosphatidylinositide 3-kinase localizes to cytoplasmic lipid bodies in human polymorphonuclear leukocytes and other myeloid-derived cells. *Blood*. 95:1078-85.
- Zimmerli, S., S. Edwards, and J.D. Ernst. 1996. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 15:760-70.

## **Capítulo 1 – Formação e função de corpúsculos lipídicos em infecções por patógenos intracelulares**

Este capítulo agrega 3 artigos onde foram investigados os mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos nas infecções por *Mycobacterium bovis* BCG e *Trypanosoma cruzi* e o envolvimento destas organelas na modulação da resposta do hospedeiro. Além disso, estudou-se o envolvimento de TLR2 na migração de eosinófilos na infecção por BCG.

Estas infecções, causadas por patógenos intracelulares, induziram a formação de corpúsculos lipídicos num mecanismo dependente da dose e do tempo de infecção. Além disso, demonstrou-se que este fenômeno ocorre através do reconhecimento e da sinalização via TLR2. O aumento de corpúsculos lipídicos correlacionou-se com a geração aumentada de PGE<sub>2</sub> e com a co-localização de COX-2 em corpúsculos lipídicos induzidos pela infecção por patógenos. Foi também demonstrado que os corpúsculos lipídicos são sítios predominantes de síntese de PGE<sub>2</sub> em macrófagos. Estudos usando microscopia eletrônica de transmissão mostraram que os corpúsculos lipídicos, induzidos por ambos os patógenos, aumentaram significativamente em tamanho (diâmetro) e sofreram alterações de osmiofilia, ressaltando a natureza dinâmica dessas organelas. Além disso, nossos dados ultra-estruturais mostraram corpúsculos lipídicos nitidamente associados com fagossomos, sugerindo a ocorrência de interação funcional entre essas estruturas.

Finalmente, observamos que na infecção por BCG a migração de eosinófilos e a formação de corpúsculos lipídicos nessas células ocorrem através de um mecanismo dependente de TLR2 e de eotaxina.

Em resumo, nossos dados demonstraram que os corpúsculos lipídicos funcionam como sítios de sinalização para a produção de mediadores inflamatórios, uma vez que a compartimentalização de substrato e de enzimas-chave e corpúsculos lipídicos têm impacto no aumento da capacidade de células ativadas em gerar grandes quantidades de eicosanóides durante infecção por patógenos intracelulares.

## Capítulo 2 – Modulação da formação e função de corpúsculos lipídicos por células apoptóticas

O papel de metabólitos da via da ciclooxygenase na modulação da resposta de macrófagos a patógenos não está totalmente esclarecido, e neste estudo pretendemos investigar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na síntese eicosanóide. Estudos prévios demonstraram que a fagocitose de células apoptóticas favorece a replicação de patógenos, através de um mecanismo dependente de PGE<sub>2</sub> e TGF β. Neste capítulo, nós demonstramos que o efeito da infecção por *T. cruzi* ou BCG na formação de corpúsculos lipídicos é acompanhado por aumento na expressão de COX-2 e produção de PGE<sub>2</sub> em macrófagos, tanto *in vivo* como *in vitro*, e potenciado pela fagocitose de células apoptóticas.

Na infecção por *T. cruzi* este fenômeno ocorre através de um mecanismo que envolve reconhecimento das células apoptóticas pelo receptor de vitronectina, onde a estimulação com anticorpo anti- $\alpha_v\beta_3$  e o tratamento com flavoridina, respectivamente, induziu e inibiu formação de corpúsculos lipídicos e expressão de COX-2 e síntese de PGE<sub>2</sub>. Células apoptóticas também induziram aumentada produção de TGF-β, que por sua vez foi capaz de induzir corpúsculos lipídicos em macrófagos. Além disso, nossos dados sugeriram o papel de PPAR $\gamma$  na sinalização para a produção de eicosanóides e formação de corpúsculos lipídicos induzida por células apoptóticas. No modelo de infecção por *M. bovis* BCG *in vivo*, nós demonstramos intensa apoptose de neutrófilos no sítio inflamatório e fagocitose destas células por macrófagos. *In vitro*, células apoptóticas potenciaram o efeito da infecção por BCG nos mecanismos de formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE<sub>2</sub>.

Em geral, a fagocitose de células apoptóticas durante infecção por patógenos intracelulares parece modular a função de macrófagos através da formação de corpúsculos lipídicos, expressão de COX-2 e síntese de PGE<sub>2</sub> e TGF-β.



# 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](#)