

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VINÍCIUS TADEU MARTINS GUERRA CAMPOS

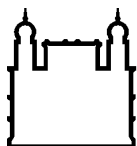
**Caracterização da interação de corpúsculos lipídicos e inflamassomas durante a infecção
por *Mycobacterium bovis* BCG**

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

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Torres Bozza

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

VINÍCIUS TADEU MARTINS GUERRA CAMPOS

**Caracterização da interação de corpúsculos lipídicos e inflamassomas durante a
infecção por *M. bovis* BCG**

ORIENTADORA: Prof. Dr. Patrícia Torres Bozza

Aprovada em: 03/04/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carmen Penido Monteiro – Presidente (FIOCRUZ)
Prof. Dr. Patrícia Elaine de Almeida (UFJF)
Prof. Dr. Rodrigo Tinoco Figueiredo (UFRJ)
Prof. Dr. Márcia Barredo - Revisora (FIOCRUZ)
Prof. Dr. Flávio Lara – Suplente (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 03 de abril de 2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Campos, Vinícius Tadeu Martins Guerra.

Caracterização da interação de corpúsculos lipídicos e inflamassomas durante a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG / Vinícius Tadeu Martins Guerra Campos. - Rio de Janeiro, 2018.

78 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientadora: Patrícia Torres Bozza.

Bibliografia: f. 68-78

1. Inflamassomas. 2. Corpúsculos Lipídicos. 3. *Mycobacterium bovis* BCG. 4. Imunidade Inata. 5. Inflamação. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dedico esse trabalho à toda a minha família, em especial a meus pais, que me possibilitaram ter a educação e o conhecimento que eles mesmo nunca puderam ter. Por vocês eu vou alcançar o céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a toda minha família e amigos por acreditarem fielmente em mim e na minha capacidade que, eu mesmo, por vezes (muitas vezes) duvidei. Por cada conversa de madrugada e desabafo desesperado, por me fazerem ver que eu sou e posso muito mais.

À minha mãe, Márcia, que faz e fez tudo por mim durante toda a minha vida. Atos de amor desde fazer a comida que eu levava todos os dias, preparada com todo amor e cuidado, até ter certeza que as coisas negativas que eu acabava por pensar, jamais se completariam e que um dia tudo vai dar certo. Eu sei que a minha hora vai chegar e vai ficar tudo melhor do que é hoje e quando eu não soube, você sabia por mim.

A meu pai, Moacyr, por sempre acreditar e incentivar a minha profissão desde criança.

Às minhas tias, Marta e Lúcia, meu suporte e meus eternos exemplos na vida. Vocês me deram tudo o que podiam para que eu tivesse uma vida melhor e oportunidades de crescer. Sempre me mirei nessa independência e força e até hoje nada disso mudou.

À UEZO e todos os seus mestres que me formaram biólogo, meu sonho de criança. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigado por me darem uma boa formação mesmo dentro de toda a limitação e problemas que a instituição passou e passa, só quem já viveu realmente sabe e ainda assim, somos muito bons.

À minha orientadora Patrícia pela oportunidade, por me aceitar como aluno num grupo de trabalho tão forte.

À Carla Freitas, por me selecionar para realizar minha iniciação científica e me ensinar os fundamentos do trabalho em laboratório. Sem isso, jamais chegaria ao mestrado.

À Natalia Roque, pelos ensinamentos de imunofluorescência, desde protocolos até a execução experimental, foram muitas vezes. Obrigado pela perseverança em me ajudar em momentos de imensa dificuldade. Aprender é parte do processo, ainda que seja exaustivo, pode inclusive mostrar novos caminhos.

À Livia Teixeira, por todos os muitos momentos que me ajudou com tudo que eu precisei, desde contas de molaridade e dúvidas metodológicas muito frequentes a conselhos e reflexões sobre a vida, pessoas e relacionamentos. Obrigado pelas noites regadas a muito pão com mortadela, memes e risadas.

À Nara Fazzolini, por me ensinar e ajudar muito com os experimentos de gradientes de sacarose. Embora eu nunca tenha feito tão bem quanto você, consegui executar uma técnica que nunca achei que conseguiria fazer sozinho. Não esquecendo de nossos almoços sempre regados a muito papo engraçado, compartilhamento de experiências de vida e olhares para o futuro, espero que tudo se concretize da melhor forma possível, que tenhamos muitas surpresas positivas. Melhores conversas.

À Ester Barreto pela ajuda essencial principalmente durante as vésperas do meu seminário discente, quando achei que jamais estaria pronto para aquilo. Foi essencial, obrigado.

À Sally Liechocki por toda a ajuda com a PCR, as dicas de escrita e a paciência e claro, a todos os dias que ficamos nos “turnos da noite” pré defesa.

À Juliana Lopes pela força de sempre, por me fazer saber que nesse mundo científico há gente como a gente, que viveu realidade difícil semelhante à minha, mas conquistou tudo com muito esforço, agradeço ainda pelas caronas e ensinamentos de vida.

À Andrea Surrage, por ser sempre incentivadora em todos os aspectos e uma pessoa de convivência extremamente prazerosa.

À Roberta, por estar sempre preocupada com meu bem-estar e sempre tentar me motivar. Cada uma das mensagens e conversas foi de grande valia, tenha certeza. Obrigado também pelas caronas para o Fundão quando eu estava atrasado.

À Maria Fernanda Silva, por nossos almoços descontraídos e risadas e pela ajuda também durante a escrita.

À Adriana Silva, por me aconselhar em alguns momentos que eu me sentia desesperado e incapaz de fazer o que precisava. Palavras certas nas horas certas.

A Edson Assis por toda ajuda com a técnica de ELISA e pelas caronas para casa.

Às pesquisadoras do laboratório de imunofarmacologia do pavilhão 108, Clarissa Maya Monteiro, Cecília Jacques e Adriana Vallochi por todas as críticas feitas para melhoria do trabalho realizadas durante as reuniões de laboratório e até mesmo na rotina de bancada. Obrigado.

Agradeço a todos os integrantes do laboratório de Imunofarmacologia, pelas risadas, aprendizados, críticas construtivas, almoços, lanches nada saudáveis, conversas, conselhos, abraços, caronas e o orgulho vê-los sendo os grandes profissionais, crescendo e me fazendo crescer. Passei muito mais tempo com vocês do que na minha casa nesse período.

Agradecimento especial a Rose Branco e Julimar Loures por serem sempre atenciosas e eficientes, dispostas a nos ajudar com os processos administrativos burocráticos e compras, dúvidas sobre a pós-graduação e suas disciplinas entre tantas funções suporte para o funcionamento do laboratório de do curso da BCM. Sem vocês, com certeza, nada andaria.

Aos meus companheiros estudantes da BCM, meu muito obrigado pela força de sempre, fosse durante as disciplinas com seminários e trabalhos intermináveis ou nos nossos almoços, ou ainda quando íamos ver as defesas um dos outros, me emocionei cada uma das vezes. Agradeço pelo apoio, por nós sabermos é essa experiência tão árdua e viver parte dela juntos.

Á minha revisora, Marcia Berreto, pela sua paciência e imensa disposição em me ajudar e por compreender os atrasos, meu nervosismo e imenso cansaço nos últimos momentos de preparação para entrega aos membros da banca. Obrigado, sem dúvida sua participação fez a diferença.

Agradeço ainda, à FIOCRUZ e a todos os docentes do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular do IOC pelo conhecimento adquirido e amadurecimento profissional e por último, não menos importante, às agências de fomento (CNPq e CAPES) pelo apoio financeiro.

“A vida se libera. Cruza fronteiras, rompe barreiras. Dolorosa ou perigosamente, mas, bem, é como é. A vida encontra um jeito.”

(Jurassic Park, 1993)

LISTA DE ABREVIATURAS

ADRP: Adipose Differentiation-related Protein

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

BMM: Bone Marrow Macrophage

CARD: Caspase activation and recruitment domains

CL: Corpúsculos lipídicos

COX: Ciclooxygenase

LOX: Lipoxigenase

HIV: Human Immunodeficiency Virus

IL: Interleucine

MyD88: Myeloide differentiation primary response gene 88

NF- κ B: Nuclear Factor κ B

NOD: Nucleotide-binding oligomerization domain

NLR: NOD Like Receptors

OMS: Organização Mundial da Saúde

ORO: Oil-Red-O

PAMP: Patogen Associated Molecular Pattern

PRR: Pattern Recognition Receptor

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROS: Reactive Oxygen Species

SFB: Soro fetal bovino

MDP: Muramyl Dipeptide

iNOS: Induced Nitric Oxid Sintases

TNF: Tumoral Necrosis Factor

MIP2: Macrophage Inflammatory Protein 2

KC: Keratinocyte-derived Chemokine

TIP47: Tail-Interacting Protein

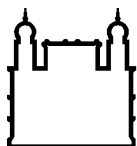
LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Ocorrência mundial de novos casos de tuberculose em 2015 (página 1).
- Figura 2:** Patogenia da tuberculose (página 5).
- Figura 3:** Diversidade de receptores semelhantes a NOD (NLRs) (página 11).
- Figura 4:** Ativadores clássicos do inflamassomas, os derivados de patógenos (PAMPs) e derivados de próprio hospedeiro ou do ambiente (DAMPs) (página 14).
- Figura 5:** IL-1 β é somente a ponta do ICEberg (página 16).
- Figura 6:** Biogênese e estrutura de corpúsculos lipídicos (página 22).
- Figura 7:** A biogênese de corpúsculos lipídicos é estímulo-dependente (página 24).
- Figura 8:** Diversidade de proteínas encontradas nos corpúsculos lipídicos (página 25).
- Figura 9:** BCG induz a formação de CL nos macrófagos derivados de medula óssea murina em diferentes tempos (página 36).
- Figura 10:** A infecção por BCG 24 foi capaz de induzir biogênese de corpúsculos lipídicos (CLs) (página 37).
- Figura 11:** Marcação de ADRP nos corpúsculos de lipídicos de macrófagos infectados por BCG (página 38).
- Figura 12:** Co-localização de NLPR3 nos corpúsculos lipídicos de macrófagos murinos infectados por BCG (página 39).
- Figura 13:** ASC não co-localiza com corpúsculos lipídicos nos macrófagos murinos infectados com BCG (página 40).
- Figura 14:** Caspase-1 poderia estar interagindo com os CLs de macrófagos infectados com BCG (página 41).
- Figura 15:** C75 é capaz de reduzir a biogênese de CL de macrófagos derivados de medula óssea frente à infecção por BCG (página 43).
- Figura 16:** A produção de IL-1 β induzida por BCG é inibida com pré-tratamento com a droga C75 (página 44).
- Figura 17:** Modulação da expressão de IL-1 β frente ao desafio com BCG e tratamento com C75 (página 45).
- Figura 18:** A expressão do RNAm de IL-1 β varia de forma diferente frente aos estímulos de BCG e C75 (página 46).

SUMÁRIO

RESUMO	XIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Tuberculose	1
1.1.1 Epidemiologia e aspectos gerais	1
1.1.2 Imunopatogenia da tuberculose	4
1.2. Inflamassomas	10
1.2.1. Receptores NOD like e inflamassomas: importância biológica	10
1.2.2. O inflamassoma NLRP3	17
1.3. Corpúsculos Lipídicos	20
1.3.1. Estrutura e biogênese dos corpúsculos lipídicos	20
1.3.2. Composição dos corpúsculos lipídicos	23
1.3.3. Corpúsculos Lipídicos: importância biológica durante a infecção	26
2. HIPÓTESE:	28
3. OBJETIVOS:	29
3.1. Objetivo geral:	29
3.2. Objetivos específicos:	29
4. MATERIAS E MÉTODOS	30
4.1. Animais:	30
4.2. Mycobacterium bovis BCG:	30
4.3. Diferenciação dos Macrófagos a partir de Medula óssea Murina:	31
4.4. Tratamento com C75:	31
4.5. Infecção dos macrófagos:	32
4.6. Coloração de tetróxido de ósmio e contagem de corpúsculos lipídicos:	32
4.7. Coloração com Oil-Red-O (ORO):	32
4.8. Imunofluorescência:	33
4.9. Western Blot:	33
4.10. Dosagens de citocinas por ELISA:	34
4.11. Análise Estatística:	34
4.12. Reação em cadeia da polimerase (PCR):	34
5. RESULTADOS	36
5.1. BCG é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos	36
5.2. As proteínas do inflamassoma, Caspase-1 e NLRP3, mas não ASC, colocalizam com os corpúsculos lipídicos de macrófagos murinos infectados com BCG.	39
5.3. A inibição da enzima ácido graxo sintase pela droga C75 modula negativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos murinos infectados com BCG.	42

6. DISCUSSÃO.....	47
7. CONCLUSÕES	52



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização da interação de corpúsculos lipídicos e inflamassomas durante a infecção por *M. bovis* BCG

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Vinícius Tadeu Martins Guerra Campos

A tuberculose é uma doença de importância mundial, causando, ainda hoje, grandes taxas de mortalidade e morbidade na população mundial. O reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos pelas células do sistema imune durante a infecção é essencial para a ativação da resposta imune inata. Os macrófagos são primeira linha de defesa no pulmão, sítio de infecção mais comum desta doença, possuem diversos tipos de receptores responsivos aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). A família de receptores do tipo NOD (NLR) é importante sinalizadora para desencadear a montagem do inflamassoma, uma plataforma molecular capaz de processar citocinas inflamatórias para sua forma ativa, principalmente IL-1 β e IL-18. Ainda na frente de resposta inata, há os corpúsculos lipídicos (CL), organelas citoplasmáticas dinâmicas capazes de aumentar em tamanho e número frente a infecções que participam da regulação da produção de mediadores inflamatórios e levam ao favorecimento da sobrevivência dos patógenos intracelulares. O presente estudo visa, portanto, investigar a possível relação entre as proteínas componentes do inflamassoma e os CLs durante a resposta de macrófagos à infecção por *Mycobacterium bovis*, questão que permanece por ser melhor elucidada. Para tal, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos machos C57 Black 6 foram infectados com *M. bovis* BCG por 24 horas. Posteriormente as células foram analisadas por microscopia de fluorescência e confocal, objetivando verificar se haveria presença das componentes do inflamassoma nos CLs. Os resultados demonstram que, NALP3 e caspase-1 estariam co-localizados com os CLs, mas não ASC. A inibição de biogênese de CLs mediada pela droga C75, inibidora da enzima ácido graxo sintase, reduziu a secreção de IL1 β , principal substrato clivado pelo inflamassoma NLRP3. Através da análise por WB, nossos resultados demonstraram um efeito inibitório do C75 tanto na expressão quanto no processamento de IL-1 β , sugerindo um papel para os corpúsculos lipídicos na ativação do inflamassoma NLRP3.

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease of worldwide importance, causing great mortality and morbidity rates in the world population. Recognition of molecular patterns associated with pathogens by cells of the immune system during infection is essential for the activation of the innate immune response. Macrophages are the first line of defense in the lung, the most common site of infection of this disease, and have several types of receptors responsive to molecular patterns associated with pathogens (PAMPs). The NOD receptor family (NLR) is an important marker for triggering the assembly of inflammasome, a molecular platform of processing inflammatory cytokines into their active form, mainly IL-1 β and IL-18. Still in the front of innate response, there are lipid droplets (LD), dynamic cytoplasmic organelles of increasing in size and number against infections that participate in the regulation of the production of inflammatory mediators and lead to favoring the survival of intracellular pathogens. The present study therefore aims to investigate the possible relationship between the proteins components of the inflammasome and LDs during the response of macrophages to *Mycobacterium bovis* infection, a question that remains to be elucidated. To that end, bone marrow derived macrophages of C57 Black 6 male mice were infected with *Mycobacterium bovis* BCG for 24 hours. Afterwards the cells were analyzed by fluorescence and confocal microscopy, to verify if there was presence of the components of the inflammasome in the LDs. The results demonstrate that, NALP3 and caspase-1 would be co-localized with the LDs, but not ASC. Inhibition of CL biogenesis mediated by the enzyme fatty acid synthase inhibitor C75 reduced secretion of IL-1 β , the major substrate cleaved by the inflammatory neoplasm NLRP3. Through WB analysis, our results demonstrated an inhibitory effect of C75 on both IL-1 β expression and processing, suggesting a role for lipid droplets in the activation of inflammasome NLRP3.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

1.1.1 Epidemiologia e aspectos gerais

A tuberculose é uma doença de importância mundial, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2015 foram estimados mais de 10 milhões de novos casos em todo o mundo, dentre esses, 11% eram pessoas portadoras de HIV. Dentre os afetados, seis países sozinhos são responsáveis por 60% dos novos casos notificados, são eles: Índia, Indonésia, China, Nigéria, Paquistão e África do sul, como mostra a figura 1. No mesmo ano foram registrados 480.000 novos casos de tuberculose decorrente da existência de cepas multiresistentes a drogas (OMS, 2016).

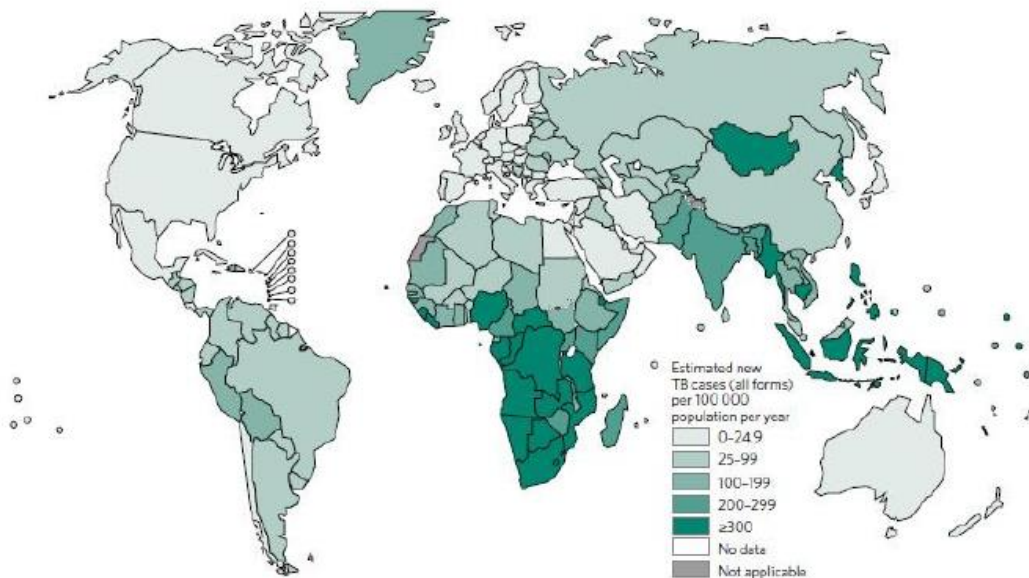


Figura 1. Ocorrência mundial de novos casos de tuberculose em 2015. A tuberculose permanece como uma doença que afeta todo o mundo, com altas taxas de mortalidade e morbidade. Como visto no mapa, a África do Sul segue sendo a região mais afetada, situação é agravada pela carência de sua população em atendimento médico, quadros frequentes de desnutrição além do desenvolvimento de cepas de bacilos multiresistentes aos tratamentos convencionais e a ocorrência mais frequente de co-infecções tuberculose e HIV (OMS,2016).

No Brasil, a tuberculose também constitui um grave problema de saúde pública, no ano 2000 foram notificados 82.249 casos novos, sendo 38.690 no Sudeste com maior prevalência no estado do Rio de Janeiro. Os números, porém, tendem a ser maiores já que existem vieses de deficiência diagnóstica e a subnotificação (Hijjar & Procopio, 2000).

Entre os fatores agravantes que contribuem para o desenvolvimento da doença, a desnutrição é um dos mais graves, pois a carência de nutrientes essenciais leva à falência de resposta imune e possível morte. A gravidade da tuberculose, sua grande taxa de disseminação e o fato de afetar principalmente países mais pobres, causando elevadas taxas de mortalidade e morbidade a enquadram na lista de doenças negligenciadas (Sargazi et al., 2017). Outro importante fator que contribui para o agravamento dos casos de tuberculose é o aparecimento de bacilos multirresistentes. Bacilos multirresistentes são aqueles que possuem resistência a pelo menos duas drogas de primeira linha largamente utilizadas no tratamento, tais como a isoniazida e a rifampicina. Existem ainda as cepas extensivamente resistente a drogas que, de forma preocupante, apresentam resistência às drogas de primeira linha e a pelo menos 3 das 6 drogas de segunda linha para tratamento da tuberculose (Blaas et al., 2008; Gandhi et al., 2006; Ollé-Goig, 2006; Shah, Goregaonkar, & Goregaonkar, 2017).

O surgimento de cepas cada vez mais resistentes é associado com negligência e uso inadequado do tratamento, que é longo, podendo durar até 6 meses. O desaparecimento dos sintomas iniciais da doença, pode provocar abandono do tratamento por parte dos pacientes (Blaas et al., 2008; Gandhi et al., 2006; Ollé-Goig, 2006; Shah et al., 2017).

No decorrer da infecção, as micobactérias são capazes ainda, de se utilizar do metabolismo lipídico do hospedeiro em benefício de sua permanência. Os ácidos graxos e, principalmente o colesterol, são moléculas chave nesta interação, podendo ser convertidos em energia via β -oxidação ou ainda, utilizados para síntese e manutenção das membranas e parede celular das bactérias durante sua proliferação e colonização dos tecidos, podendo ainda, inibir vias de autofagia que poderiam conter a infecção e modular o metabolismo lipídico da célula hospedeira (Lovewell, Sassetti, & VanderVen, 2016).

Células de animais infectados por *M. Bovis* BCG apresentaram aumento do número de corpúsculos lipídicos, foi vista a proximidade entre corpúsculos e fagossomas em tempos iniciais de infecção, utilizando eletrônica de transmissão. Já em tempos mais tardios, foram vistos bacilos dentro dos corpúsculos lipídicos em monócitos humanos infectados com *M. tuberculosis*. De forma similar, em infecção por *M. leprae* em células de Schwann foram vistos bacilos totalmente revestidos pelos corpúsculos lipídicos, foi visto ainda, em biópsias de pele de pacientes, a presença de ADRP e perilipinas tanto nos corpúsculos lipídicos como na membrana dos fagossomas, indicando interação entre estas organelas (C. M. C. Fremond, Nicolle, Torres, & Quesniaux, 2003) (D'Ávila, Almeida, Roque, Castro-Faria-Neto, & Bozza, 2007; Robenek et al., 2006) (P. E. Almeida et al., 2009a) (Patrícia E. Almeida et al., 2014; Toledo et al., 2016)

1.1.2 Imunopatogenia da tuberculose

A disseminação da tuberculose acontece através de aerossóis contaminados com bacilos *Mycobacterium tuberculosis* podendo incluir uma gama de espécies filogeneticamente associadas (McClellan & Tobin, 2016). Uma vez chegados ao sítio primário de infecção, os pulmões, os bacilos são fagocitados por macrófagos alveolares residentes. Essas células constituem a principal linha de defesa contra infecções do trato respiratório, seguidas das células dendríticas que tem papel central na apresentação de antígenos para montagem de resposta adaptativa (McClellan & Tobin, 2016).

Em resposta à infecção, ocorre também a formação do granuloma. Granulomas são agregados celulares compactos formados por macrófagos ativados que visam conter a disseminação dos bacilos pelo tecido como pode visto na figura 2. Macrófagos infectados formam anéis concêntricos que circundam uma região central necrótica e rica em lipídeos. O perfil secretório associado à resposta do granuloma é caracterizado como anti-inflamatório na região mais externa, com produção de arginase e IL-4, sendo inflamatório na região mais interna da massa celular, com prevalência de óxido nítrico e TNF (Stamm, Collins, & Shiloh, 2015). O perfil secretório do granuloma é capaz de recrutar e promover a agregação de diversos tipos celulares, tais como linfócitos, neutrófilos, células dendríticas e células natural killers (NK). O desenvolvimento do granuloma pode ter tanto um efeito protetor para o hospedeiro, quanto fornecer um nicho de proliferação para as bactérias que podem se replicar no meio extracelular após a necrose de uma célula infectada, voltando a infectar outras células posteriormente (Clay, Volkman, & Ramakrishnan, 2008; Ehlers & Schaible, 2012; Gideon et al., 2015; Russell, 2007).

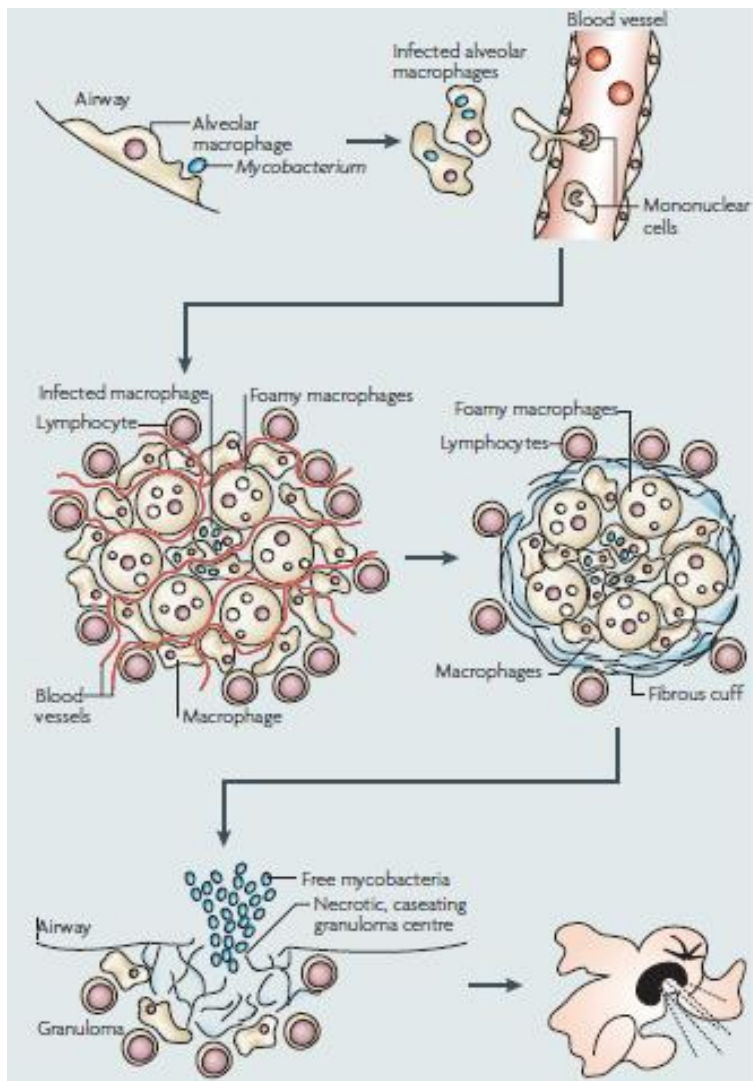


Figura 2. Patogenia da tuberculose. A transmissão da tuberculose se dá pela inalação de aerossóis contaminados, no pulmão as bactérias são fagocitadas pelos macrófagos alveolares induzindo uma resposta pró inflamatória local que estimula o recrutamento de células mononucleares dos vasos sanguíneos vizinhos. O granuloma consiste em um núcleo de macrófagos infectados envolvidos por células espumosas e linfócitos. A região mais periférica possui ainda associações com colágeno e outras moléculas de matriz extracelular que a envolvem e são capazes de formar regiões fibróticas em tempos mais prolongados de desenvolvimento da doença (Russell, 2007).

Os microorganismos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (complexo MTB) que incluem os agentes etiológicos da tuberculose humana e bovina, são patógenos intracelulares que, ao longo da história, evoluíram de forma concomitante aos seus hospedeiros, esse tempo de interação prolongado lhes permitiu desenvolver uma ampla gama de estratégias de defesa para a sobrevivência dentro das células do sistema imune, responsáveis por destruí-los para controlar a infecção. Essa co-evolução tendeu a favorecer os fenótipos de patógenos que

provocavam maior tempo de latência e conseqüentemente maior tempo de viabilidade e proliferação no organismo hospedeiro, colaborando para a natureza crônica da doença e para a suas altas taxas de prevalência (Brites & Gagneux, 2012; C. H. Liu, Liu, & Ge, 2017).

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

A parede celular é uma estrutura chave para permanência e desenvolvimento no hospedeiro das bactérias do complexo MTB. Sua composição é complexa, a membrana plasmática é envolvida por 3 camadas, a primeira é uma rede intercruzada e densa formada de peptidoglicano, seguida de um arabinogalactano altamente ramificado baseado em polissacarídeos e, mais externamente, uma camada de ácidos micólicos de cadeia longa. O complexo formado confere robustez ao microorganismo, além de atuar como fator de sobrevivência, crescimento, virulência e de reduzir a permeabilidade a antibióticos (Jankute, Cox, Harrison, & Besra, 2015; Russell, Mwandumba, & Rhoades, 2002).

As bactérias do complexo MTB possuem uma ampla gama de mecanismos de escape da resposta do hospedeiro. Incluindo a expressão de lipídeos em sua superfície, capazes de mascarar os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são reconhecidos pelos macrófagos. A indução de apoptose em células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos T, também é um mecanismo clássico de imunossupressão do hospedeiro vantajosa à permanência do patógeno. A interação dos componentes da parede celular com receptores associados à imunidade inata é capaz, ainda, de modular negativamente diversos braços chave da resposta incluindo apresentação de antígenos, apoptose de macrófagos bem

como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Dentre os mecanismos, o mais bem descrito e que tem importância central na sobrevivência do patógeno é impedir a formação do fagolisossomo, tornando o fagossomo um nicho de sobrevivência e proliferação bacterianas, há ainda o recrutamento do endossoma não maduro que fornece ferro que é um nutriente essencial à sobrevivência (Cambier, Falkow, & Ramakrishnan, 2014; Mahajan et al., 2012; Sharma, Sharma, & Bose, 2009; Stamm et al., 2015).

O complexo MTB possui, estruturalmente, uma complexa gama de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que incluem moléculas comuns a outros grupos de bactérias como peptídeoglicano da parede celular e ácidos nucleicos, como também moléculas únicas características do complexo. Algumas das moléculas específicas do complexo MTB mais relevantes para reconhecimento pelas células do sistema imune são: lipomanana (LM), lipoarabidomanana (LAM), manosilato (ManLAM) além do fator de secreção ESAT6, capaz e potencializar a virulência da infecção micobacteriana. Essas proteínas, entre outros componentes estruturais da micobactéria, podem ser reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que irão desencadear a montagem de resposta imune inata. Os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) estão presentes principalmente nas células do sistema imune como os macrófagos e as células dendríticas, responsáveis por detectar e combater as micobactérias mas, também constituem seus principais nichos de replicação (Stamm et al., 2015).

A resposta à infecção por micobactérias é capaz de ativar diversas vias de resposta. Durante a imunopatogenia da tuberculose alguns receptores de superfície mostraram-se importantes para o processo de fagocitose da micobactéria, O receptor do complemento 3 (CR), também denominado de CD11b ou CD 18, é visto como o de maior importância para a internalização de micobactérias. Há participação ainda dos receptores de manose (MR), *scavenger* e Mincle (*Macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin receptor*), capazes de promover sinalização necessária à fagocitose (Allen & Aderem, 1996; Velasco-Velázquez, Barrera, González-Arenas, Rosales, & Agramonte-Hevia, 2003)(Fenton & Vermeulen, 1996).

Os receptores de manose (MR) são lectinas do tipo C capazes de reconhecer manose, tem um papel importante na entrada das micobactérias nos macrófagos humanos. Dois dos mais abundantes produtos da parede celular das micobactérias, LAM e ManLAM, ligam aos receptores de manose C. Essa ligação estimula a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 bem como inibe a produção de IL-12. Também foi já descrito que, a interação desses receptores é capaz de inibir a formação do fagolisossomo, promovendo a infecção. Entretanto, camundongos deficientes de MR, não apresentam maior suscetibilidade à infecção, diferente do que acontece no humano. Sugerindo que os mecanismos de entrada da bactéria seriam distintos nas duas espécies (Chieppa et al., 2003; Kang et al., 2005; M. V. S. Rajaram, Ni, Dodd, & Schlesinger, 2014).

Os receptores semelhantes a Toll (TLRs) também estão envolvidos no reconhecimento de micobactérias e são uma das principais armas do hospedeiro contra patógenos invasores. Esses receptores fazem parte de uma família de pelo menos 13 receptores (Nilsen *et al.*, 2008). Os TLRs agem através do reconhecimento PAMPs, desencadeando a sinalização intracelular via receptor citoplasmático Toll/IL-1 (TIR) que após a associação com proteínas adaptadoras como o fator de diferenciação mielóide 88 (MYD88), *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β* (TRIF), *TIR domain-containing adapter protein, also known as MyD88-adapter-like* (TIRAP) ou *TRIF-related adapter molecule* (TRAM) ativam diferentes fatores de transcrição como, fator nuclear KB (NF-KB), fator regulador de interferon (IRF)3, IRF5 e IRF7 induzindo a expressão de uma variedade de citocinas, quimiocinas, moléculas coestimulatórias e interferon (IFN), importantes para a resposta adaptativa (Medzhitov & Janeway, 1997, Akira & Hoshino, 2003, Kawai & Itoh et al., 2014).

TLR2 tem afinidade por lipoproteínas, logo pode se ligar determinadas estruturas da parede celular micobacteriana: lipoarabinomannan (LAM), O precursor de LAM lipomannan (LM) e mannoylated phosphatidylinositol (PIM). Células de ovário de hamster chinês que super expressam TLR2, mas não TLR4, produzem TNF em resposta a PIM e LAM, bem como LM isolado da cepa virulenta de *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG ativa macrófagos murinos derivados de medula óssea a produzir TNF e IL-12. TLR4, em micobactérias, reconhece

uma série de lipídeos da parede celular, glicoproteínas e proteínas secretadas. Algumas dessas proteínas que sinalizam via TLR4 incluem proteínas de choque térmico, proteína ribossomal 50S de *Mycobacterium tuberculosis* e H37Rv, associada à detecção de micobactérias na pesquisa clínica (Bifani et al., 2000). TLR4 é capaz de sinalizar vias MYD88 independentes, sinalizando via TRIF e estimulando a secreção de IFN- β . TLR9 está localizado na membrana dos fagossomas e reconhece regiões de CpG no DNA de bactérias, inclusive micobactérias. Trabalhos recentes com humanos, encontram associações entre polimorfismos de TLR9 e a suscetibilidade a infecções micobacterianas, sugerindo que TLR9 teria papel importante na detecção inicial em infecções primárias em hospedeiros humanos (C. M. Fremond et al., 2007; C. M. C. Fremond et al., 2003; Ginhoux & Jung, 2014; Russell, Cardona, Kim, & Allain, 2010; Soilleux et al., 2002).

1.2. Inflamassomas

1.2.1. Receptores NOD like e inflamassomas: importância biológica

Na região citoplasmática existe uma família de receptores associadas também à imunidade inata que exercem ação protetora, denominada família de Receptores semelhantes a NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*). *Nod-like receptors* (NLRs) são uma família de proteínas intracelulares que desempenham um papel fundamental na regulação da resposta imune inata do hospedeiro. Existem 22 membros da família NLR em humanos e mais de 30 genes NLR em camundongos. NLRs são expressos em muitos tipos celulares, embora certos membros sejam expressos primariamente em fagócitos, incluindo macrófagos e neutrófilos. NLRs são proteínas multi-domínio, tri-partidas, compostas de: um domínio efetor N-terminal variável, que pode ser um domínio de recrutamento de caspase (CARD), domínio pirina (PYD), domínio ácido ou repetições de inibidor de baculovírus (BIRs); um domínio de nucleotídeo chamado de domínio NACHT (também chamado de domínio NOD), o qual é responsável pela capacidade de oligomerização entre NLRs e consequente ativação destes; e um domínio C-terminal de repetições ricas em leucina (LRRs) envolvido no reconhecimento de PAMPs ou DAMPs como visto na figura 6 (Martinon *et al.*, 2009; Franchi *et al.*, 2009).

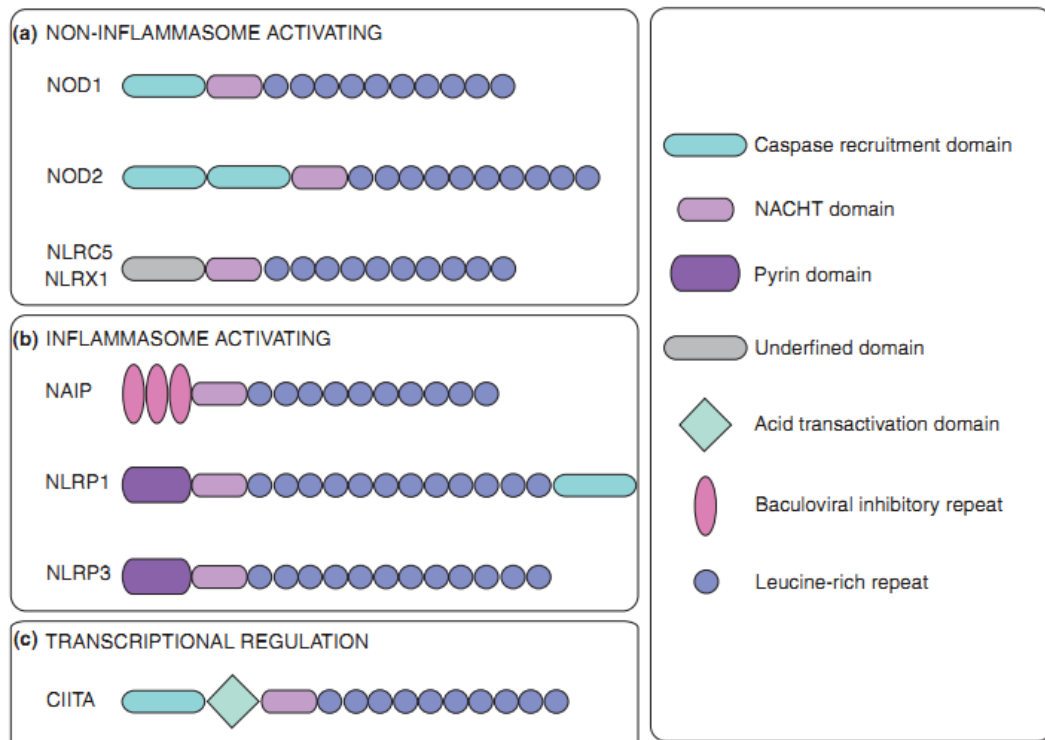


Figura 3. Diversidade de receptores semelhantes a NOD (NLRs). NLRs possuem diferentes estruturas e funções dentro das vias da imunidade inata e são compostos por diversos domínios que pode ou não variar (Magalhaes, Sorbara, Girardin, & Philpott, 2011).

Homólogos dos NLRs estão presentes em vertebrados e organismos filogeneticamente primitivos, tais como ouriços, que tem no seu genoma pelo menos 203 supostos NLRs. NLRs foram também identificados em plantas onde eles desempenham um papel crítico na resistência a doenças contra parasitos e bactérias. A conservação evolutiva da funcionalidade e estrutura dos NLRs sugere que eles desempenham uma importante função na defesa do hospedeiro. NLRs podem atuar como uma segunda linha de defesa para detectar patógenos capazes de escapar dos sistemas de detecção das superfícies celulares (Moreira e Zamboni, 2012; Eisenbarth & Flavell, 2009; Hibino *et al.*, 2006; Belkhadir *et al.*, 2004; DeYoung *et al.*, 2006).

Dentre os diferentes grupos de NLRs, há os conhecidos por não induzirem a formação do inflamassoma, são eles NOD1 e NOD2. NOD1 e NOD2 são proteínas multi-domínio consistindo de um ou dois domínios CARD, respectivamente, um domínio NOD localizado na região central, seguido por determinado número de LRR C-terminais. NOD1 é expresso amplamente em muitos tipos celulares e órgãos, já NOD2 é expresso em células como macrófagos, células dendríticas, células de Paneth, queratinócitos e células epiteliais do intestino, pulmão e cavidade oral (Takahashi *et al.*, 2006). NOD1 é responsivo a quantidades mínimas de peptidoglicano, sendo capaz de sinalizar pela via de NFκB e produzir uma resposta pró-inflamatória, os primeiros estudos que elucidaram este mecanismo utilizaram a bactéria gram negativa *Helicobacter pylori* como modelo para estudo com patógenos e verificaram uma resposta de aumento de produção de interferon tipo I NOD1-dependente. Camundongos deficientes para o receptor de interferon são mais suscetíveis à infecção por *Helicobacter pylori*, esses dados sugerem participação importante da NOD1 na sinalização da via de interferon (Viala *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2010).

NOD2 é o mais bem caracterizado membro da família NLR e detecta o dipeptídeo murâmico do peptidoglicano da parede celular de bactérias, além disso foi descrito que esta proteína estaria também envolvida em vias de combate a infecções de parasitas e virais. NOD2 foi capaz de mediar a produção de interferon em células estimuladas com fitas simples de DNA e no controle da infecção *in vitro* de *Toxoplasma gondii* (Sabbah *et al.*, 2009; Shaw *et al.*, 2009)

Em infecções bacterianas, após o reconhecimento microbiano, NOD1 e NOD2 sofrem mudanças conformacionais, que resultam em oligomerização via domínio NOD. Essa oligomerização favorece o recrutamento direto da serina-treonina quinase RIP2 (*Receptor-Interacting Protein 2*) através de interações CARD-CARD, pelo mecanismo de proximidade induzida. RIP2 recruta TRAF6, que ativa TAK1 que ubiquitina IKK, que fosforila o inibidor IκB, levando à sua degradação via proteassoma, liberando NF-κB e permitindo sua translocação para o núcleo. Ativação de Nod1 e Nod2 também pode ativar MAP quinases, como p38, ERK, JNK (Moreira & Zamboni, 2012).

A partir da sinalização via determinados NLRs pode haver a montagem do inflamassoma. A palavra Inflamassomo é formada pela reunião da palavra inflamação, que remete à função do complexo, com o sufixo “somo” do grego significa corpo (Martinon *et al.*, 2009). O termo inflamassomo foi cunhado em 2002 para descrever complexos multi-protéicos formados no citosol após estimulação por PAMPs ou DAMPs. São compostos por um NLR, uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) e a forma ativa de caspase-1. Através da ação proteolítica de caspase-1, essa plataforma molecular cliva citocinas sem peptídios sinais tradicionais resultando em sua secreção. Os inflamossomos tem a habilidade de transformar pro- IL-1 β , pro-IL-18 e, em alguns casos, pro-IL-33 em suas formas ativas resultando em sua secreção e potente resposta inflamatória associada com essas citocinas que culmina em um tipo de morte celular denominada de piroptose, a figura 7 mostra a estrutura simplificada do inflamassoma NLRP3 e alguns dos ativadores descritos para essa plataforma molecular (Martinon *et al.*, 2002).

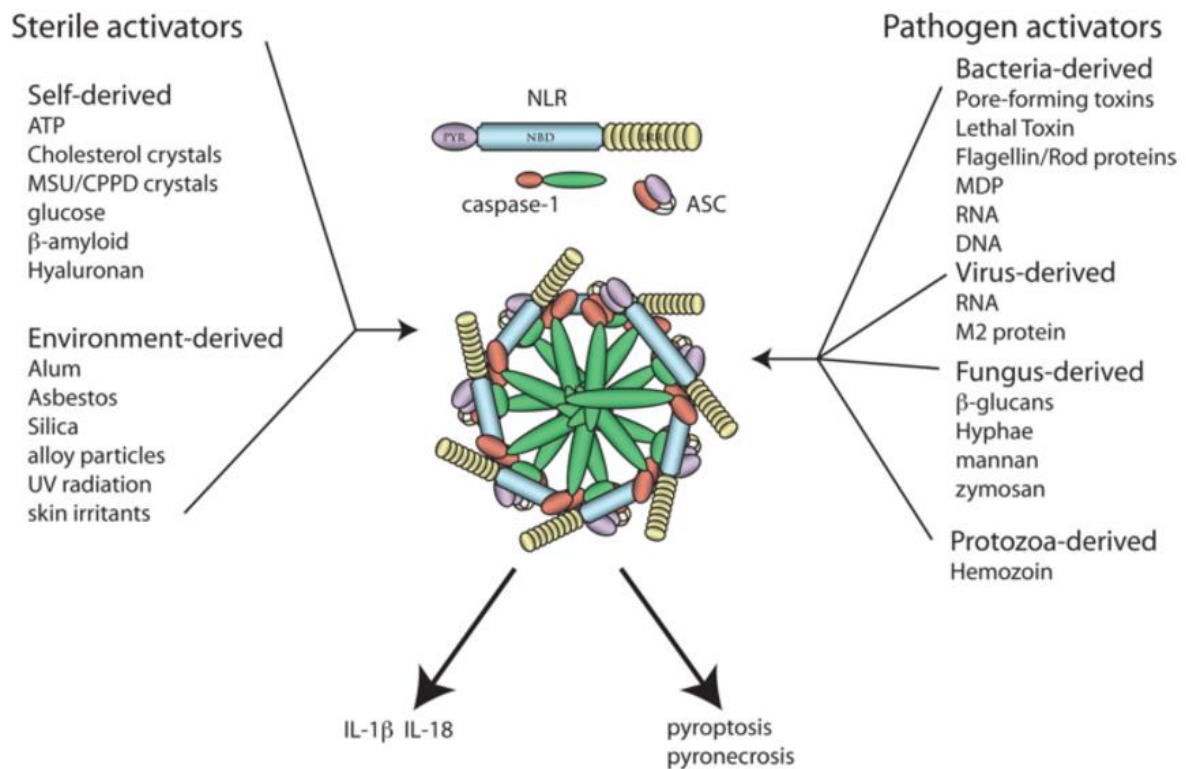


Figura 4. Ativadores clássicos do inflamassomas, os derivados de patógenos (PAMPs) e derivados de próprio hospedeiro ou do ambiente (DAMPs). Inflamassomas podem ser ativados por diversas moléculas, tanto derivadas de bactérias, fungos, vírus ou protozoários quanto as derivadas do próprio metabolismo ou do ambiente, incluindo proteínas e radiações respectivamente. Pode-se verificar ainda, os componentes do inflamassoma, um NLR na região mais externa que responde aos padrões, a proteína adaptadora ASC na região mediana e a unidade proteolítica central, caspase-1 (Davis, BK., Wen, H., Ting, 2011).

Os inflamassomas são montados apenas em células que possuam abundância dos componentes necessários. A maior parte das células não expressam todos os componentes requeridos para ativação dos inflamassomas, necessitando estimulação anterior ou sensibilização (Martinon *et al.*, 2009). Para que haja sinalização via agonistas de NLRs, é necessário um “primeiro sinal”, que seja capaz de induzir a síntese das pró-citocinas e permita posterior ação do complexo do inflamassoma. O primeiro sinal é normalmente realizado por cooperação entre PRRs, podendo ocorrer por sinalização via agonistas de TLRs ou ação de NOD1 e NOD2, ambos capazes de ativar NFκB e sua translocação para o núcleo seguida da ativação de genes e geração das pró-formas das proteínas IL-1β, IL-18 e IL-33 (Elinav, Strowig, Henao-Mejia, & Flavell, 2011). Ocorre então o segundo sinal, a ativação dos NLRs e a clivagem das citocinas para sua forma ativa de secreção, o

dito “segundo sinal”. Após a ativação e oligomerização de um NLR, ocorre acoplamento, via interações entre domínios CARD, de enzimas anteriormente denominadas ICE (*Interleukin-1 β -converting enzyme*) e atualmente chamadas de caspases. Os NLRs que não possuem o domínio CARD precisam do auxílio da molécula adaptadora ASC, que contém um domínio CARD e um PYD, e faz a ligação entre o NLR e Caspase-1. Na figura 7 podemos ver os principais ativadores de inflamassomas.

O reconhecimento dos DAMPs permite a detecção de um dano tecidual e, desencadeia a resposta inflamatória e de regeneração tecidual. Há recrutamento celular, liberação de mediadores solúveis e a modulação da expressão de diversas moléculas. Podendo haver a detecção tanto de microorganismos potencialmente patogênicos, quanto a presença de inflamações estéreis, onde não há presença de patógenos (Martinon, Mayor, & Tschopp, 2009). TLR4 reconhece a molécula de heme, como um DAMP, liberada em condições de hemólise ou dano celular extremo, e isso induz a liberação de TNF α e KC (Figueiredo et al., 2007). Ainda, o reconhecimento de LDL oxidado, outra molécula endógena, pelo receptor *scavenger* CD36 leva à geração de espécies reativas de oxigênio, que então, ativam NLRP3 e levam à síntese, processamento e liberação de IL-1 β (H. Q. Liu et al., 2013).

Caspase-1 é a unidade central proteolítica do complexo do inflamassoma. Caspases são proteases produzidas como zimogênios inativos cataliticamente e usualmente sofrem processamento proteolítico durante ativação. Após estimulação por uma variedade de sinais endógenos e microbianos, a molécula pro-caspase inativa é auto-ativada por ação proteolítica em um heterodímero enzimaticamente ativo composto de uma cadeia de 10kDa e uma de 20kDa (Franchi, Warner, Viani, & Nuñez, 2010). Caspases humanas podem ser divididas em dois diferentes grupos baseado em sua função biológica: caspases inflamatórias (caspase-1, caspase-4, caspase-5, caspase-11 e caspase-12) e caspases apoptóticas, (caspase-2, caspase-3, caspase-7, caspase-8, caspase-9 e caspase-10). O primeiro grupo é denominado inflamatório porque os principais substratos estudados até então são citocinas (tais como IL-1 β , IL-18 e IL-33). Sabe-se, porém, que há possibilidade de interação entre os grupos de caspases, significando que algumas destas proteínas podem não ser exclusivamente inflamatórias ou exclusivamente

apoptóticas. Recentemente foram descritos 121 substratos de caspase por análise proteômica, incluindo substratos relacionados ao metabolismo lipídico, alguns destes estão ilustrados na figura abaixo (Denes & Brough, 2012).

Existem ainda as vias não canônicas de ativação do inflamassomas, entre elas existe a via mediada por caspase-11. Essa via é descrita como importante no controle de bactérias gram negativas, tais como em *Escherichia coli* (Stowe, Lee, & Kayagaki, 2015), *Citrobacter rodentium* (Shi et al., 2017). Estudos in vitro demonstraram ainda que, caspase-11 é capaz de restringir a proliferação intracelular de *Salmonella typhimurium* e que animais nocautes para caspase-11 perdem a habilidade de controlar infecção por Salmonela (Aachoui et al., 2013).

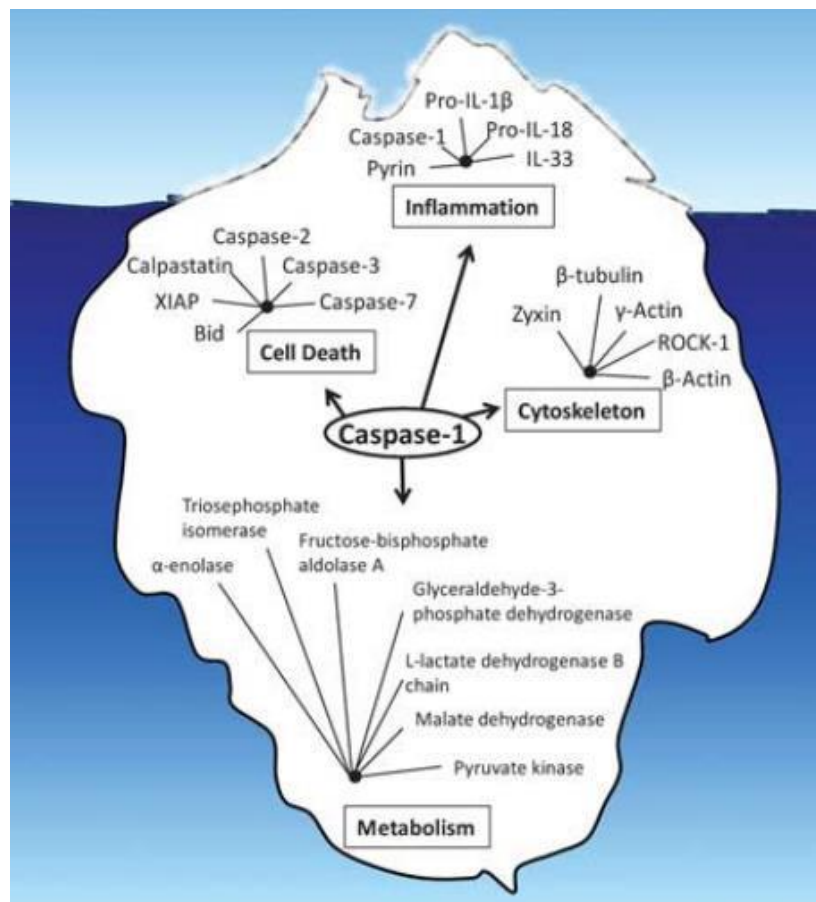


Figura 5. IL-1 β é somente a ponta do ICEberg. Alguns dos substratos descritos para Caspase incluem moléculas associadas a diversas funções como metabolismo celular, inflamação e morte (Denes & Brough, 2012).

1.2.2. O inflamassoma NLRP3

O inflamassoma NLRP3 é o mais estudado. Seu complexo forma-se em conjunto com a proteína adaptadora ASC e caspase-1, uma caspase inflamatória. NLRP3 é capaz de responder a estímulos diversos, associados a patógenos (PAMPs) a exemplo de LPS, RNA viral ou bacteriano. Pode responder ainda, a estímulos estéreis (DAMPs), como cristais de ácido úrico, ATP e substâncias particuladas como a sílica. A ação do inflamassoma converte as interleucinas à sua forma ativa. Os membros da família IL-1 não possuem o peptídeo sinal, e assim não são exportados para o meio extracelular pela via secretória clássica, como ocorre com outras citocinas. Ao invés disso, IL-1 α , IL-1 β , IL-18 e IL-33 possuem um pro-domínio na região N-terminal, com cerca de 30 a 100 resíduos de aminoácidos. No caso de IL-1 β e IL-18, o pro-domínio serve como substrato para caspase-1, gerando então a citocina madura (Smith, 2011). O sítio de clivagem para caspase-1 está presente somente na pro-IL-1 β de mamíferos, sendo ausente nas sequências de outros vertebrados (Denes & Brough, 2012).

IL-1 β é um dos mais potentes mediadores solúveis da inflamação. É produzida por vários tipos celulares, mas os estudos focam na produção por células imunes, principalmente por macrófagos (Denes & Brough, 2012). IL-1 β é mediadora de diversos efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório, incluindo febre, hipotensão, hipersensibilidade a dor inflamatória e a liberação de hormônios adrenocorticotróficos (Johnston, Rahman, & McFadden, 2007)

Já IL-18 não possui atividade pirogênica, diferente de IL-1 β . Atua sinergicamente com IL-12 para estimular células NK e T citotóxicas a produzir INF γ , que possui um importante papel na eliminação de vírus. IL-18 está, portanto, associada ao desenvolvimento de respostas tipo Th1 (Hoshino *et al.*, 1999). Mas, em ausência de IL-12, induz respostas tipo Th2, por promover a secreção de IL-4, IL-5 e IL-10, IL-18 tem ação sinérgica com IL-23 para induzir a secreção de IL-17 por células Th17 (Weaver *et al.*, 2006).

Além dessas citocinas, foi descrita ação de inflamassomas na liberação de mediadores lipídicos, como os eicosanoides, que são potentes moléculas bioativas, derivados de lipídios, como ácido araquidônico. Eles estão envolvidos em diversos fenômenos biológicos, como a produção de citocinas, diferenciação celular, proliferação, sobrevivência, migração, apresentação de antígenos e morte celular, dentre outros (Liu *et al.*, 2013). Utilizando um modelo da doença inflamatória gota *in vivo* e *in vitro*, Amaral *et al* mostraram que a injeção de cristais de ácido úrico, um ativador do inflamassomo NLRP3, induziu a rápida liberação de leucotrieno B4 (LTB4) e este foi importante para a produção de IL-1 β dependente de caspase-1. O mesmo aconteceu com macrófagos tratados com cristais de ácido úrico. Conclui-se que LTB4 modula a produção de espécies reativas de oxigênio induzida por ácido úrico e estes radicais ativam o inflamassoma NLRP3 (Kleinnijenhuis, Oosting, Joosten, Netea, & Van Crevel, 2011).

Verificou-se a ativação de NOD 2 por MDP em macrófagos leva ao aumento da liberação de prostaglandina E2 (PGE2), em função do aumento de ciclooxigenase (COX2) e PGE sintase. E o aumento da expressão de COX2 é dependente de p38 MAPK e mediado por IL-1 β . Esse estudo mostra ainda que a ativação de NOD2 não altera as vias que levam à biosíntese de leucotrienos (Liu *et al.*, 2013). Foi descrita ainda, interação entre inflamassomos e metabolismo lipídico em experimentos com a estimulação de macrófagos com ácidos graxos, ômega 3 impede a ativação do inflamassomo NLRP3 e inibe ativação subsequente de caspase-1 e secreção de IL-1 β . Especula-se então que estes ácidos graxos possam reprimir a inflamação e as doenças associadas, como gota, síndromes autoimunes e outras doenças associadas à ativação do inflamassomo NLRP3 (Yan *et al.*, 2013).

Os inflamassomas vem sendo descritos como importantes mediadores da resposta imune contra infecções micobacterianas, uma vez que animais nocautes IL18, IL-1 β e IL-1R são mais suscetíveis a infecções por *Mycobacterium tuberculosis* (Abdalla *et al.*, 2012; C. M. Fremont *et al.*, 2007; I. Sugawara, Yamada, Hua, & Mizuno, 2001; Isamu Sugawara *et al.*, 1999). Micobactérias virulentas tem a capacidade de inibir a formação do inflamassoma por mecanismos que ainda não foram bem elucidados, porém é descrito que há ativação de zinco

metaloproteinases (ZMP) capazes de inibir a ativação do inflamassoma NLRP3 e consequentemente reduz a atividade de Caspase-1 (Brodsky et al., 2010; Deretic, Delgado, Vergne, Master, & Haro, 2009; Galle et al., 2008). A inibição de Caspase-1 regula negativamente um braço importante da resposta anti-micobacteriano e promove um ambiente mais favorável para a continuidade da infecção, porém mais trabalhos são necessários para melhor compreensão dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na interação da bactéria com a célula hospedeiro.

Trabalhos recentes vêm demonstrando o impacto dos inflamassomas no metabolismo lipídico. Foi descrito que a proteína Caspase-1 teria papel importante na regulação do peso corporal e da homeostase da glicose (Davis, BK., Wen, H., Ting, 2011). Em modelo de adipócitos 3T3, foi verificado que a proteólise do fator PPAR γ seria Caspase-1 dependente, afetando negativamente a adipogênese e o metabolismo lipídico (Guilherme, Tesz, Guntur, & Czech, 2009). O aumento da secreção de IL-1 β , consequência da ativação do inflamassoma NLRP3, é capaz de regular negativamente a adipogênese (W. Liu, Yin, Zhou, He, & Dai, 2014), quando foram realizados experimentos com animais deficientes para a sinalização de IL1 verificou-se maior suscetibilidade à obesidade do que nos animais *wild type*, porém, quando os animais eram deficientes para o antagonista natural IL1 (IL1ra) eram protegidos da obesidade (Chida et al., 2008; García et al., 2006; Matsuki, Horai, Sudo, & Iwakura, 2003) demonstrando que a atividade dos inflamassomas pode interferir de forma importante no metabolismo lipídico e consequentemente na inflamação.

1.3. Corpúsculos Lipídicos

1.3.1. Estrutura e biogênese dos corpúsculos lipídicos

Os corpúsculos lipídicos, também conhecidos como gotas lipídicas ou adipossomos, são organelas citoplasmáticas de natureza predominantemente lipídica que estão presentes virtualmente todos os organismos, incluindo plantas, procarióticos e animais. O aumento em tamanho e número dos corpúsculos lipídicos é descrita em diversos processos infecciosos, alérgicos e inflamatórios. A formação de células espumosas, ricas em corpúsculos lipídicos, é uma característica associada a diversas patologias. O corpúsculo lipídico tem estrutura atípica, possuindo um núcleo composto por lipídeos neutros, envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos. Destaca-se ainda a presença de uma diversidade de proteínas que, vem sendo constantemente descritas, dentre elas temos proteínas estruturais como as perilipinas (PLIN1, PLIN2 (ADRP) e PLIN3 (TIP47)), enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, proteínas envolvidas no tráfego de membrana, bem como enzimas envolvidas em sinalização celular e síntese de mediadores lipídicos (Bozza, Magalhães, & Weller, 2009b; Martin & Parton, 2006).

Há três importantes teorias que hipotetizam a biogênese dos corpúsculos lipídicos, todas relacionam esse fenômeno intimamente com o retículo endoplasmático (figura 3). A primeira é conhecida como modelo do “brotamento”, no qual as enzimas envolvidas no metabolismo lipídico se acumulariam nas regiões específicas do retículo endoplasmático, favorecendo a síntese de novos lipídeos neutros baseados em colesterol e ácidos graxos, que se acumulam e formam uma massa hidrofóbica entre duas regiões do retículo. Quando crescem, atingindo um determinado tamanho, os corpúsculos nascentes são liberados para o citoplasma carregados de proteínas estruturais do retículo e envolvidos por uma monocamada de fosfolipídeos (figura 3A) (Martin & Parton, 2006; Murphy, 2001; Tauchi-Sato, Ozeki, Houjou, Taguchi, & Fujimoto, 2002).

Um modelo alternativo proposto teoriza que, os corpúsculos lipídicos se formariam preferencialmente ao longo do retículo endoplasmático em regiões compartimentalizadas em forma de cálice e não no interior do retículo. Uma série de experimentos de criofratura e microscopia eletrônica forneceram evidências de que haveria interação entre estruturas características de membrana do retículo e os corpúsculos lipídicos, sugerindo que corpúsculos poderiam acomodar proteínas transmembrana não apenas na periferia, como também em seu interior. As organelas formadas seriam repletas de proteínas como as da família PAT incluindo a adipofilina ou ADRP, clássica marcadora da presença dos corpúsculos lipídicos, que teria a função de transferir lipídeos do retículo para os corpúsculos nascentes como visto na figura 3B (Robenek et al., 2006). O último dos modelos proposto é modelo de “enovelamento”, no qual os corpúsculos lipídicos se formariam, por incorporação de domínios membranosos do retículo endoplasmático, contendo proteínas de superfície, proteínas transmembrana e ribossomos em seu interior, como visto na figura 3C (Rossana C.N. Melo, Paganoti, Dvorak, & Weller, 2013) . A figura 3 demonstra os três modelos de biogênese dos corpúsculos lipídicos de forma comparativa (Bozza, Magalhães, & Weller, 2009a).

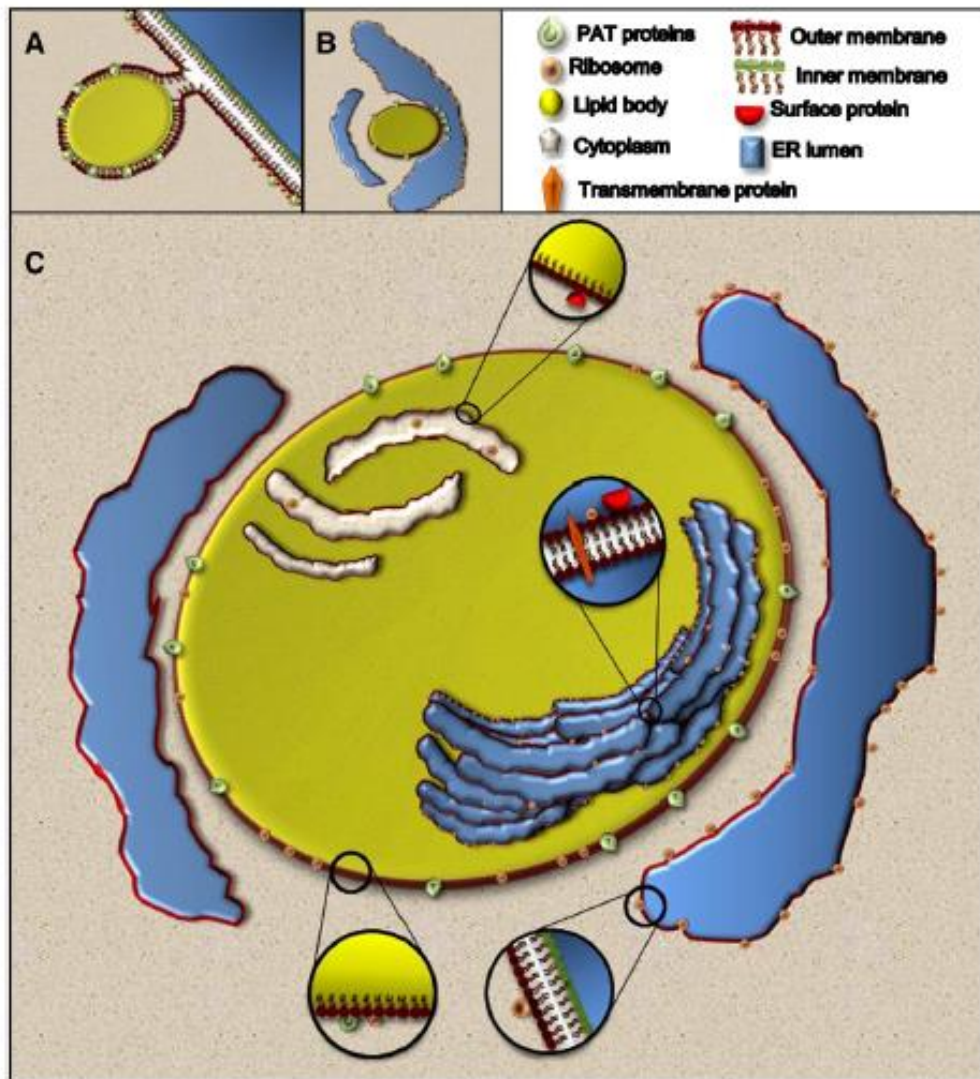


Figura 6. Biogênese e estrutura de corpúsculos lipídicos. Três modelos de biogênese de corpúsculos lipídicos ilustrados de forma comparativa: **(A)** formação de massa de lipídios neutros, sintetizada por enzimas e depositada entre as duas camadas da membrana do retículo endoplasmático, seguido pelo brotamento da estrutura lipídica para o citoplasma; **(B)** formação de corpúsculos lipídicos em domínios do retículo endoplasmático em forma de cálice e ricos em proteínas PAT, uma família de proteínas estruturais de corpúsculos lipídicos; **(C)** formação de corpúsculos lipídicos por incorporação de domínios membranosos do retículo endoplasmático, contendo proteínas de superfície, proteínas transmembrana e ribossomos em seu interior (no detalhe). Adaptado de BOZZA *et al.*, 2009.

1.3.2. Composição dos corpúsculos lipídicos

Estudos da composição proteica dos corpúsculos lipídicos através de diferentes técnicas, tem identificado diversas proteínas, algumas estruturais já descritas, como perilipina /PLIN1, proteína relacionada à diferenciação de adipócitos (ADRP/ adipofilina/ PLIN2) e a *tail-interacting protein 47kDa* (TIP47/PLIN3), estima-se que essas proteínas são responsáveis em revestir 15% da superfície dos corpúsculos lipídicos. Foram vistas ainda, proteínas relacionadas à homeostasia, estoque e metabolismo lipídicos, além de sinalização celular, como a proteína quinase C (PKC) e PI3 quinase, e tráfego de vesículas, como as RABs, bem como proteínas envolvidas na síntese de eicosanoides (Londos *et al.*, 1999, Hodges e Wu, Lass *et al.*,2006, Bartz e col., 2007, Wan *et al.*, 2007, Bozza *et al.*, 2009).

A biogênese de corpúsculos lipídicos ocorre mediada por diferentes estímulos em diferentes tipos celulares como ilustrado na figura 4, essa organela tem demonstrado ser sítio particularmente envolvido na metabolização do ácido araquidônico em eicosanóides. A ativação celular tanto por traumas mecânicos, peptídeos derivados de bactérias, alérgenos ou até mesmo citocinas inflamatórias é capaz de estimular a produção de eicosanoides, mediadores lipídicos do processo inflamatório. O ácido araquidônico, substrato para a síntese dos eicosanoides, encontra-se esterificado nos fosfolípidos (principalmente em eosinófilos) e lípidos neutros (monócitos e macrófagos) e não livre no citoplasma, a superfamília de proteínas fosfolipase A2 (PLA2) é responsável por reações que tornam esse substrato livre para ser processado pelas enzimas produtoras dos eicoisanóides, ciclooxigenase (COX), COX 1 constitutiva e COX 2 potencialmente induzida, além da lipoxigenase (LOX). Foi demonstrado por experimentos de microscopia eletrônica utilizando ácido araquidônico radioativo exógeno, a incorporação deste ácido araquidônico principalmente aos corpúsculos lipídicos, em macrófagos, eosinófilos, mastócitos, neutrófilos e células epiteliais (Bozza, Bakker-Abreu, Navarro-Xavier, & Bandeira-Melo, 2011; Plotkowski *et al.*, 2008; Pyne, Harvey, Galli, Cells, & Macglashan, 2017; Weller, Ackerman, Nicholson-Weller, & Dvorak, 1989; Weller, Monahan-Earley, Dvorak, & Dvorak, 1991).

<u>Estímulo</u>	<u>Tipo celular</u>
<i>Ácidos graxos</i> Insaturados, mas não saturados	Neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos
<i>Lipoproteínas</i> Ac-LDL/E-LDL/AGE-LDL/Ox-LDL, mas não LDL nativo	Macrófagos, mas não neutrófilos
<i>Moléculas derivadas de patógenos</i> LPS/LAM	Macrófagos, neutrófilos
<i>Mediadores lipídicos</i> PAF, mas não lisoPAF	Neutrófilos, eosinófilos e macrófagos
5-HETE	Neutrófilos
PGD ₂	Eosinófilos, mas não macrófagos
<i>Hormônios</i> Leptina, resistina	Macrófagos
<i>Citocinas/fatores de crescimento</i> IL-5, GM-CSF, IL-16	Eosinófilos
<i>Quimiocinas</i> RANTES/eotaxina/ eotaxina 2/ eotaxina 3	Eosinófilos
MCP-1	Macrófagos

Figura 7. A biogênese de corpúsculos lipídicos é estímulo-dependente. Os corpúsculos lipídicos são formados em diferentes tipos celulares, mediados por estímulos diversos. Certos tipos celulares, nota-se, são propensos a produzir corpúsculos com diversos estímulos (Adaptado de BOZZA *et al.*, 2009).

A enzima fosfolipase A2 citoplasmática (cPLA₂), mediador essencial para a síntese de eicosanoides, localiza-se preferencialmente na região externa dos corpúsculos lipídicos e não no centro destas organelas. O aumento da síntese de eicosanoides é altamente sensível à inibição de cPLA₂ sugerindo que os lipídeos dos corpúsculos seriam mobilizados para a síntese de eicoisanóides. De forma interessante, a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de secretar uma toxina, ExoU, que induz a mobilização dos corpúsculos lipídicos e consequente secreção de ácido araquidônico que é convertido em prostaglandina E2 (PGE₂). A inibição da ação de cPLA₂ ou a infecção por bactérias ExoU depletadas não é capaz de mobilizar a conteúdo lipídico dos corpúsculos, portanto é sugerido que a utilização do conteúdo dos corpúsculos lipídicos do hospedeiro estaria associada ao mecanismo patogênico de *P. aeruginosa* (YU *et al.*, 1998; MOREIRA *et al.*, 2009; WOOTEN *et al.* 2008; BOZZA *et al.*, 2001).

Diversas enzimas envolvidas na síntese dos eicosanóides foram localizadas nos corpúsculos lipídicos, sendo 5-lipoxigenase (5-LO), 15-lipoxigenase e COX preferencialmente encontradas no núcleo dessas organelas. Já outras proteínas são vistas associadas à membrana, como Leucotrieno B4 sintase (LTC-4 sintase) e Prostaglandina sintase (PGE sintase). A localização das proteínas pode variar de acordo com o grau de ativação da célula, bem como com o tipo celular. Em eosinófilos, a localização de 5-LO é principalmente citoplasmática. Porém frente a um estímulo inflamatório pode haver a realocação desta proteína para os corpúsculos lipídicos. Essa redistribuição é estimulada, inclusive, pela adesão ao substrato durante o processo de ativação. A figura 5 demonstra diversas proteínas associadas aos corpúsculos lipídicos e suas respectivas funções descritas.

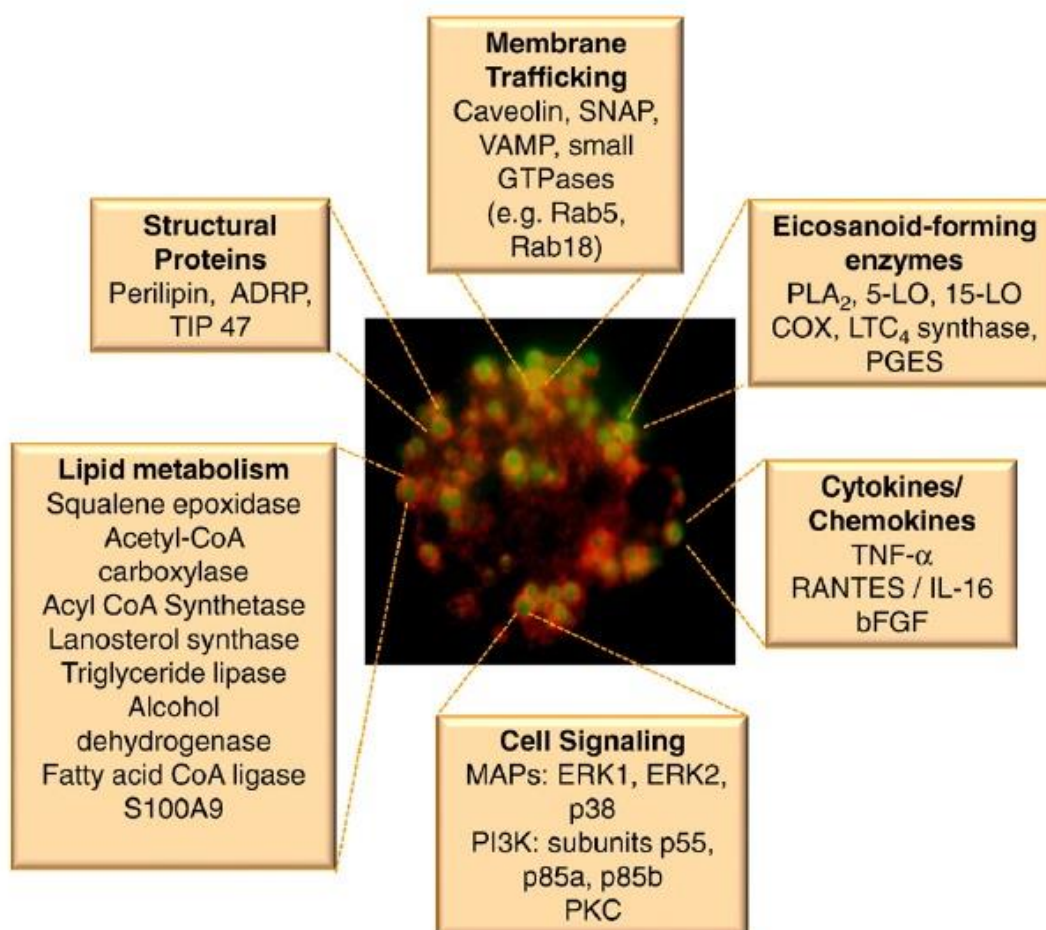


Figura 8. Diversidade de proteínas encontradas nos corpúsculos lipídicos. Os corpúsculos lipídicos são sítios que compartimentalizam uma gama de proteínas associadas a uma diversidade de funções, entre elas destacam-se sinalização celular, metabolismo lipídico e enzimas formadoras de eicosanoides (Adaptado de BOZZA *et al.*, 2009).

1.3.3. Corpúsculos Lipídicos: importância biológica durante a infecção

O acúmulo intracelular de lipídios em corpúsculos lipídicos está associado a doenças de grande relevância para a saúde pública, incluindo doenças inflamatórias, infecciosas, neoplásicas. Em quadros infecciosos, os corpúsculos lipídicos demonstram papel importante para a patogenia das doenças. Patógenos intracelulares seriam capazes de utilizar os corpúsculos lipídicos como mecanismo de permanência. Foi mostrado que *Trypanosoma cruzi* seria capaz de provocar a interação corpúsculo-vacúolo parasitóforo, foram encontrados também, utilizando-se a ferramenta de microscopia eletrônica, corpúsculos dentro dos fagossomas, que serviriam como importante fonte de carbono para a permanência dos parasitos (R. C.N. Melo, Ávila, Fabrino, Almeida, & Bozza, 2003). Verificou-se comportamento similar em infecções por *Chlamydia trachomatis* onde, por microscopia confocal foi visto tanto o aumento do número de corpúsculos lipídicos como também, a interação dessas organelas com os fagossomas (Kumar, Cocchiari, & Valdivia, 2006).

Mycobacterium bovis BCG, *Mycobacterium tuberculosis*, mas não *Mycobacterium smegmatis*, são capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos, através de um mecanismo dependente de sinalização via Toll-Like-receptor 2 (TLR2) (D'Avila et al 2006, Almeida et al., 2009). Esse perfil favorece a permanência da bactéria já que torna disponível grande quantidade de fontes de carbono, além de participar da modulação da resposta do hospedeiro através da produção de mediadores inflamatórios imunomodulatórios (P. E. Almeida et al., 2009a; Patrícia E. Almeida et al., 2014; M. Rajaram & Brooks, 2010). Como descrito por Almeida e colaboradores em 2009, animais nocautes para TLR 2 apresentavam drástica redução na expressão de PPAR γ induzida pela infecção por BCG em macrófagos. BCG falhou em induzir a expressão de PPAR γ nestes modelos, em contraste aos elevados níveis de PPAR γ detectados em animais *wild type*, nos quais foi verificado significativo aumento em 2 horas e o pico de indução da expressão de PPAR γ em 24 horas. Sugerindo participação importante de TLR2 na sinalização que culmina no aumento da expressão de PPAR γ no modelo *in vitro* de infecção de macrófagos por *M. bovis* BCG (P. E. Almeida et al., 2009).

Fatores solúveis de cultura de *Mycobacterium leprae* foram capazes de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos de maneira semelhante à infecção com a bactéria viva, contudo esse fenômeno não foi observado em células de Schwann. Dessa forma, tem sido demonstrado que a indução dos corpúsculos lipídicos não depende somente da direta interação entre o patógeno e a célula do hospedeiro, mas também há mecanismos de amplificação desse fenômeno como componentes bacterianos, bem como quimiocinas e citocinas geradas pelo hospedeiro (TRIVEDI *et al.*, 2004; DANIEL *et al.*, 2011, D'AVILA *et al.*, 2007, MATTOS *et al.*, 2010).

Foi visto em trabalhos anteriores do grupo que o inflamassoma NLRP3 poderia modular negativamente a biogênese dos corpúsculos lipídicos. Animais nocautes para a proteína adaptadora ASC bem como os nocautes para caspase-1 quando infectados com BCG, demonstraram um número de corpúsculos lipídicos aumentado em relação aos animais *wild type* também infectados com BCG. Esses dados sugerem uma relação entre os corpúsculos lipídicos e o inflamassoma NLRP3 durante a infecção por BCG em macrófagos derivados de medula óssea murina (Freitas, 2014), entretanto o papel dos corpúsculos lipídicos nos mecanismos de ativação do inflamassoma ainda não foram caracterizados.

2. HIPÓTESE:

Os **corpúsculos lipídicos** poderiam modular a montagem de **inflamassomos** e consequentemente a resposta inata do organismo hospedeiro, servindo de sítios de localização de proteínas envolvidas na via dos **NLRs**, participando da formação e/ou ativação de **inflamassomos**.

3. OBJETIVOS:

3.1. Objetivo geral:

Estudar a possível interação entre Inflamassomos e corpúsculos lipídicos durante a infecção de macrófagos derivados de medula óssea murina infectados por BCG.

3.2. Objetivos específicos:

- I. Caracterizar a presença de proteínas do inflamassoma NLRP3 nos corpúsculos lipídicos: NLRP3, ASC e Caspase-1
- II. Verificar se e como a biogênese dos corpúsculos lipídicos seria capaz de regular atividade do inflamassoma NLRP3.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Animais:

Os camundongos C 57 black 6 (C57BL/6) selvagens, pesando 20-25g, machos, foram obtidos na Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura (22-24°C), luminosidade (ciclo claro/escuro de 12h), com livre acesso a água e ração. Todos os protocolos foram aprovados pelo comitê e ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA Nº L-007\2015).

4.2. *Mycobacterium bovis* BCG:

Ampolas de *Mycobacterium bovis* BCG cepa Moreau (Fundação Atauilpho de Paiva, Brasil) (Andrade *et al.*, 2005) foram mantidas a 4°C e o liofilizado foi hidratado em salina com 0,05% de tween 80 (Sigma) imediatamente antes do uso. Foi feita a ressuspensão do conteúdo da ampola em 4 ml da solução de salina com Tween 80, após minutos de hidratação, a solução foi homogeneizada até que não houvesse mais nenhum grumo visível, posteriormente a solução é alíquotada em 4 microtubos com 1ml cada um e centrifugada por 10 minutos a 10.000 G e 4 graus. Em seguida o sedimento de cada tubo foi ressuspensão em 1 ml de solução de salina + tween 80 e passado numa seringa. Após a ressuspensão em salina com tween, o BCG foi passado em seringa com agulha de 27,5 G, 10 vezes e sonificado por 30 segundos para desfazer possíveis grumos remanescente. Foi realizado ainda, um ensaio para verificar a viabilidade dos bacilos.

4.3. Diferenciação dos Macrófagos a partir de Medula óssea Murina:

Os camundongos C57 Black 6 foram eutanaziados e tiveram os ossos das patas traseiras removidos (fêmures e tíbias), epífises cortadas e as medulas ósseas removidas por lavagem com meio de cultura BMM (Bone Marrow Macrophage) : 60% RPMI 1640 (GIBCO), 20% de soro fetal bovino (SFB- GIBCO), 18% de sobrenadante de célula L929 (rico em M-CSF, Macrophage Colony Stimulation Factor), 1% de L-glutamina (GIBCO) e 1% de Penicilina/Estroptomicina (P/S) (HyClone). Após o lavado dos ossos, a solução obtida foi homogeneizada e plaqueado 1 ml de solução homogênea de células + 10 ml de meio BMM por placa de petri. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. Após 3 dias de cultivo, as placas receberam adição de 10 mL de meio BMM. Após mais 3 dias de incubação, os sobrenadantes foram descartados e os macrófagos já diferenciados foram removidos das placas por lavagem com PBS 1x gelado e uso do Cell Scrap, contados e plaqueados na proporção e frasco adequados ao experimento a ser realizado, foram utilizados 0,2 x10⁶ macrófagos por poço de placa de 24 poços com lamínulas para imunocitoquímica, 2 x10⁶ macrófagos por poço da placa de 6 poços para western blot e 25 x10⁶ de macrófagos para garrafa de 150 cm². O meio utilizado para plaqueamento é composto por RPMI 1640 com 2% de SFB, 1% de L-glutamina, 1% de P/S e as células plaqueadas foram mantidas em repouso na estufa por 24 horas antes do início da infecção.

4.4. Tratamento com C75:

Os macrófagos dos grupos que utilizaram a droga C75 (Cayman), inibidora da enzima ácido graxo sintase, foram tratados meia hora antes do estímulo com BCG e o tratamento foi mantido durante todo o cultivo. A droga foi diluída em meio RPMI 1640 com 2% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina & streptomicina, sua concentração de uso foi 1,5 µg /mL

4.5. Infecção dos macrófagos:

Após 24 horas do plaqueamento, os macrófagos foram infectados com BCG MOI 2, diluída em salina estéril + 0,05 % de tween 80, por 24 horas. Os cálculos para ajuste do MOI utilizaram os valores de unidades formadoras de colônia (UFC) por ml fornecidos pelo laudo do fornecedor. Os experimentos foram todos feitos com taxas de viabilidade de 90% ou mais.

4.6. Coloração de tetróxido de ósmio e contagem de corpúsculos lipídicos:

Após a infecção, as células em lamínulas foram fixadas com formalina 3,7% por 10 minutos. A formalina foi removida e as células lavadas com água destilada por 2 vezes. Adicionou-se então 5 gotas de ácido cacodílico 0,1 M (SIGMA) e uma gota de tetróxido de ósmio (TedPella) 1,5% e incubou-se por 30 minutos protegendo da luz. Ao fim desse tempo, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com água e incubadas por 3 minutos com TCH 50mg (Tiocarbohidrazida - SIGMA) em 5 mL de água (10mg/ mL). Após mais duas lavagens com água, as lamínulas foram incubadas novamente com ácido cacodílico e ósmio por 5 minutos e depois montadas com meio de montagem Entellan (MERCK). A contagem de corpúsculos lipídicos foi feita em microscópio óptico com objetiva de 100x e imersão (aumento de 1000 x), foram contadas 50 células em cada lamínula e cada variável foi feita em triplicata.

4.7. Coloração com Oil-Red-O (ORO):

Após a infecção pelo tempo determinado, o meio foi cuidadosamente retirado e os poços foram lavados com PBS à temperatura ambiente, então usa-se formalina 3,7% para fixar por 15 a 20 minutos seguida de duas lavagens com PBS. A coloração foi realizada utilizando 300µL de ORO recém preparado por 2 a 5 minutos, seguidos de 500µL de isopropanol 30% para cada poço, retirando rapidamente. Após todo o processo de coloração as células foram lavadas mais 5 vezes com PBS e montam-se as lâminas usando vectashield com DAPI.

4.8. Imunofluorescência:

Após a fixação por 15 minutos com formalina 3,7%, as células foram lavadas com PBS, 3 vezes, por 5 minutos em cada lavagem. A permeabilização das membranas celulares foi feita com PBS-Triton 0,1% por 20 minutos, temperatura ambiente. Após 3 lavagens, houve bloqueio de ligações inespecíficas com PBS-BSA 0,2% por 30 minutos, temperatura ambiente. Após uma lavagem de 10 minutos, as células foram incubadas com os anticorpos de interesse: anti-adipophilin (ADRP) 1:400 (FITZGREALD); anti-ASC 0,5 µg/mL, anti-caspase-1 0,4 µg/mL, anti-NOD2 0,8 µg/mL, anti-IL-1β 0,8 µg/mL anti-Criopirin NLRP3 0,8 µ. Os anticorpos primários foram diluídos em PBS e incubados por 18 horas a 4°C. As células foram lavadas 3 vezes por 5 minutos cada lavagem, seguida de incubação de 1 hora, temperatura ambiente, com anticorpos secundários: anti-guinea pig CY2 (ADRP), rabbit anti-goat CY3 1:4000 (NLRP3), anti-rabbit Dylight 549 1:2000 (Jackson ImmunoResearch). Após 3 lavagens, as lâminas foram montadas com Prolong Gold com DAPI (INVITROGEN) e observadas em microscópio confocal (OLYMPUS FV10i-O), as imagens foram feitas utilizando o software FV10-ASW 2.1.

4.9. Western Blot:

As células foram lisadas com tampão de lise (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM de NaCl, 0,5% Triton X-100, 10% glicerol (v/v), 10 mM DTT, 0,1 mM de EDTA, coquetel de inibidores de proteases). As amostras foram aplicadas em gel de poli(acrilamida) de 1,5 mm e 15% de acrilamida. Depois da corrida e da transferência das amostras para membranas de nitrocelulose, as mesmas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em TBS (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) com 0,1% Tween 20 (TBS-T). As membranas foram incubadas com os anticorpos de interesse por 18 horas, 4°C, sob agitação, diluídos em tampão de bloqueio: anti-adipofilina (ADRP) 1:500 (Fitzgeralds); anti-β-actina 1:20000 (SIGMA); anti IL-1β 1:500 (Santa Cruz). Seguiram-se lavagens das membranas com TBS-T (5 vezes de 2 minutos) e incubação com anticorpos secundários conjugados a HRP (*hoseradish peroxidase*) em tampão de bloqueio, por uma hora, sob agitação. Por fim as membranas foram lavadas 5 vezes com TBS-T e 3 vezes com TBS, por 2 minutos cada, e seguiu-se a

detecção dos complexos antígeno-anticorpo com Supersignal Chemiluminescence (Pierce).

4.10. Dosagens de citocinas por ELISA:

Os níveis de IL-1 β secretadas pelas culturas celulares foram avaliadas por ELISA, seguindo instruções do fabricante (Duo Set Kit, R&D Systems).

4.11. Análise Estatística:

Os resultados representam as médias, erros padrões das médias dos valores obtidos nos diferentes testes. As diferenças estatísticas foram determinadas por análise da variância (ANOVA), seguida pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, sendo valor de P <0,05 tomado como estatisticamente significativo.

4.12. Reação em cadeia da polimerase (PCR):

Macrófagos de medula óssea murina foram lisados em 1ml de Trizol® (catálogo [15596018](#), ThermoFischer), seguidos de centrifugação à 12000g x 10min x 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo de polipropileno de 1,5ml. Após adição de 0,2ml de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas à 12000g x 15 minutos x 4°C e a fração aquosa transferida para novo tubo de polipropileno de 1,5ml. Após adição de 0,5ml de isopropanol, as amostras foram armazenadas à -80°C/16h para precipitação de RNA. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12.000g x 20 min x 4°C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 0,5ml de etanol 75%, seguido de centrifugação à 10.000g x 10 min x 4°C (este processo foi realizado três vezes). O *pellet* de RNA foi deixado à temperatura ambiente até evaporação total do etanol e depois ressuscitado em 10 μ l de água DEPC. A quantificação do RNA total foi feita em espectrofotômetro NanoDrop 2000®, utilizando as razões A260/A280 e A260/A230 como critério de análise de qualidade da amostra. Com intuito de eliminar contaminação de DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase, por meio do kit TURBO™ DNase (catálogo: AM2238, Ambion) de acordo com instruções do fabricante. A síntese de DNA complementar foi feita a partir de 1 μ g de RNA, com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis for*

RT-PCR (Applied Biosystem) ou o kit *SuperScript II First-Strand Synthesis for RT-PCR* (Applied Biosystem), também de acordo com instruções do fabricante. A análise da expressão gênica de amostras de tecido adiposo humano e murino foi realizada através da técnica de PCR em tempo real (do inglês *Real Time Quantitative Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction, qRT-PCR*). Como controle normalizador da reação foi utilizado o gene constitutivo β -actina. Foram utilizadas para estas reações sondas TaqMan® (Applied Biosystems) e o termociclador *Step One Plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). As reações foram feitas em duplicata para cada gene, utilizando 1 μ l de cada um dos diferentes cDNA, 0,5 μ l da sonda e 5 μ l de tampão universal *PCR MastermixTaqMan®*, gerando um volume final de 10 μ l. As condições da reação foram: 60°C por 2 minutos, seguido de 95° C por 10 minutos e 40 ciclos:95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A análise dos dados foi feita por meio do cálculo $2^{\Delta Ct}$, onde ΔCt é a diferença entre as médias das duplicatas de cada gene alvo e a média das duplicatas do controle endógeno (Livak e Schmittgen, 2001).

5. RESULTADOS

5.1. BCG é capaz de induzir a formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos

Para demonstrar que *Mycobacterium bovis* BCG é capaz de induzir a biogênese de corpúsculos lipídicos no modelo de macrófagos murinos derivados de medula óssea utilizados neste trabalho, foi realizada uma cinética de indução de corpúsculos lipídicos frente à infecção com BCG. O resultado mostra um aumento da biogênese de CLs significativo em todos os tempos testados em relação ao controle, sendo que o ponto de 24 horas mostrou o maior número de CLs em relação aos outros tempos (Figura 11). Foi feita uma curva de infecção com BCG com multiplicidade de infecção (MOI) de 1:1 até 1:4 macrófagos / bacilos, já que uma quantidade muito superior a essa seria prejudicial à viabilidade da cultura e verificou-se que a melhor MOI seria de 1:2 macrófagos / bacilos.

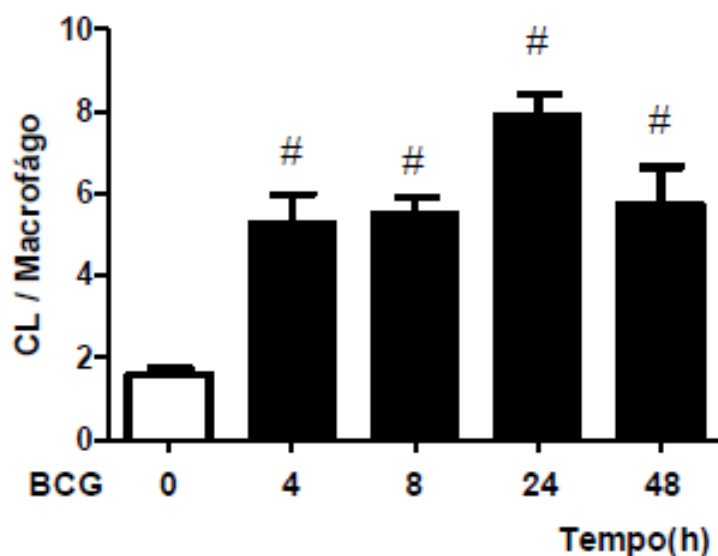


Figura 9. BCG induz a formação de corpúsculos lipídicos nos macrófagos derivados de medula óssea murina em diferentes tempos de infecção. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 em 4 tempos diferentes (4,8, 24 e 48 horas), O número de CLs foi quantificado através contagem em microscópio de campo claro após coloração com tetróxido de ósmio. Cada barra representa o número de corpúsculos lipídicos verificados nas células com a variação dos tempos e # representa variação estatisticamente significativa da biogênese de corpúsculos em relação ao controle. (Erro padrão da média de resultados de n = 3, p<0.05).

Para confirmar nossos dados de indução de corpúsculos lipídicos em macrófagos MOI 2 com tempo de infecção de 24 horas foi realizada uma coloração com Bodipy, sonda fluorescente verde que marca lipídeos neutros. Após a observação ao microscópio de fluorescência foi verificada a indução em relação ao controle, que recebe apenas o veículo de diluição das bactérias (figura 10).

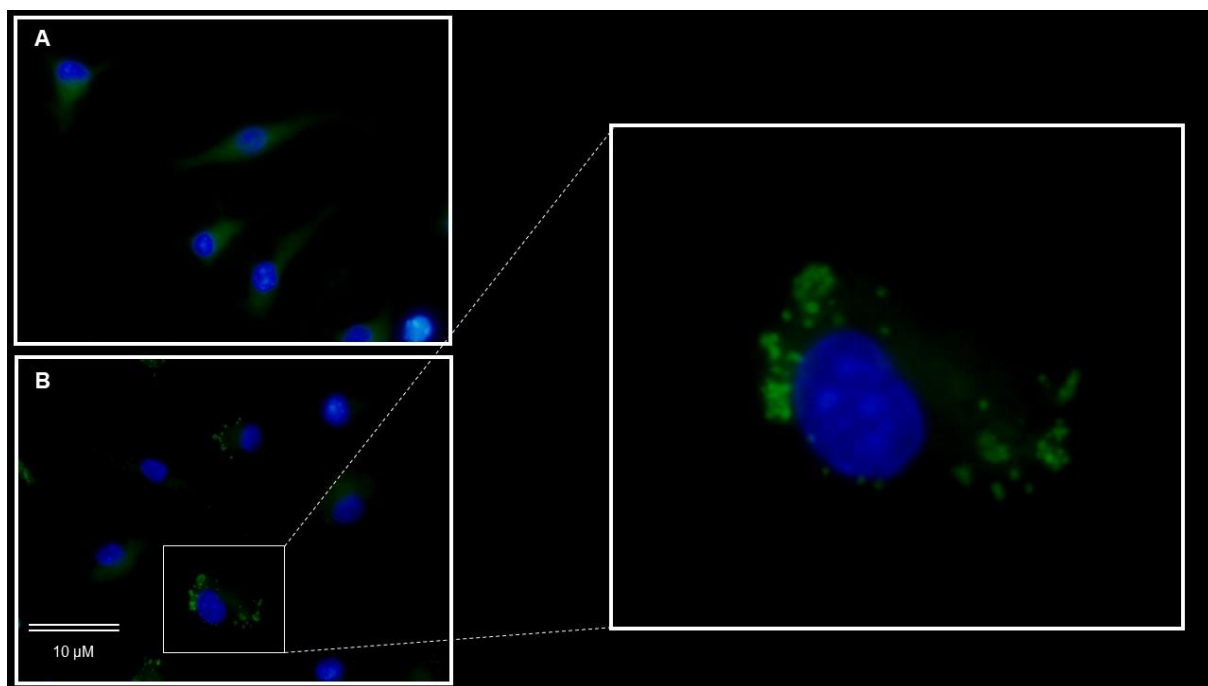


Figura 10. A infecção por BCG 24 foi capaz de induzir biogênese de corpúsculos lipídicos. Em (A) Controle, no qual não é verificada a presença de corpúsculos lipídicos, em azul, os núcleos corados com DAPI. (B) Macrófagos infectados com BCG MOI 2 por 24 horas apresentam indução da biogênese de corpúsculos lipídicos em relação ao controle e no detalhe de célula com significativa indução de corpúsculos lipídicos. Bodipy 493/503 diluído 1:10000 em PBS e incubado por 5 minutos e DAPI diluído 1:10000 em PBS e também incubado por 5 minutos.

Além da avaliação de da presença de CLs através da marcação de seu centro de lipídeos neutros, foi realizada ainda a marcação de ADRP, uma proteína estrutural marcadora da presença destas organelas. A figura 11 mostra a colocalização dos lipídeos marcados em verde com BODIPY e ADRP marcada em vermelho.

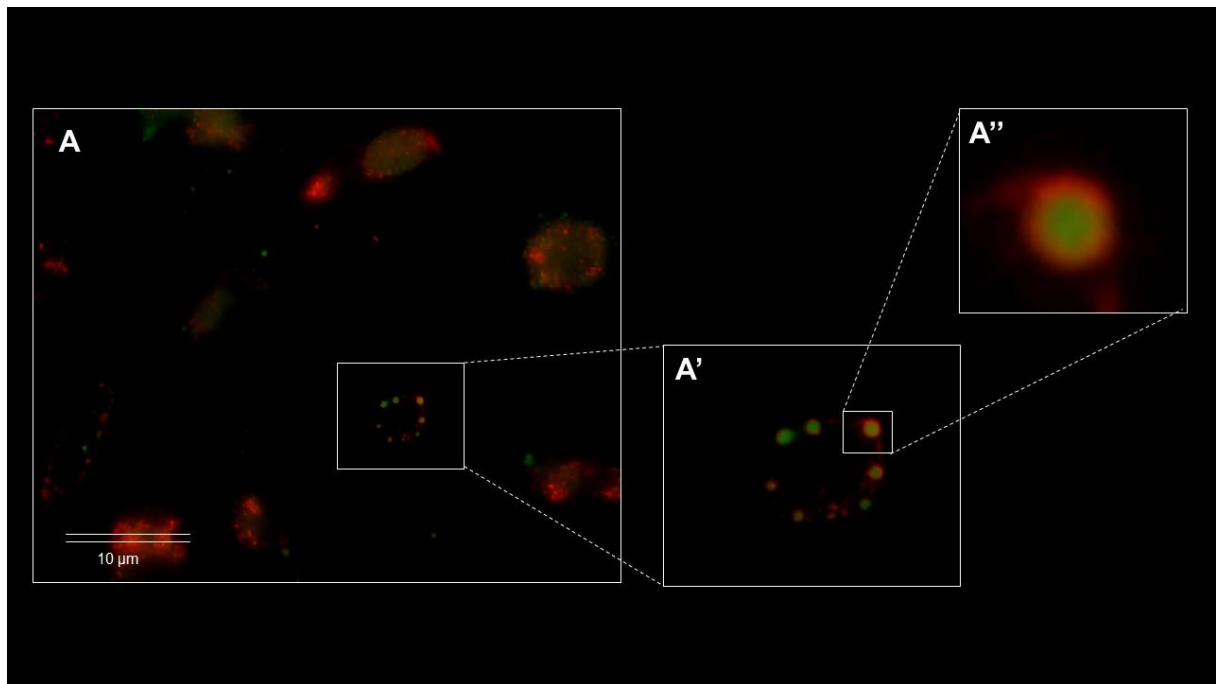


Figura 11. Marcação de ADRP nos corpúsculos de lipídicos de macrófagos infectados por BCG. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas, em vermelho pode-se ver as marcações de ADRP (diluído 1:500 overnight) nos corpúsculos de macrófagos infectados com a característica forma de anel, estão co-localizam com as marcações verdes (Bodipy diluído 1:10000, 5 minutos) evidenciando o núcleo de composição lipídica.

5.2. As proteínas do inflamassoma, Caspase-1 e NLRP3, mas não ASC, colocalizam com os corpúsculos lipídicos de macrófagos murinos infectados com BCG.

Para analisar se as proteínas NLRP3, Caspase-1 e ASC estariam presentes nos corpúsculos lipídicos dos macrófagos derivados de medula óssea murina infectados por BCG MOI 2 por 24 horas, foram utilizadas ferramentas de imunofluorescência e de microscopia confocal. Inicialmente avaliamos a localização celular do receptor NLRP3 após 24 horas de infecção com BCG, conforme verificado na figura 12. Pode-se notar que no grupo controle não há expressão do receptor NLRP3, porém quando as células foram infectadas com BCG, verificou-se aumento tanto de NLRP3 quando da biogênese de CLs, verifica-se ainda, a co-localização do receptor do inflamassoma com os CLs durante a infecção por BCG.

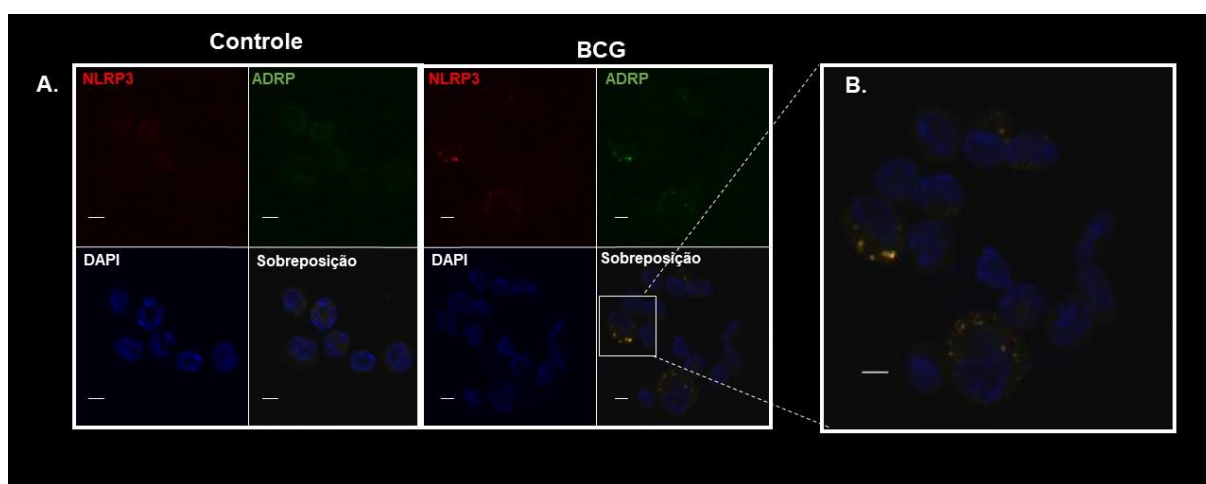


Figura 12. Co-localização de NLRP3 nos corpúsculos lipídicos de macrófagos murinos infectados por BCG. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante ou céculo por 24 horas. Em **(A)** no grupo BCG, pode-se perceber pontos de aumento de expressão, tanto de NLRP3 quanto de ADRP. Em **(B)** é possível verificar, em detalhe, uma co-localização entre as regiões verdes e vermelhas. Em azul estão marcados os núcleos dos macrófagos encubados com DAPI 1:10000 por 5 minutos **(B)**, as marcações verdes mostram a proteína ADRP, e em vermelho está marcada o receptor NLRP3.

ASC, proteína adaptadora do complexo do inflamassoma marcada em vermelho não apresentou co-localização com os corpúsculos lipídicos, em verde. ASC parece estar localizada na região nuclear como demonstrado na figura 13.

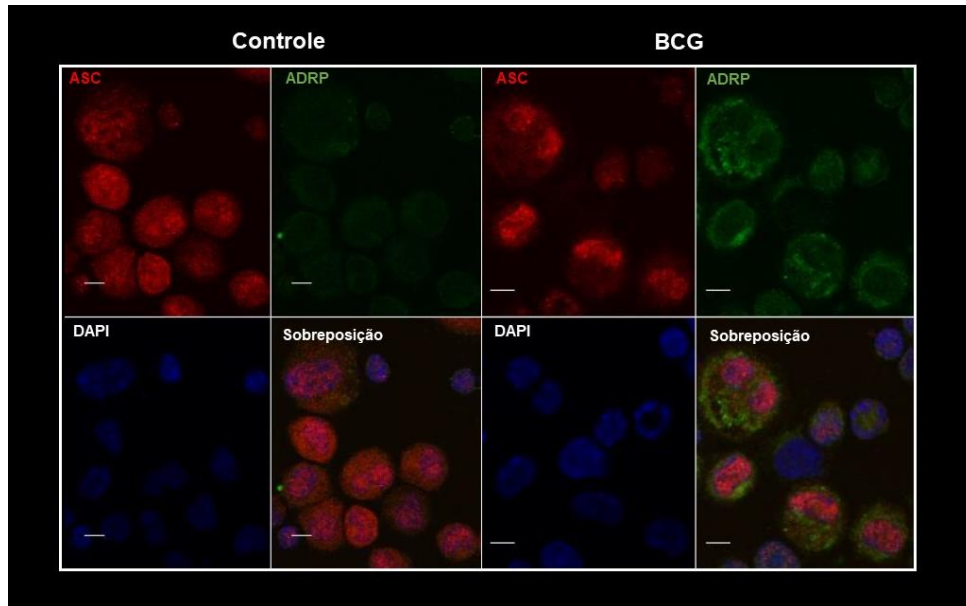


Figura 13. ASC não co-localiza com corpúsculos lipídicos nos macrófagos murinos infectados com BCG. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas, no grupo BCG, em vermelho a marcação de ASC parece estar mais próxima ao núcleo, já a marcação dos CLs, em verde, localiza-se nas regiões perinucleares. Na sobreposição é possível visualizar melhor que ASC colocalizada nos corpúsculos lipídicos de macrófagos infectados com BCG.

A proteína Caspase-1 é a unidade proteolítica do inflamassoma, capaz de promover a clivagem de citocinas para sua forma bioativa. Verificou-se Caspase-1 co-localizando com os corpúsculos lipídicos em marcações pontuais.

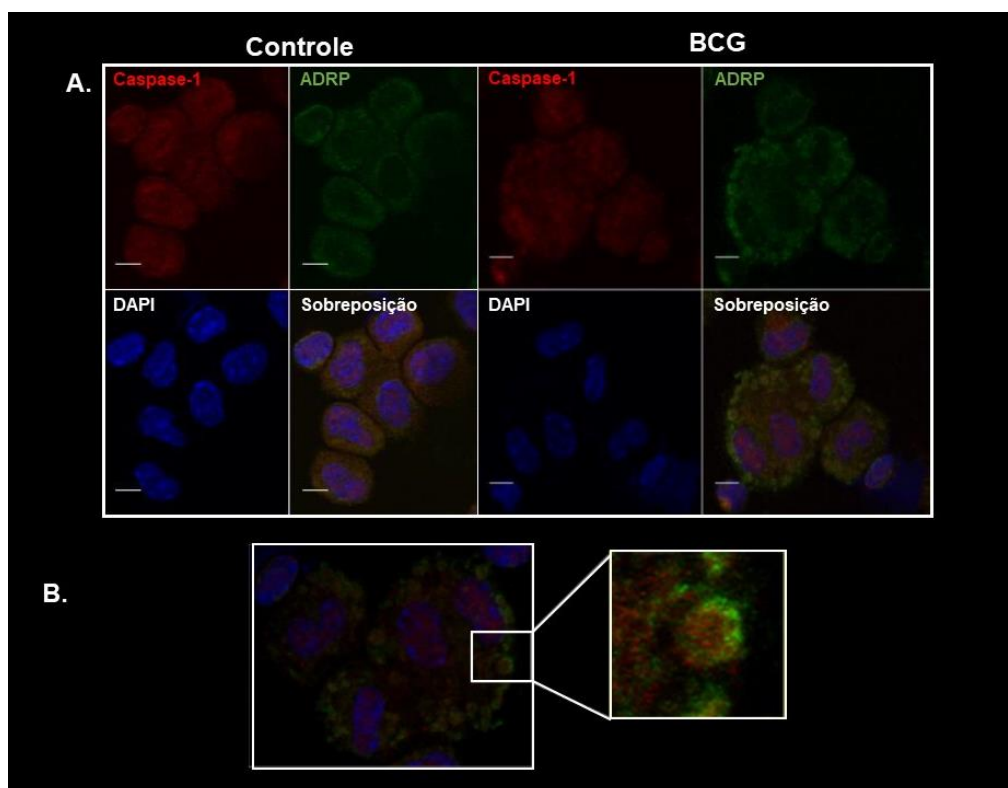


Figura 14. Caspase-1 poderia estar interagindo com os CLs de macrófagos infectados com BCG. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas, em **(A)** há aumento da expressão das duas proteínas de interesse, tanto caspase-1 (marcada em vermelho) quanto ADRP (em verde), já em **(B)** verificou-se colocalização entre de Caspase-1 e a referente à proteína estrutural dos corpúsculos lipídicos, ADRP.

Nossos dados de imunofluorescência sugerem que as proteínas do inflamassoma, NLRP3 e Caspase-1, estariam co-localizadas com ADRP (figuras 14 e 16). Indicando uma associação entre a biogênese dos corpúsculos lipídicos e a formação do inflamassoma. Porém, a proteína ASC não apresentou colocalização com os corpúsculos lipídicos (figura 15).

5.3. A inibição da enzima ácido graxo sintase pela droga C75 modula negativamente a biogênese de corpúsculos lipídicos em macrófagos murinos infectados com BCG.

Ainda buscando verificar uma relação entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e as proteínas do inflamassoma, utilizou-se a droga C75, inibidora competitiva da enzima ácido graxo sintase, com objetivo de inibir a formação dos corpúsculos lipídicos e avaliar seu possível impacto na ativação do inflamassoma. Após a inibição com C75, foi realizada a marcação com das células com ORO, seguida quantificação da biogênese de corpúsculos lipídicos por microscopia de campo claro e verificou-se uma redução estatisticamente significativa na biogênese dessas organelas frente ao número de corpúsculos presente nas células infectadas com BCG.

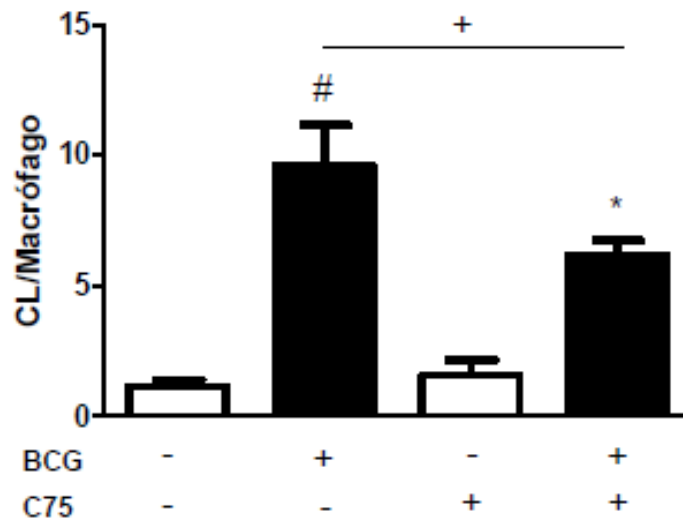


Figura 15. C75 é capaz de reduzir a biogênese de CL de macrófagos derivados de medula óssea frente à infecção por BCG. Os macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 foram tratados com C75 (1,5 ug/mL) ou veículo 30 minutos antes da infecção com BCG MOI 2. A formação de CL foi avaliada 24 horas após a infecção através de coloração com ORO seguida de contagem de microscópio de campo claro. O ensaio foi feito em placa de 24 poços com lamínulas e $0,5 \times 10^6$ de células e 0,5 de meio RPMI suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e streptocinina (PS) e 1% de L-glutamina por poço, no caso dos poços inibidos usou-se o mesmo meio adicionado da droga C75 (1,5ug/mL). Média \pm erro padrão da média de resultados de $n = 3$, $p < 0,05$. # e * significam aumento do número de corpúsculos lipídicos em relação ao controle em relação ao controle, respectivamente dos grupos sem e com C75.

Citocinas pró-inflamatórias tem papel importante no combate à patógenos, são capazes de provocar uma série de modificações no organismo visando o combater o agente infeccioso. Uma das principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória é a IL-1 β , que sofre processamento mediado pelo inflamassomo NLRP3 para tornar-se bioativa. Quando as células foram expostas somente à infecção por BCG, foi visto significativo aumento da secreção de IL-1 β em relação ao controle. Quando as células foram expostas à infecção combinada com o uso do inibidor C75, o resultado visto foi uma brusca redução dos níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo que foi exposto apenas à infecção por BCG.

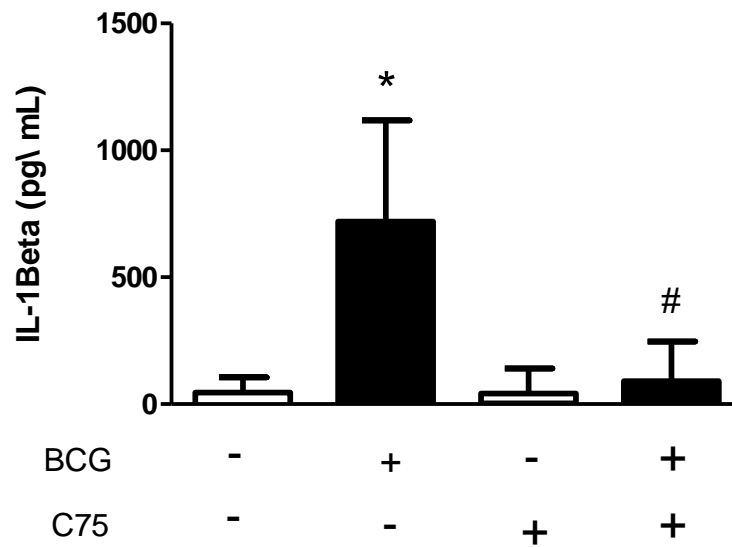


Figura 16. A produção de IL-1 β induzida por BCG é inibida com pré-tratamento com a droga C75. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas, o sobrenadante foi retirado e foram dosados os níveis de IL-1 β por ELISA. Os macrófagos foram tratados ou não com C75 (1,5 μ g/mL) 30 minutos antes da infecção. Médias \pm erro padrão da média de resultados de n = 4. * representa aumento estatisticamente significativo em relação ao controle e # representa diferença em relação ao grupo BCG. (p \leq 0,005).* representa o aumento significativo de secreção de IL-1 β em relação ao controle e # a redução significativa de IL-1 β no grupo BCG + C75 em relação ao grupo BCG.

Para melhor caracterizar o efeito do tratamento com C75 sobre a inibição de IL-1- β foram realizadas análises por *western blot* que permitiram verificar a variação da expressão e do processamento da citocina IL-1 β nos macrófagos murinos infectados por BCG durante 24 horas MOI 2. Os resultados demonstram que a infecção por BCG foi capaz de induzir tanto a síntese como o processamento de IL-1 β , porém quando adicionada a droga inibidora C75, a clivagem de IL-1 β não acontecia, como visto na figura 19.

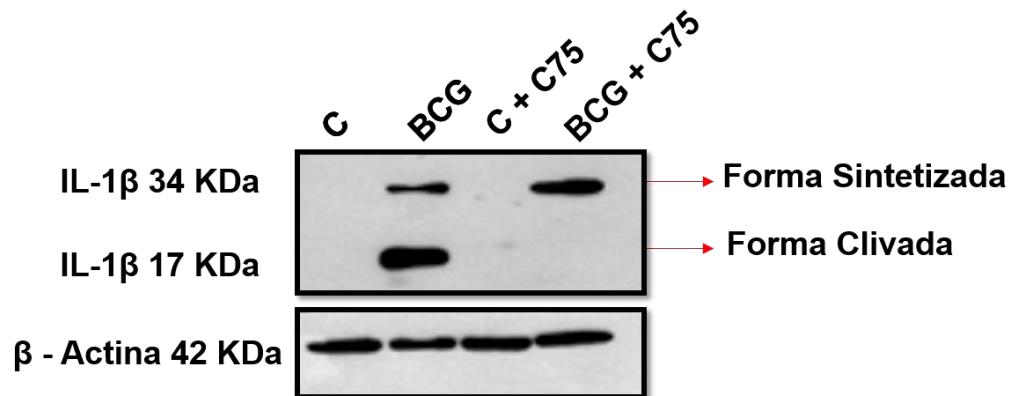


Figura 17. Modulação da expressão de IL-1 β frente ao desafio com BCG e tratamento com C75. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas e posteriormente lisados utilizando tampão rico em detergentes e cell scraper, fervidas a 100 °C por 5 minutos. Pode-se notar que na infecção com BCG há uma forte expressão da IL-1 β clivada e redução da proforma desta citocina, porém na presença da droga C75, percebe-se que ocorreu inibição do processamento de IL-1 β . Foi utilizado gel de acrilamida 15%, tempo de exposição de 5 minutos e anticorpo anti- IL-1 β . Experimento representativo de n=3 com resultados semelhantes.

Foi realizada uma qPCR com objetivo de verificar a possível variação de expressão de RNA mensageiro de IL-1 β frente à infecção com BCG, um indutor da secreção desta citocina na presença da droga inibidora da ácido graxo sintase (c75). Pode-se verificar uma tendência de aumento da expressão do RNA de IL-1 β no grupo infectado com a bactéria, ao passo que, o grupo estimulado com BCG e tratado com a droga, parece ter uma expressão menor deste gene (figura 20), entretanto não foram observadas variações estatisticamente significativas entre os grupos experimentais. Esses dados sugerem que a redução da biogênese de CLs devido à inibição de ácido graxo sintase poderia ter impacto regulatório negativo tanto na síntese quanto no processamento de IL-1 β , como demonstrado por *western blot*, porém os resultados de qPCR são ainda inconclusivos e experimentos adicionais serão necessários para avaliar uma participação do C75 na expressão de IL-1 β .

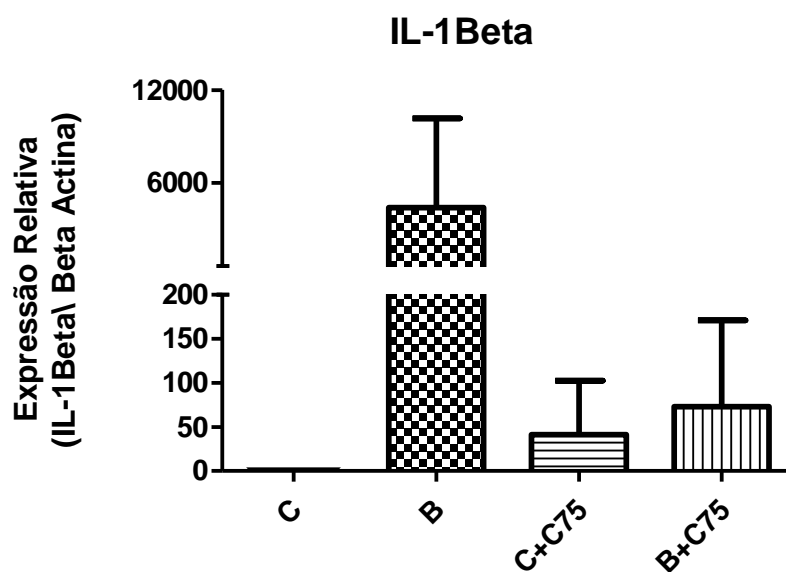


Figura 18. A expressão do RNAm de IL-1 β varia de forma diferente frente aos estímulos de BCG e C75. Macrófagos murinos derivados de medula óssea de animais C57 Black 6 infectados com BCG MOI 2 durante 24 horas. Verifica-se no gráfico que frente à infecção com BCG, o RNAm de IL-1 β tem uma tendência ao aumento que não é verificada em nenhum dos outros grupos experimentais, mostrando que a inibição da biogênese dos corpúsculos lipídicos poderia modular a produção de IL-1 β durante a infecção dos macrófagos por BCG *in vitro*. N=3. Legenda: C= Controle, B=BCG, C+C75= Controle + C75 e B+C75= BCG + C75.

6. DISCUSSÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa de grande relevância mundial, parte dessa relevância se deve à grande morbidade associada a infecções micobacterianas, principalmente em países mais pobres, portanto é considerada uma doença negligenciada (OMS, 2016). Uma característica da patologia ainda pouco elucidada é o acúmulo intracelular de lipídios bem como, a diferenciação dos macrófagos em células espumosas que tem sido observada durante a infecção tanto em condições clínicas quanto experimentais de modelos de tuberculose, estas células espumosas são ricas em corpúsculos lipídicos (H. D'Avila et al., 2006; Neyrolles, 2014; Ridley & Ridley, 1987; Russell et al., 2010).

Os corpúsculos lipídicos são organelas presentes virtualmente em todas as células, incluindo animais, plantas e microrganismos (Bozza et al., 2009b). Achava-se anteriormente que estas organelas eram apenas depósitos inertes de lipídeos, porém hoje é sabido que os corpúsculos lipídicos são plataformas complexas e metabolicamente ativas, que incluem proteínas estruturais que são maquinaria essencial para a síntese, estoque, utilização e degradação de diversos lipídeos (Wei et al., 2005). Em situações inflamatórias ou infecciosas verifica-se o aumento da biogênese dessas organelas. Nos resultados encontrados neste trabalho durante a infecção dos macrófagos derivados de medula óssea com *Mycobacterium bovis* BCG foi verificado o aumento do número de corpúsculos lipídicos em diferentes tempos, corroborando os dados já descritos na literatura com outros tipos celulares e outras espécies de micobactérias, tal como em macrófagos infectados por BCG (P. E. Almeida et al., 2009b; H. D'Avila et al., 2006), macrófagos infectadas por *Mycobacterium tuberculosis* (Mahajan et al., 2012) bem como em células de Schwann infectadas por *Mycobacterium leprae* (K. A. Mattos et al., 2011). Assim como infecções micobacterianas, observou-se em outras doenças podem ser capazes de provocar a formação de corpúsculos lipídicos durante sua fisiopatologia, tais como a leishmaniose (Rodríguez et al., 2017), doença de Chagas (Heloisa D'Avila, Toledo, & Melo, 2012) entre diversas outras.

Mycobacterium leprae é capaz de induzir CLs ricos em colesterol, este esteroide é importante para a sobrevivência do bacilo e estabelecimento da infecção (Lobato et al., 2014; Katherine A. Mattos et al., 2014; Reis et al., 2014), bem como é visto em *Mycobacterium tuberculosis*, capaz de utilizar colesterol, via reações de β -oxidação, como importante fonte de nutrientes e para síntese de fatores de virulência durante a infecção (Lovewell et al., 2016). Na cinética de indução de corpúsculos lipídicos apresentada neste trabalho, verificou-se um pico de indução em 24 horas que no tempo maior, 48 horas, sofria redução do número de corpúsculos lipídicos, especula-se que os lipídeos seriam consumidos pelas bactérias como fonte de carbono.

Já existem trabalhos demonstrando a participação de mecanismos e receptores da imunidade inata na biogênese dos corpúsculos induzida por *Mycobacterium bovis* BCG em macrófagos, modelo utilizado no presente trabalho. Sendo os macrófagos células fagocíticas profissionais, investigou-se se a fagocitose sozinha seria capaz de induzir biogênese de corpúsculos lipídicos. Para isso, utilizaram microesferas de látex, *Mycobacterium smegmatis* (bactéria não patogênica) ou *Mycobacterium bovis* BCG, todos sendo fagocitados por macrófagos. Os autores mostraram que a fagocitose de BCG foi capaz de aumentar o número de CL, o que não aconteceu com outros estímulos, concluindo que a fagocitose não é suficiente nem essencial para a formação destas organelas (P. E. Almeida et al., 2009a; Heloisa D'Avila et al., 2006).

A proteína ADRP é a mais abundante na superfície dos corpúsculos lipídicos, está associada a diversos tipos de células como os macrófagos, hepatócitos e pneumócitos, não apenas aos adipócitos como é o caso das perilipinas (Brasaemle et al., 1997; Imamura et al., 2002). O conhecimento de seu papel fisiológico e seus mecanismos regulatórios permanecem limitados, porém, é descrito que ADRP teria papel importante na mobilização do colesterol do corpúsculo para esterificação (Atshaves et al., 2000; Frolov et al., 2000). É sugerido ainda que, ADRP participaria da síntese *de novo* de lipídeos citoplasmáticos (Murphy, 2001), alguns trabalhos evidenciam ainda, que ADRP teria expressão aumentada frente a certos estímulos fisiológicos e farmacológicos, tais como ácidos graxos de cadeia longa ou inibidores

da ciclooxigenase respectivamente (Gao, Ye, & Serrero, 2000; Wang et al., 2015). Nos experimentos realizados neste trabalho foi possível verificar através de microscopia de fluorescência a presença dos corpúsculos lipídicos marcados com Bodipy, e a proteína ADRP marcadora da presença dessas organelas, em vermelho, expressa ao redor do núcleo de lipídeos neutros demonstrando a associação entre esta proteína e os corpúsculos, lipídicos como já visto na literatura (Imamura et al., 2002; Londos, Brasaemle, Schultz, Segrest, & Kimmel, 1999).

O reconhecimento dos PAMPs ou DAMPs é importante para a montagem da resposta imune inata pelo organismo do hospedeiro, neste contexto os TLRs e NLRs tem destaque. Nosso grupo, usando camundongos TLR2 nocautes, mostrou que esse receptor é importante, mas não o único envolvido na formação de CL induzida por BCG (Patrícia E. Almeida et al., 2014). Há relatos de cooperação entre receptores da imunidade inata no reconhecimento de micobactérias (Ferwerda et al., 2005). Trabalhos recentes do nosso grupo buscaram descrever interações entre a biogênese de corpúsculos lipídicos e a ativação do inflamassoma durante a infecção de macrófagos murinos derivados de medula óssea por *Mycobacterium bovis* BCG. Os resultados obtidos com a utilização de células nocautes para as proteínas do inflamassoma demonstrou ocasionar um aumento da biogênese de corpúsculos lipídicos.

No presente estudo, visamos caracterizar a interação entre o inflamassoma e os CLs em macrófagos infectados com BCG, sabendo que tanto com o inflamassoma (Dikshit et al., 2017) como os corpúsculos lipídicos possuem funções descritas como relevantes na resposta inflamatória (Bozza et al., 2009b). Inicialmente buscou-se a possível co-localização das proteínas do inflamassoma NLRP3 nos corpúsculos lipídicos através da técnica de microscopia de fluorescência. Os resultados obtidos demonstraram que, NLRP3 e Caspase-1 colocalizam com os corpúsculos lipídicos, mas não se observou o mesmo para a proteína adaptadora ASC, que demonstrou estar associado a região perinuclear durante a infecção por BCG. A literatura mostra que a formação de granuloma e a defesa do hospedeiro na infecção crônica por *Mycobacterium tuberculosis* requerem ASC, mas não caspase-1 ou NLRP3. Os autores sugerem que ASC possa exercer um papel independente de inflamassomo durante infecções micobacterianas crônicas, colaborando para a contenção da

bactéria em granulomas (McElvania Tekippe et al., 2010). Desta forma, a hipótese seria que os corpúsculos lipídicos seriam plataformas de armazenamento de proteínas do inflamassoma e que a sua inibição teria impacto, conseqüentemente, na síntese de IL-1 β , que seria aumentada já que haveriam menos CLs para “sequestrar” essas proteínas.

Foi visto por *western blot* que as células estimuladas com BCG apresentavam um significativo aumento na expressão de IL-1 β , porém, quando tratadas com a droga inibidora da enzima ácido graxo sintase (C75), temos a inibição da clivagem da IL-1 β no grupo estimulado com BCG + C75, no mesmo grupo quando foi feita a quantificação do número de corpúsculos lipídicos em 24 horas, verificou-se inibição bem como é visto na literatura, quando a inibição de corpúsculos lipídicos utilizando o C75 é seguida da redução da liberação do mediador inflamatório prostaglandina E2 (PGE2) em modelo de neutrófilos infectados por BCG (Heloisa D’Avila et al., 2008).

Verificou-se ainda que quando havia inibição da síntese de corpúsculos lipídicos, havia redução da secreção e IL-1 β verificada por ELISA. O resultado da expressão de IL-1 β por *western blot*, indicou também que o processamento desta citocina seria inibida pela droga C75. Para verificar se esta inibição seria apenas no processamento da citocina ou também a nível transcricional, foi realizada uma qPCR para IL-1 β . A qPCR sugere que haveria redução da expressão do gene que codifica IL-1 β , porém mais experimentos são necessários para a confirmação destes dados, incluindo experimentos com tempo de infecção menores do que 24 horas, possivelmente melhores para detecção do alvo proposto.

Esses dados sugerem que o bloqueio da biogênese de corpúsculos lipídicos teria impacto direto na síntese e processamento de IL-1 β . A redução desta citocina pro-inflamatória no modelo utilizado, encontra apoio em trabalho publicado recentemente, que mostrou que C75 é capaz de reduzir a colite experimental em camundongos por diminuir os mediadores inflamatórios, principalmente as citocinas TNF (*Tumoral Necrosis Factor*), MIP2(*Macrophage Inflammatory Protein 2*), KC (*Keratinocyte-derived Chemokine*) e a própria IL-1 β , além de reduzir a expressão

das enzimas COX2 (*Cyclooxygenase*) e iNOS (*Inducible Nitric Oxide Synthase*) (Matsuo & Yang, 2014).

Tais dados poderiam indicar que os corpúsculos lipídicos teriam impacto importante na resposta inflamatória mediada pela via do inflamassoma. Os corpúsculos agiriam como plataformas de armazenamento de proteínas componentes do inflamassoma, sendo que inibição de sua biogênese via droga c75, acarretou a redução significativa da secreção de IL-1 β , que seria a principal citocina processada pela montagem e ativação do inflamassoma. A descrição mais aprofundada da mecanística envolvida demanda mais experimentos e estratégias de variadas análises confirmatórias, dentre elas seria de grande relevância o uso de animais nocautes para proteínas da via do inflamassoma, caspase-1, ASC e NLRP3 além do uso de mecanismos de silenciamento de ADRP que constituiria um modo mais específico do que a ferramenta farmacológica C75, para a descrição dos mecanismos envolvidos. Seria ainda necessário verificar se as proteínas relacionadas ao inflamassoma verificadas nos corpúsculos lipídicos estariam em sua forma ativa, para isso utilizaríamos FLICA, realização da marcação de Caspase-1 ativa entre outros métodos de avaliação de atividade.

7. CONCLUSÕES

- ✓ NLRP3 e Caspase-1, mas não ASC, estão localizadas nos corpúsculos lipídicos após a infecção por BCG, sugerindo que os corpúsculos lipídicos possam modular a função dos inflamassomas.
- ✓ Além de reduzir a formação de CL induzida por BCG, a inibição da enzima ácido graxo sintase levou a redução tanto da secreção quanto da forma clivada de IL-1 β .
- ✓ Corpúsculos lipídicos induzidos por BCG podem servir como sítio de localização para proteínas do complexo inflamassoma, e a inibição da biogênese destas organelas lipídicas parecem influenciar na ativação dos inflamassomos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aachoui, Y., Leaf, I. A., Hagar, J. A., Fontana, M. F., Campos, C. G., Zak, D. E., ... Miao, E. A. (2013). Caspase-11 protects against bacteria that escape the vacuole. *Science*, 339(6122), 975–978. <https://doi.org/10.1126/science.1230751>
- Abdalla, H., Srinivasan, L., Shah, S., Mayer-Barber, K. D., Sher, A., Sutterwala, F. S., & Briken, V. (2012). Mycobacterium tuberculosis infection of dendritic cells leads to partially caspase-1/11-independent IL-1 β and IL-18 secretion but not to pyroptosis. *PLoS ONE*, 7(7), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040722>
- Allen, L. A. H., & Aderem, A. (1996). Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology*, 8(1), 36–40. [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(96\)80102-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(96)80102-6)
- Almeida, P. E., Roque, N. R., Magalhães, K. G., Mattos, K. A., Teixeira, L., Maya-Monteiro, C., ... Bozza, P. T. (2014). Differential TLR2 downstream signaling regulates lipid metabolism and cytokine production triggered by Mycobacterium bovis BCG infection. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1841(1), 97–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2013.10.008>
- Almeida, P. E., Silva, A. R., Maya-Monteiro, C. M., Torocsik, D., D'Avila, H., Dezso, B., ... Bozza, P. T. (2009a). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1337–1345. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900365>
- Atshaves, B. P., Starodub, O., McIntosh, A., Petrescu, A., Roths, J. B., Kier, A. B., & Schroeder, F. (2000). Sterol carrier protein-2 alters high density lipoprotein-mediated cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 275(47), 36852–36861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003434200>
- Bifani, P., Moghazeh, S., Shopsis, B., Driscoll, J., Ravikovitch, A., & Kreiswirth, B. N. (2000). Molecular characterization of Mycobacterium tuberculosis H37Rv/Ra variants: Distinguishing the mycobacterial laboratory strain. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(9), 3200–3204.
- Blaas, S. H., Mütterlein, R., Weig, J., Neher, A., Salzberger, B., Lehn, N., & Naumann, L. (2008). Extensively drug resistant tuberculosis in a high income country: A report of four unrelated cases. *BMC Infectious Diseases*, 8, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-60>
- Bozza, P. T., Bakker-Abreu, I., Navarro-Xavier, R. A., & Bandeira-Melo, C. (2011). Lipid body function in eicosanoid synthesis: An update.

- Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 85(5), 205–213. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2011.04.020>
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., & Weller, P. F. (2009a). Leukocyte lipid bodies - biogenesis and function in inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 1791(6), 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.005>
- Bozza, P. T., Magalhães, K. G., & Weller, P. F. (2009b). Leukocyte lipid bodies - Biogenesis and functions in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(6), 540–551. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.01.005>
- Brasaemle, D. L., Barber, T., Wolins, N. E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E. J., & Londos, C. (1997). Adipose differentiation-related protein is an ubiquitously expressed lipid storage droplet-associated protein. *Journal of Lipid Research*, 38(11), 2249–2263.
- Brites, D., & Gagneux, S. (2012). Old and new selective pressures on *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(4), 678–85. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.08.010>
- Brodsky, I. E., Palm, N. W., Sadanand, S., Ryndak, M. B., Fayyaz, S., Flavell, R. A., ... Medzhitov, R. (2010). System, 7(5), 376–387. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.04.009.A>
- Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.024>
- Chida, D., Hashimoto, O., Kuwahara, M., Sagara, H., Osaka, T., Tsubone, H., & Iwakura, Y. (2008). Increased fat:carbohydrate oxidation ratio in Il1ra^{-/-} mice on a high-fat diet is associated with increased sympathetic tone. *Diabetologia*, 51(9), 1698–1706. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1075-z>
- Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., ... Allavena, P. (2003). Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *The Journal of Immunology*, 171(9), 4552–4560. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4552>
- Clay, H., Volkman, H. E., & Ramakrishnan, L. (2008). Tumor Necrosis Factor Signaling Mediates Resistance to *Mycobacteria* by Inhibiting Bacterial Growth and Macrophage Death. *Immunity*, 29(2), 283–294. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.06.011>
- D'Ávila, H., Almeida, P. E., Roque, N. R., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2007). Toll-like receptor-2-mediated C-C chemokine receptor 3 and eotaxin-driven eosinophil influx induced by *Mycobacterium bovis* BCG pleurisy. *Infection and Immunity*, 75(3), 1507–1511. <https://doi.org/10.1128/IAI.01326-06>

- D'Avila, H., Melo, R. C. N., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2006). Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, *176*(5), 3087–3097. <https://doi.org/10.1093/infdis/jii111> [pii]
- D'Avila, H., Melo, R. C. N., Parreira, G. G., Werneck-Barroso, E., Castro-Faria-Neto, H. C., & Bozza, P. T. (2006). Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Induces TLR2-Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis In Vivo. *The Journal of Immunology*, *176*(5), 3087–3097. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.5.3087>
- D'Avila, H., Roque, N. R., Cardoso, R. M., Castro-Faria-Neto, H. C., Melo, R. C. N., & Bozza, P. T. (2008). Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E2 production by macrophages. *Cellular Microbiology*, *10*(12), 2589–2604. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01233.x>
- D'Avila, H., Toledo, D. A. M., & Melo, R. C. N. (2012). Lipid bodies: Inflammatory organelles implicated in host-trypanosoma cruzi interplay during innate immune responses. *Mediators of Inflammation*, *2012*. <https://doi.org/10.1155/2012/478601>
- Davis, BK., Wen, H., Ting, J. (2011). The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annu Rev Immunol*, *707–735*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101405>.The
- Denes, A., & Brough, D. (2012). Caspase-1 : is IL-1 just the tip of the ICEberg ?, 1–9. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.86>
- Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., & Haro, S. De. (2009). Autophagy in Infection and Immunity, *335*, 1–18. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00302-8>
- Dikshit, N., Kale, S. D., Khameneh, H. J., Balamuralidhar, V., Tang, C. Y., Kumar, P., ... Sukumaran, B. (2017). NLRP3 inflammasome pathway has a critical role in the host immunity against clinically relevant Acinetobacter baumannii pulmonary infection. *Mucosal Immunology*, (January). <https://doi.org/10.1038/mi.2017.50>
- Ehlers, S., & Schaible, U. E. (2012). The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. *Frontiers in Immunology*, *3*(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00411>
- Elinav, E., Strowig, T., Henao-Mejia, J., & Flavell, R. A. (2011). Regulation of the Antimicrobial Response by NLR Proteins. *Immunity*, *34*(5), 665–679. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.007>
- Fenton, M. J., & Vermeulen, M. W. (1996). Immunopathology of tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. *Infection and*

- Immunity*, 64(3), 683–690.
- Ferwerda, G., Girardin, S. E., Kullberg, B. J., Le Bourhis, L., De Jong, D. J., Langenberg, D. M. L., ... Netea, M. G. (2005). NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathogens*, 1(3), 0279–0285. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0010034>
- Figueiredo, R. T., Fernandez, P. L., Mourao-Sa, D. S., Porto, B. N., Dutra, F. F., Alves, L. S., ... Bozza, M. T. (2007). Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *Journal of Biological Chemistry*, 282(28), 20221–20229. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610737200>
- Franchi, L., Warner, N., Viani, K., & Nuñez, G. (2010). NIH Public Access. *Cancer*, 227(1), 106–128. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x>Function
- Fremont, C. M. C., Nicolle, D. M. M., Torres, D. S., & Quesniaux, V. F. J. (2003). Control of Mycobacterium bovis BCG infection with increased inflammation in TLR4-deficient mice. *Microbes and Infection*, 5(12), 1070–1081. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.06.001>
- Fremont, C. M., Togbe, D., Doz, E., Rose, S., Vasseur, V., Maillet, I., ... Quesniaux, V. F. J. (2007). IL-1 Receptor-Mediated Signal Is an Essential Component of MyD88-Dependent Innate Response to Mycobacterium tuberculosis Infection. *The Journal of Immunology*, 179(2), 1178–1189. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.2.1178>
- Frolov, A., Petrescu, A., Atshaves, B. P., So, P. T. C., Gratton, E., Serrero, G., & Schroeder, F. (2000). High density lipoprotein-mediated cholesterol uptake and targeting to lipid droplets in intact L-cell fibroblasts. A single- and multiphoton fluorescence approach. *Journal of Biological Chemistry*, 275(17), 12769–12780. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.12769>
- Galle, M., Schotte, P., Haegman, M., Wullaert, A., Yang, H. J., Jin, S., & Beyaert, R. (2008). The Pseudomonas aeruginosa Type III secretion system plays a dual role in the regulation of caspase-1 mediated IL-1 β maturation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5A), 1767–1776. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00190.x>
- Gandhi, N. R., Moll, A., Sturm, A. W., Pawinski, R., Govender, T., Lalloo, U., ... Friedland, G. (2006). Extensively drug-resistant tuberculosis as a cause of death in patients co-infected with tuberculosis and HIV in a rural area of South Africa. *Lancet*, 368(9547), 1575–1580. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69573-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69573-1)
- Gao, J., Ye, H., & Serrero, G. (2000). Stimulation of adipose differentiation related protein (ADRP) expression in adipocyte precursors by long-chain fatty acids. *Journal of Cellular Physiology*, 182(2), 297–302. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200002\)182:2<297::AID-JCP19>3.0.CO;2-Z](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<297::AID-JCP19>3.0.CO;2-Z)
- García, M. C., Wernstedt, I., Berndtsson, A., Enge, M., Bell, M., Hultgren,

- O., ... Jansson, J. O. (2006). Mature-onset obesity in interleukin-1 receptor I knockout mice. *Diabetes*, *55*(5), 1205–1213. <https://doi.org/10.2337/db05-1304>
- Gideon, H. P. riyadarshini, Phuah, J. Y., Myers, A. J., Bryson, B. D., Rodgers, M. A., Coleman, M. T., ... Flynn, J. A. L. (2015). Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004603>
- Ginhoux, F., & Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages : developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Publishing Group*, *14*(6), 392–404. <https://doi.org/10.1038/nri3671>
- Guilherme, A., Tesz, G. J., Guntur, K. V. P., & Czech, M. P. (2009). Tumor Necrosis Factor- α Induces Caspase-mediated Cleavage of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ in Adipocytes. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(25), 17082–17091. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809042200>
- Hijjar, M. A., & Procopio, M. J. (2000). A tuberculose no brasil e no mundo.
- Imamura, M., Inoguchi, T., Ikuyama, S., Taniguchi, S., Kobayashi, K., Nakashima, N., & Nawata, H. (2002). ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism*, *283*(4), E775–E783. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00040.2002>
- Itoh, R., Murakami, I., Chou, B., Ishii, K., Soejima, T., Suzuki, T., & Hiromatsu, K. (2014). Chlamydia pneumoniae harness host NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation for optimal intracellular growth in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *452*(3), 689–694. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.128>
- Jankute, M., Cox, J. A. G., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual Review of Microbiology*, *69*(1), 405–423. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
- Johnston, J. B., Rahman, M. M., & McFadden, G. (2007). Strategies that modulate inflammasomes - Insights from host-pathogen interactions. *Seminars in Immunopathology*, *29*(3), 261–274. <https://doi.org/10.1007/s00281-007-0080-5>
- Kang, P. B., Azad, A. K., Torrelles, J. B., Kaufman, T. M., Beharka, A., Tibesar, E., ... Schlesinger, L. S. (2005). The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of Experimental Medicine*, *202*(7), 987–999. <https://doi.org/10.1084/jem.20051239>
- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G., & Van Crevel, R. (2011). Innate Immune Recognition of *Mycobacterium*

- tuberculosis. Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 1–12.
<https://doi.org/10.1155/2011/405310>
- Kumar, Y., Cocchiaro, J., & Valdivia, R. H. (2006). The Obligate Intracellular Pathogen *Chlamydia trachomatis* Targets Host Lipid Droplets. *Current Biology*, 16(16), 1646–1651.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.06.060>
- Liu, C. H., Liu, H., & Ge, B. (2017). Innate immunity in tuberculosis: host defense vs pathogen evasion. *Cellular & Molecular Immunology*, (April), 1–13. <https://doi.org/10.1038/cmi.2017.88>
- Liu, H. Q., Zhang, X. Y., Edfeldt, K., Nijhuis, M. O., Idborg, H., Bäck, M., ... Yan, Z. Q. (2013). NOD2-mediated innate immune signaling regulates the eicosanoids in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 33(9), 2193–2201.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301715>
- Liu, W., Yin, Y., Zhou, Z., He, M., & Dai, Y. (2014). OxLDL-induced IL-1beta secretion promoting foam cells formation was mainly via CD36 mediated ROS production leading to NLRP3 inflammasome activation. *Inflammation Research*, 63(1), 33–43.
<https://doi.org/10.1007/s00011-013-0667-3>
- Lobato, L. S., Rosa, P. S., Ferreira, J. da S., Neumann, A. da S., da Silva, M. G. ome., do Nascimento, D. C. aitan., ... Lara, F. A. (2014). Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5766–5774.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01826-13>
- Londos, C., Brasaemle, D. L., Schultz, C. J., Segrest, J. P., & Kimmel, a R. (1999). Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 10(1), 51–58.
<https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0275>
- Lovewell, R. R., Sasseti, C. M., & VanderVen, B. C. (2016). Chewing the fat: Lipid metabolism and homeostasis during *M. tuberculosis* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 29, 30–36.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.10.002>
- Magalhaes, J. G., Sorbara, M. T., Girardin, S. E., & Philpott, D. J. (2011). What is new with Nods? *Current Opinion in Immunology*, 23(1), 29–34. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.12.003>
- Mahajan, S., Dkhar, H. K., Chandra, V., Dave, S., Nanduri, R., Janmeja, A. K., ... Gupta, P. (2012). Mycobacterium tuberculosis Modulates Macrophage Lipid-Sensing Nuclear Receptors PPAR and TR4 for Survival. *The Journal of Immunology*, 188(11), 5593–5603.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103038>
- Martin, S., & Parton, R. G. (2006). a Dynamic Organelle. *Molecular Cell*, 7(May), 373–378. <https://doi.org/10.1038/nrm1912>
- Martinon, F., Mayor, A., & Tschopp, J. (2009). The Inflammasomes:

- Guardians of the Body. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 229–265. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132715>
- Matsuki, T., Horai, R., Sudo, K., & Iwakura, Y. (2003). IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(6), 877–88. <https://doi.org/10.1084/jem.20030299>
- Matsuo, S., & Yang, W.-L. (2014). <Title/>. *Molecular Medicine*, 20(1), 1. <https://doi.org/10.2119/molmed.2013.00113>
- Mattos, K. A., Oliveira, V. C. G., Berrêdo-Pinho, M., Amaral, J. J., Antunes, L. C. M., Melo, R. C. N., ... Pessolani, M. C. V. (2014). Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: A potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cellular Microbiology*, 16(6), 797–815. <https://doi.org/10.1111/cmi.12279>
- Mattos, K. A., Oliveira, V. G. C., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., ... Bozza, P. T. (2011). TLR6-Driven Lipid Droplets in Mycobacterium leprae-Infected Schwann Cells: Immunoinflammatory Platforms Associated with Bacterial Persistence. *The Journal of Immunology*, 187(5), 2548–2558. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101344>
- McClellan, C. M., & Tobin, D. M. (2016). Macrophage form, function, and phenotype in mycobacterial infection: Lessons from tuberculosis and other diseases. *Pathogens and Disease*, 74(7), 1–15. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw068>
- McElvania Tekippe, E., Allen, I. C., Hulseberg, P. D., Sullivan, J. T., McCann, J. R., Sandor, M., ... Ting, J. P. Y. (2010). Granuloma formation and host defense in chronic mycobacterium tuberculosis infection requires PYCARD/ASC but not NLRP3 or caspase-1. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012320>
- Melo, R. C. N., Ávila, H. D., Fabrino, D. L., Almeida, P. E., & Bozza, P. T. (2003). Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: Putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection. *Tissue and Cell*, 35(1), 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(02\)00105-2](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00105-2)
- Melo, R. C. N., Paganoti, G. F., Dvorak, A. M., & Weller, P. F. (2013). The Internal Architecture of Leukocyte Lipid Body Organelles Captured by Three-Dimensional Electron Microscopy Tomography. *PLoS ONE*, 8(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059578>
- Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Progress in Lipid Research*, 40(5), 325–438. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(01\)00013-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(01)00013-3)
- Neyrolles, O. (2014). Mycobacteria and the greasy macrophage: Getting fat and frustrated. *Infection and Immunity*, 82(2), 472–475. <https://doi.org/10.1128/IAI.01512-13>

- Ollé-Goig, J. E. (2006). Editorial: The treatment of multi-drug resistant tuberculosis - A return to the pre-antibiotic era? *Tropical Medicine and International Health*, 11(11), 1625–1628.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2006.01770.x>
- Plotkowski, M. C., Brandão, B. A., de Assis, M. C., Feliciano, L. F. P., Raymond, B., Freitas, C., ... Bozza, P. T. (2008). Lipid body mobilization in the ExoU-induced release of inflammatory mediators by airway epithelial cells. *Microbial Pathogenesis*, 45(1), 30–37.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.01.008>
- Pyne, K., Harvey, V. S., Galli, S. J., Cells, M., & Macglashan, D. W. (2017). Lipid bodies : cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells . • Rapid Reviews ! 30 days * from submission to initial decision Information about subscribing to The Journal of Immunology is online at : LIPID BODI.
- Rajaram, M., & Brooks, M. (2010). Mycobacterium tuberculosis activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor γ linking mannose receptor recognition to regulation of immune. *The Journal of ...*, 185(2), 929–942.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000866>.Mycobacterium
- Rajaram, M. V. S., Ni, B., Dodd, C. E., & Schlesinger, L. S. (2014). Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Seminars in Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2014.09.010>
- Reis, E. M., Araujo, S., Lobato, J., Neves, A. F., Costa, A. V., Gonçalves, M. A., ... Goulart, I. M. B. (2014). Mycobacterium leprae DNA in peripheral blood may indicate a bacilli migration route and high-risk for leprosy onset. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 447–452.
<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12349>
- Ridley, D. S., & Ridley, M. J. (1987). Rationale for the histological spectrum of tuberculosis. A basis for classification . *Pathology* , 19(0031-3025), 186–192.
<https://doi.org/10.3109/00313028709077132>
- Robenek, H., Hofnagel, O., Buers, I., Robenek, M. J., Troyer, D., & Severs, N. J. (2006). Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. *Journal of Cell Science*, 119(20), 4215–4224. <https://doi.org/10.1242/jcs.03191>
- Rodríguez, N. E., Lockard, R. D., Turcotte, E. A., Araújo-Santos, T., Bozza, P. T., Borges, V. M., & Wilson, M. E. (2017). Lipid bodies accumulation in Leishmania infantum-infected C57BL/6 macrophages. *Parasite Immunology*, 39(8), 1–5.
<https://doi.org/10.1111/pim.12443>
- Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, 5(1), 39–47.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1538>

- Russell, D. G., Cardona, P., Kim, M., & Allain, S. (2010). Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. *Nature Immunology*, *10*(9), 943–948. <https://doi.org/10.1038/ni.1781>.Foamy
- Russell, D. G., Mwandumba, H. C., & Rhoades, E. E. (2002). Mycobacterium and the coat of many lipids. *Journal of Cell Biology*, *158*(3), 421–426. <https://doi.org/10.1083/jcb.200205034>
- Sabbah, A., Chang, T. H., Harnack, R., Frohlich, V., Tominaga, K., Dube, P. H., ... Bose, S. (2009). Activation of innate immune antiviral responses by Nod2. *Nature Immunology*, *10*(10), 1073–1080. <https://doi.org/10.1038/ni.1782>
- Sargazi, A., Gharebagh, R. A., Sargazi, A., Aali, H., Oskoe, H. O., & Sepehri, Z. (2017). Role of essential trace elements in tuberculosis infection: A review article. *Indian Journal of Tuberculosis*, *64*(4), 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2017.03.003>
- Shah, S. S., Goregaonkar, A. A., & Goregaonkar, A. B. (2017). Extensively Drug-resistant Tuberculosis of the Lumbar Spine in a Six-year-old Child : A Case Report, *7*(2), 40–43. <https://doi.org/10.13107/jocr.2250-0685.742>
- Sharma, S., Sharma, M., & Bose, M. (2009). Mycobacterium tuberculosis infection of human monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of T cells. *Immunology and Cell Biology*, *87*(3), 226–234. <https://doi.org/10.1038/icb.2008.97>
- Shaw, M. H., Reimer, T., Sánchez-Valdepeñas, C., Warner, N., Kim, Y. G., Fresno, M., & Nuñez, G. (2009). T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nature Immunology*, *10*(12), 1267–1274. <https://doi.org/10.1038/ni.1816>
- Shi, X., Qiu, S., Zhuang, W., Yuan, N., Wang, C., Zhang, S., ... Guo, W. (2017). NLRP3-inflammasomes are triggered by age-related hearing loss in the inner ear of mice, *9*(12), 5611–5618.
- Smith, D. E. (2011). The biological paths of IL-1 family members IL-18 and IL-33. *Journal of Leukocyte Biology*, *89*(3), 383–392. <https://doi.org/10.1189/jlb.0810470>
- Soilleux, E. J., Morris, L. S., Leslie, G., Chehimi, J., Luo, Q., Levroney, E., ... Lee, B. (2002). Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro. *Journal of Leukocyte Biology*, *71*(3), 445–457.
- Stamm, C. E., Collins, A. C., & Shiloh, M. U. (2015). Sensing of Mycobacterium tuberculosis and consequences to both host and bacillus. *Immunological Reviews*, *264*(1), 204–219. <https://doi.org/10.1111/imr.12263>
- Stowe, I., Lee, B., & Kayagaki, N. (2015). Caspase-11: Arming the guards against bacterial infection. *Immunological Reviews*, *265*(1), 75–84. <https://doi.org/10.1111/imr.12292>

- Sugawara, I., Yamada, H., Hua, S., & Mizuno, S. (2001). Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection. *Microbiology and Immunology*, 45(11), 743–750. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb01310.x>
- Sugawara, I., Yamada, H., Kaneko, H., Mizuno, S., Takeda, K., & Akira, S. (1999). Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18- gene-disrupted mice. *Infection and Immunity*, 67(5), 2585–2589.
- Tauchi-Sato, K., Ozeki, S., Houjou, T., Taguchi, R., & Fujimoto, T. (2002). The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. *Journal of Biological Chemistry*, 277(46), 44507–44512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207712200>
- Toledo, D. A. M., Roque, N. R., Teixeira, L., Mil??n-Garc??s, E. A., Carneiro, A. B., Almeida, M. R., ... Melo, R. C. N. (2016). Lipid body organelles within the parasite trypanosoma cruzi: A role for intracellular arachidonic acid metabolism. *PLoS ONE*, 11(8), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160433>
- Velasco-Velázquez, M. A., Barrera, D., González-Arenas, A., Rosales, C., & Agramonte-Hevia, J. (2003). Macrophage—Mycobacterium tuberculosis interactions: role of complement receptor 3. *Microbial Pathogenesis*, 35(3), 125–131. [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(03\)00099-8](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(03)00099-8)
- Viala, J., Chaput, C., Boneca, I. G., Cardona, A., Girardin, S. E., Moran, A. P., ... Ferrero, R. L. (2004). Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island. *Nature Immunology*, 5(11), 1166–1174. <https://doi.org/10.1038/ni1131>
- Wang, J., Li, B.-X., Ge, P.-P., Li, J., Wang, Q., Gao, G. F., ... Liu, C. H. (2015). Mycobacterium tuberculosis suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nature Immunology*, 16(3), 237–245. <https://doi.org/10.1038/ni.3096>
- Watanabe, T., Asano, N., Fichtner-feigl, S., Gorelick, P. L., Tsuji, Y., Matsumoto, Y., ... Strober, W. (2010). / 0 % Dpousjcvuft Up Npvtf Iptu Efgfotf Bhbjotu) Fmjdpcbdufs Qzmpsj Wjb Joevdujpo Pg Uzqf * */ Boe Bdujwbujpo Pg Uif * 4 (' Tjhobmjoh Qbuixbz, 120(5). <https://doi.org/10.1172/JCI39481DS1>
- Wei, P., Taniguchi, S., Sakai, Y., Imamura, M., Inoguchi, T., Nawata, H., ... Ikuyama, S. (2005). Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) is conjointly regulated by PU.1 and AP-1 in macrophages. *Journal of Biochemistry*, 138(4), 399–412. <https://doi.org/10.1093/jb/mvi136>
- Weller, P. F., Ackerman, S. J., Nicholson-Weller, a, & Dvorak, a M. (1989). Cytoplasmic lipid bodies of human neutrophilic leukocytes. *The American Journal of Pathology*, 135(5), 947–959.
- Weller, P. F., Monahan-Earley, R. A., Dvorak, H. F., & Dvorak, A. M.

(1991). Cytoplasmic lipid bodies of human eosinophils. Subcellular isolation and analysis of arachidonate incorporation. *The American Journal of Pathology*, 138(1), 141–8. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1886053&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Freitas, 2014 – Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em biologia celular e molecular, IOC FIOCRUZ