



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

André Alves Dias

Efeito da proteína Hlp micobacteriana na indução da secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares humanas

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

Orientadora: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Rio de Janeiro
Agosto/2011

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Microbiologia Celular – Pavilhão de Hanseníase – Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob a orientação da Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

André Alves Dias

Efeito da proteína Hlp micobacteriana na indução da secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares humanas

Orientadora: Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 05/08/2011

EXAMINADORES:

Dr. Geraldo Moura Batista Pereira – Fundação Oswaldo Cruz (Presidente)
Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto – Fundação Oswaldo Cruz (Membro)
Dra. Verônica Schmitz Pereira – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Membro)
Dra. Alice de Miranda Machado – Fundação Oswaldo Cruz (Suplente/Revisora)
Dr. Raphael Hirata Junior – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Suplente)

Rio de Janeiro
Agosto/2011

A todos da minha família, em especial aos meus pais Idelci e Vera, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem no meu sucesso. Sem eles, não teria chegado nem na metade do caminho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me abençoar todos os dias e me permitir completar mais esta etapa;

Aos meus pais Idelci e Vera, por me apoiarem em todas as minhas escolhas e pela presença sempre constante mesmo que não seja física;

Ao meu irmão Vitor, por ser um amigo sempre presente e verdadeiro;

Ao meu sobrinho João Vitor, por me fazer esquecer todos os meus problemas;

Às minhas avós Adélk e Maria, que na brancura de seus cabelos me passam verdadeiros ensinamentos de vida;

A todos da minha família, por serem a base da minha vida;

Aos meus amigos, por todos os momentos de distração que me proporcionam;

À minha orientadora Dra. Maria Cristina, pelo exemplo de profissionalismo e pela capacidade de ensinar e ajudar sempre com muita dedicação e paciência;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Celular: Fernanda (pela agradável companhia e pela grande boa vontade em ajudar sempre de bom humor); Katherine (pela amizade e pelo apoio que me deu na hora que eu mais precisei); Léo, Adriano e Júlio (pela amizade de cada um e por todos os momentos de descontração dentro e fora do laboratório); Luciana (pela paciência em ajudar e ensinar sempre com muito carinho); Robertha (pela ajuda sempre presente na hora do “aperto”); Vivi (por sempre ouvir minhas

reclamações em qualquer momento); Natasha (por ser uma aluna dedicada e solícita); Débora (pela grande amizade); João (pelo apoio e pela purificação da Hlp); Flávio (pelos conselhos); Lidiane, Juliana, Thabata, Fabrício, Rafael e Rodrigo (por serem sempre solícitos em ajudar);

A todos do Pavilhão de Hanseníase: Luana, Dioguinho e Carol “Baiana” (pela amizade e por me fazerem rir até nos piores momentos); Thaís (por ser uma amiga tão carinhosa e atenciosa); Verônica (pela agradável convivência); Dr. Geraldo, Dr. Milton, Harrison, Lizânia, Sidra, Adalgiza, Jorge Luiz, Marcinha, Mara e Amanda (pelo apoio e suporte a todo momento); Daniel, Seu Roberto, Seu Paulo, Seu Sales, Rafael Petito, Tamiris, Ariane, Marisa, Danuza, Marjorie, Laís, Íris, Isabela, Valcemir, Thiago, Carolzinha, Xuxu, Paula e Suellen (pelos agradáveis “bate-papos” no corredor); Cris (por carregar todo o departamento nas costas sem nunca perder o humor); Solange (por ser diversão garantida); Elisa, Andréa, Lúcia e Benedita (por me aturarem).

À Dra. Lillian (UERJ), pela doação do CpG e do LPS e pela ajuda intelectual para os experimentos iniciais;

À Dra. Alice, pela revisão dessa dissertação;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelos valiosos ensinamentos e pelas excelentes aulas ministradas;

À CAPES, por financiar este projeto.

**“A beleza de ser um eterno
aprendiz...”**

Gonzaguinha

A resposta imune inata local ativada pelo patógeno, através do seu reconhecimento por receptores como os *toll-like* (TLR), é determinante na natureza da resposta imune adquirida gerada após a infecção. Neste contexto, tem sido demonstrado que o reconhecimento do DNA micobacteriano rico em motivos CpG não metilados pelo receptor TLR-9 representa uma via importante na ativação da produção de IL-12 por células dendríticas favorecendo a subsequente geração de resposta imune Th1. As micobactérias expressam em abundância uma proteína catiônica semelhante às histonas de outras bactérias, denominada Hlp, presente tanto no envelope como no nucleóide bacteriano. A Hlp localizada no envoltório micobacteriano tem sido implicada no processo de adesão das micobactérias ao epitélio respiratório visto que interage com proteoglicanas da superfície destas células. Por outro lado, foi mostrado que o complexo Hlp-CpG ativa a sinalização celular via TLR-9, induzindo a produção de mediadores inflamatórios em macrófagos *in vitro* e um aumento na resistência à infecção por *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. As micobactérias penetram no hospedeiro através das vias aéreas superiores, e as células epiteliais expressam receptores da imunidade inata, contribuindo para a resposta imune inata local. Este trabalho teve como objetivo investigar a capacidade da proteína Hlp de ativar, quando combinada ou não ao oligonucleotídeo sintético CpG, a resposta imune inata de células epiteliais alveolares. Para atingir este objetivo, utilizamos a proteína Hlp recombinante (rHlp) de *M. bovis* BCG. O complexo rHlp-oligonucleotídeo CpG induziu uma produção aproximadamente 2 vezes maior de interleucina 8 (IL-8) em relação às células só estimuladas com CpG e de quase quatro vezes em relação aos níveis observados com a célula só estimulada com rHlp, indicando um sinergismo entre estes dois estímulos. Este mesmo efeito da Hlp sobre a CpG foi observada em macrófagos, quando a produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foi mensurado. Também testamos a capacidade de peptídeos sintéticos derivados da sequência da Hlp compreendendo os sítios de ligação a DNA e proteoglicanas, respectivamente, quanto à capacidade de mimetizar o efeito imunoestimulador da proteína inteira. Estes ensaios confirmaram que a presença de um sítio de ligação a DNA na molécula é essencial para sua atividade imunoestimuladora sobre o CpG. Finalmente, quando passamos a utilizar a micobactéria inteira em vez da rHlp como estímulo, a adição de CpG ao *M. smegmatis* selvagem, mas não mutante para o gene *hlp*, aumentou a produção de IL-8 e RANTES pelas células epiteliais. Os resultados descritos acima indicam que as células epiteliais respiratórias podem reconhecer micobactérias via TLR-9 e, assim, participar da resposta imune inata no sítio da infecção. Dentro deste contexto, aliado ao fato de tratar-se de uma proteína muito conservada encontrada em todas as micobactérias, a Hlp tem potencial de, quando combinada a DNA, ser empregada tanto como um bom imunógeno, assim como adjuvante em intervenções imunes contra as micobacterioses tais como a vacinação intranasal.

Palavras-chave: Micobactérias, proteína semelhante à histona (Hlp), DNA, CpG, mediadores inflamatórios e células epiteliais alveolares humanas.

The local innate immune response induced by a pathogen at the site of infection, through its recognition by Toll-like receptors (TLRs), plays an important role in modeling the subsequent acquired immune response. In this context, it has been shown that recognition of mycobacterial DNA through its unmethylated CpG motifs by TLR-9 represents an important pathway for the production of IL-12 by dendritic cells favoring the subsequent generation of Th1 immune response. Mycobacteria express a major cationic histone-like protein (Hlp), which is present in the cell envelope and in the bacterial nucleoid. The bacterial surface-exposed Hlp has been implicated in mycobacterium adhesion on respiratory epithelium due to the capacity of Hlp to interact with cell surface proteoglycans. On the other hand, it has been shown that complexes of Hlp–CpG oligonucleotide activate cell signaling through TLR-9, inducing the production of inflammatory mediators in macrophages *in vitro*, and increasing resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection *in vivo*. The major port of entry of Mycobacteria in the host is the air way tract, and epithelial cells are known to express receptors of innate immunity and participate of local innate immune response. The objective of the present study was to investigate the capacity of Hlp to activate an innate immune response in alveolar epithelial cells. Cells were stimulated with *M. bovis* BCG recombinant Hlp (rHlp), combined or not with CpG oligonucleotide. The Hlp-CpG complex induced interleukin 8 (IL-8) production twice higher than the cell stimulated only with CpG, and 4 times higher than the cell treated only with Hlp, indicating a synergism between these two stimuli. The same effect was also observed in macrophages when the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured. We also tested the capacity of synthetic peptides displaying amino acid sequences identical to the Hlp DNA and proteoglycan binding sites for their ability to mimic the immune stimulatory effect of the whole protein. These assays confirmed that the presence of a DNA-binding site in the molecule is essential of its immune stimulating activity over CpG. Finally, the addition of CpG to wild type *M. smegmatis*, but not to the mutant strain for the gene *hlp*, increased the production of IL-8 and RANTES by epithelial cells. The results described above indicate that respiratory epithelial cells can recognize mycobacteria via TLR-9 and thus participate of the innate immune response at the site of infection. These observations, in addition to the fact that Hlp is a very conserved protein found in all mycobacteria, suggest that when combined with DNA Hlp can be potentially used both as a good immunogen, as well as an adjuvant, in immune interventions against mycobacteria such as intranasal vaccination.

Key-words: Mycobacteria, histone-like protein (Hlp), DNA, CpG, inflammatory mediators and human alveolar epithelial cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Albumina de soro bovino, dextrose e catalase
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
BB	Boderline boderline
BSA	Albumina sérica bovina
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BL	Boderline lepromatoso
BT	Boderline tuberculóide
CpG-ODN	Oligonucleotídeo CpG
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D.O.	Densidade óptica
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
HBHA	Adesina hemaglutinina ligante de heparina
Hlp	Proteína semelhante a histona
IFN- γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
kDa	Kilodalton
LAM	Lipoarabinomanana
LPS	Lipopolissacarídeo
LL	Lepromatoso lepromatoso
MB	Multibacilar
MCP-1	Proteína quimiotática de monócito-1
MDP-1	Proteína-1 ligante de DNA
MTC	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPD	O-fenilenediamina
PBMC	Células Mononucleares de Sangue Periférico

PIM	Fosfatidilinositol manosídeos
PB	Paucibacilar
PBS	Salina tamponada com fosfato
PEES	Penicilina e estreptomicina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
rHlp	Proteína semelhante a histona recombinante
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SFB	Soro fetal bovino
TLRs	Receptores <i>Toll-like</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
wt	Selvagem
X g	Velocidade de sedimentação em unidade gravitacional
Δhlp	Mutante para o gene <i>hlp</i>

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Ilustração	Páginas
Tabela 1: Micobactérias atípicas patogênicas para o homem, de acordo com a classificação de Runyon & Timpe (1981)	10
Tabela 2: Peptídeos sintéticos contendo sequências de aminoácidos da proteína Hlp micobacteriana utilizados neste trabalho	30
Figura 1: Organização espacial do envelope celular micobacteriano (Sani <i>et al.</i> , 2010)	03
Figura 2: Mapa representativo da distribuição mundial da hanseníase no ano de 2009 (WHO, 2010)	05
Figura 3: Mapa representativo da distribuição mundial da tuberculose no ano de 2009 (WHO, 2010)	09
Figura 4: A imunidade inata no epitélio respiratório (Parker & Prince, 2011)	16
Figura 5: Via de sinalização mediada por TLR-9 (Kumagai <i>et al.</i> , 2008)	18
Figura 6: Modulação da resposta imune por células epiteliais respiratórias (Mayer & Dalpke, 2007)	19
Figura 7: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hlp de diferentes micobactérias (Lefrançois <i>et al.</i> , 2011)	22
Figura 8: Seqüência de aminoácidos da Hlp de <i>M. leprae</i> e <i>M.</i>	

<i>tuberculosis</i> e identificação dos sítios de ligação ao DNA (região I) e à matriz extracelular (regiões I e II) (Portugal <i>et al.</i> , 2008)	22
Figura 9: Análise do grau de pureza e integridade da proteína Hlp recombinante de BCG	36
Figura 10: Produção de TNF- α por CMS humano após tratamento com rHlp, peptídeos ou DNA genômico micobacteriano	38
Figura 11: Ligação da proteína rHlp de BCG à colágeno I e DNA genômico micobacteriano	40
Figura 12: Secreção de IL-8 e MCP-1 por células epiteliais alveolares em resposta ao oligonucleotídeo CpG	42
Figura 13: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao oligonucleotídeo CpG	43
Figura 14: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com rHlp na presença ou ausência de CpG	45
Figura 15: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao estímulo com rHlp na presença ou ausência de CpG	46
Figura 16: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com peptídeos sintéticos derivados da seqüência da Hlp na presença ou ausência de CpG	48
Figura 17: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao estímulo com peptídeos sintéticos derivados da seqüência da Hlp na presença ou ausência de CpG	49
Figura 18: <i>Immunoblotting</i> do lisado total de <i>M. smegmatis</i>	

selvagem e mutante para o gene <i>hlp</i>	50
Figura 19: Efeito da proteína Hlp na associação de <i>M. smegmatis</i> às células epiteliais alveolares	52
Figura 20: Efeito da proteína Hlp na associação de <i>M. smegmatis</i> aos macrófagos	52
Figura 21: Secreção de IL-8 e RANTES por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com <i>M. smegmatis</i> wt ou Δhlp na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG ou DNA micobacteriano	54
Figura 22: Secreção de TNF- α pelos macrófagos em resposta ao estímulo com <i>M. smegmatis</i> wt ou Δhlp na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG ou DNA micobacteriano	55

Conteúdo	Páginas
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	xiii
SUMÁRIO	xvi
INTRODUÇÃO	01
1. As micobactérias	01
2. As micobacterioses	04
2.1. A hanseníase	04
2.2. A tuberculose	07
2.3. Infecções atípicas	09
3. O epitélio do trato respiratório: a principal via de entrada das micobactérias	13
4. O epitélio respiratório e sua interação com microrganismos ...	15
5. A proteína Hlp e sua importância na patogênese das micobactérias	20
OBJETIVOS	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Meios de cultivo de células eucarióticas	25
2. Meio de cultivo de micobactérias	25
3. Linhagens celulares	25
4. Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS) humano	26
5. Cepas micobacterianas	26
6. Quantificação de micobactérias	27
7. Obtenção do lisado total de <i>M. smegmatis</i> wt e Δhlp	27
8. Proteína recombinante de <i>M. bovis</i> BCG	27

9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)	28
10. <i>Immunoblotting</i>	29
11. Coloração do gel pela prata	29
12. Peptídeos sintéticos	30
13. Extração de DNA genômico de <i>M. bovis</i> BCG	30
14. Ligação da proteína rHlp ao DNA genômico micobacteriano ou ao colágeno I	31
15. Marcação de <i>M. smegmatis</i> com PKH2 fluorescente	32
16. Ensaio de associação de <i>M. smegmatis</i> wt ou Δhlp com células epiteliais alveolares e macrófagos	33
17. Ensaio de estimulação de células epiteliais alveolares e macrófagos	33
18. Dosagem de citocinas e quimiocinas	34
19. Dosagem de óxido nítrico	35
RESULTADOS	36
1. Ensaio inicial de controle de qualidade e padronização	36
1.1. Análise do grau de pureza e integridade da rHlp de BCG	36
1.2. Análise da contaminação por LPS na rHlp de BCG, peptídeos e DNA genômico de BCG	37
1.3. Ligação da rHlp à colágeno I e DNA genômico micobacteriano	39
1.4. Padronização da concentração ideal do oligonucleotídeo CpG necessária para estimular células epiteliais alveolares e macrófagos	41
2. Efeito da proteína rHlp ligada ao oligonucleotídeo CpG na produção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos	44
3. Efeito dos peptídeos derivados da seqüência da Hlp combinados com o oligonucleotídeo CpG na produção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos	47

4. Efeito da adição de CpG à cepas de <i>M. smegmatis</i> selvagem e mutante para o gene <i>hlp</i> na indução de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos ...	50
DISCUSSÃO	56
CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1. As micobactérias

As micobactérias estão entre os mais importantes microrganismos patogênicos, causando doenças como hanseníase e tuberculose. Apesar de passados mais de 100 anos do descobrimento de seus agentes etiológicos, estas doenças continuam associadas a altos níveis de morbidade e mortalidade, respectivamente. Estas bactérias pertencem ao filo *Actinobacteria*, e costumam ocorrer como bastonetes retos ou ligeiramente curvados, embora também possam aparecer em forma de hifas que se fragmentam em elementos cocóides ou em bastões (Tortora *et al.*, 2005).

Muitas das características exclusivas do gênero *Mycobacterium* se devem à sua parede celular incomum, rica em ácidos micólicos, que formam uma camada cérea resistente à água, fazendo com que estas bactérias sejam extremamente resistentes a situações adversas, como o ressecamento. Além disso, os ácidos micólicos são também responsáveis pela álcool-ácido resistência, característica marcante deste gênero. Apesar de serem consideradas como Gram-positivas, por se corarem fracamente por este método, estudos recentes confirmam a presença de uma membrana externa no envelope micobacteriano, assemelhando-se, neste aspecto, às bactérias Gram-negativas (Hoffman *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008).

As micobactérias podem ser classificadas em grupos de acordo com o tempo de crescimento e a produção de pigmento quando expostas à luz. As variações na produção de pigmento classificam estes microrganismos em três grupos: fotocromogênicas, escotocromogênicas e não cromogênicas. As fotocromogênicas são bactérias que produzem pigmento apenas quando expostas à luz, enquanto que as escotocromogênicas são micobactérias que produzem pigmento mesmo na ausência de luz, e por fim as não cromogênicas são as que não produzem pigmento mesmo na presença de luz (Murray *et al.*, 2006).

Quanto ao tempo de crescimento, as micobactérias podem ser divididas em duas categorias: as de crescimento rápido e as de crescimento lento (Runyon 1959; Collins *et al.*, 1997). As micobactérias de crescimento rápido

são as espécies que, em condições ideais de crescimento, formam colônias visíveis em meio sólido em menos de sete dias. O tempo de geração destas micobactérias varia de duas a cinco horas. Por outro lado, as micobactérias de crescimento lento, quando cultivadas sob as mesmas condições, produzem colônias que podem ser observadas somente após sete dias de incubação e seu tempo de geração varia entre treze e vinte horas (Goodfellow & Wayne, 1982).

Também podem ser divididas em três grupos com base no critério clínico. O primeiro grupo consiste de micobactérias patogênicas, que são estritas ao homem ou aos animais e geralmente não são encontradas no ambiente. O segundo grupo inclui as micobactérias conhecidas como oportunistas ou patógenos ocasionais por causarem doenças em humanos ou animais somente em circunstâncias especiais, como por exemplo, no caso de indivíduos imunossuprimidos ou em contaminações pós-cirúrgicas. A maioria das bactérias deste grupo é encontrada na natureza. O terceiro grupo é constituído pelas espécies não-patogênicas ou excepcionalmente patogênicas. Este último grupo está normalmente presente no ambiente e na natureza (revisto por Tortoli, 2006).

As micobactérias são habitantes naturais de uma ampla variedade de reservatórios ambientais, incluindo água, solo, aerossóis, protozoários, animais e humanos (revisto por Ingen *et al.*, 2009) e a principal característica do gênero é a presença de um envoltório celular extremamente rico em lipídeos complexos que não são encontrados em outras bactérias. Este envelope complexo contribui para a integridade estrutural das micobactérias, atuando como uma barreira impermeável às moléculas tóxicas (Hoffman *et al.*, 2008). Neste sentido, uma das grandes preocupações em relação às infecções causadas por estes microrganismos é que a maioria deles é resistente a vários antibióticos e aos agentes quimioterápicos, devido à complexa e peculiar estrutura do envelope celular destas bactérias (Zuber *et al.*, 2008). Além disso, de um modo geral, as micobactérias são também relativamente resistentes às substâncias alcalinas e a vários desinfetantes químicos, dificultando, assim, a prevenção da transmissão dessas doenças (Hoffman *et al.*, 2008).

O envelope celular micobacteriano é constituído de dois compartimentos distintos, separados entre si pelo espaço periplasmático: a

membrana plasmática ou celular, que está em contato com o citoplasma da célula, e a membrana externa conhecida como micomembrana, que constitui a camada mais externa do envelope. A membrana plasmática é formada por uma clássica bicamada de fosfolípidos com proteínas intercaladas, além da presença de outros compostos ligados não covalentemente: os fosfatidilinositol manosídeos (PIMs) e a lipoarabinomanana (LAM). A micomembrana também é formada por uma bicamada lipídica constituída basicamente por glicolípidos, que interagem com ácidos micólicos, covalentemente ligados aos resíduos terminais de arabinose da arabinogalactana. Neste compartimento também estão presentes proteínas intercaladas, bem como PIMs e LAM. Na região mais superficial da micomembrana é encontrada a camada capsular, que consiste de uma complexa matriz composta de proteínas, carboidratos e lipídeos, sendo essa estrutura variável entre as espécies (Hoffman *et al.*, 2008; Zuber *et al.*, 2008; Sani *et al.*, 2010) (**Figura 1**).

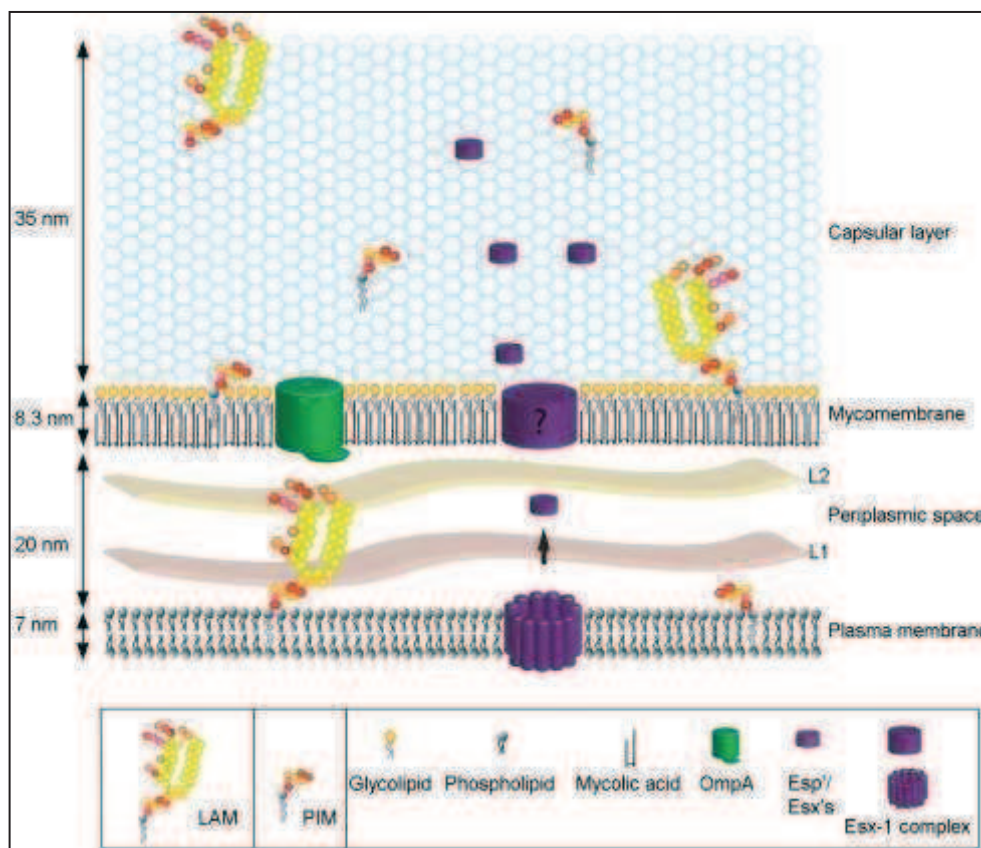


Figura 1: Organização espacial do envelope celular micobacteriano. Este esquema representa o tamanho relativo e a organização das diferentes camadas do envelope, incluindo a membrana plasmática, a micomembrana, o espaço periplasmático e a camada capsular (Santi *et al.*, 2010).

2. As micobacterioses

As duas principais micobacterioses humanas são a hanseníase e a tuberculose, causadas respectivamente pelo *Mycobacterium leprae* e pelo *Mycobacterium tuberculosis*. No entanto, outras espécies do mesmo gênero conhecidas como micobactérias atípicas são capazes de causar infecções oportunistas não só em humanos, como também em animais (Berger *et al.*, 2010; Thomson *et al.*, 2010; Jani *et al.*, 2011).

2.1. A hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta a pele e os nervos periféricos, o que resulta em degeneração do axônio, desmielinização e fibrose, causando a perda de sensibilidade protetora que leva a deformações físicas. O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório identificado como a primeira bactéria causadora de doença humana. Este bacilo infecta preferencialmente os macrófagos e as células de Schwann (revisito por Scollard *et al.*, 2006).

O tratamento da doença surgiu em 1940 com a introdução da dapsona e seus derivados, causando uma revolução no controle da doença, já que o isolamento do paciente não se tornou mais necessário (Barr, 2010).

Apesar de ter sido descoberta há tanto tempo, a hanseníase ainda é considerada um problema de saúde pública em alguns países. De acordo com o relatório oficial, recebido de 121 países e territórios, a prevalência global registrada no começo de 2009 foi de 213.036 casos (WHO, 2010) (**Figura 2**).

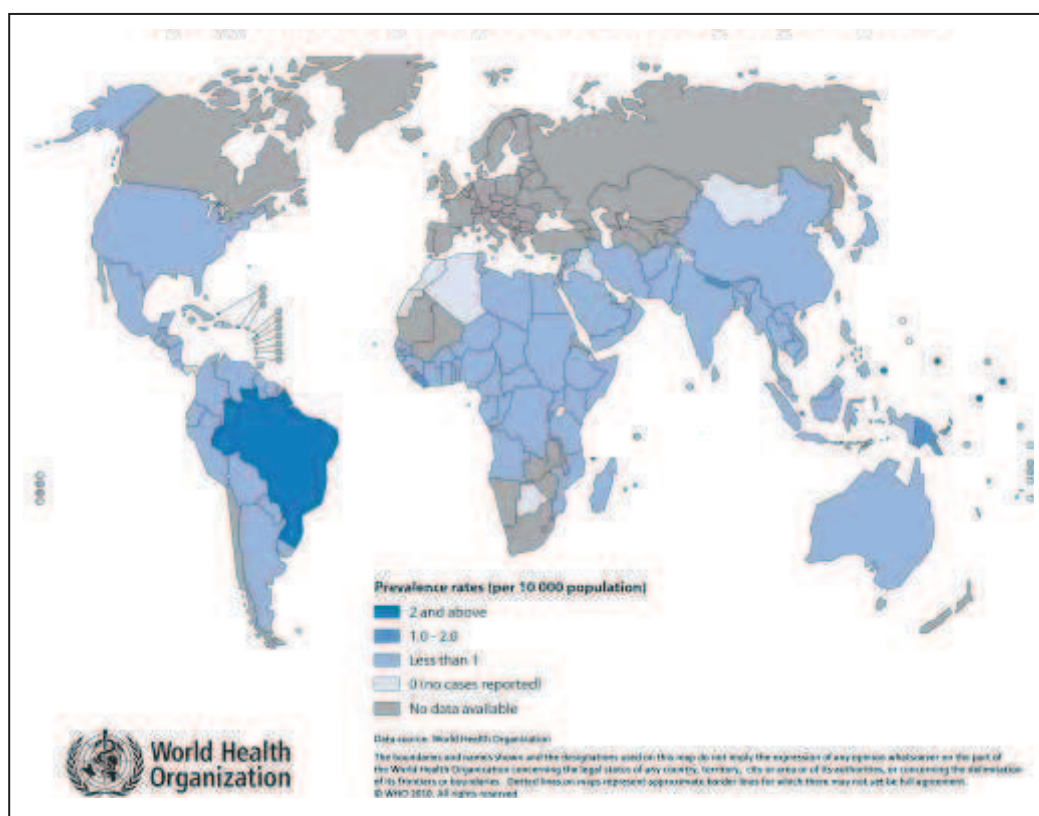


Figura 2: Mapa representativo da distribuição mundial da hanseníase no ano de 2009

(<http://www.who.int/lep/situation/LEPPRATEJAN2009.pdf>)

Na América Latina, o Brasil se destaca, apresentando aproximadamente 80% dos casos do continente, com 37.610 novos casos registrados em 2009; a taxa de prevalência neste mesmo ano foi de 19,64 casos em 100.000 habitantes (WHO, 2010).

A hanseníase pode afetar indivíduos em todas as faixas etárias e em ambos os sexos. Embora a forma de transmissão não esteja bem estabelecida, acredita-se que ela ocorra por contato pessoa-a-pessoa e que o *M. leprae* se dissemine através da inalação de aerossóis ou pelo contato cutâneo com secreções respiratórias e exsudatos de feridas (Job *et al.*, 2008). Estudos histopatológicos da mucosa nasal de pacientes que apresentam a doença em estágio avançado mostram que a principal fonte de dispersão do bacilo é a mucosa nasal e não a pele. Esses estudos sugerem que a liberação do *M. leprae* pela mucosa nasal possa ser a principal forma de transmissão da doença, além de ser a principal porta de entrada para o patógeno, como ocorre em outras doenças causadas por micobactérias (McDougall *et al.*, 1974).

A infecção causada pelo *M. leprae* apresenta um longo período de latência, sendo que o tempo médio de incubação nos pacientes varia desde quatro até trinta anos, aproximadamente (Noordeen *et al.*, 1994). Acredita-se que este longo período de incubação contribua para a transmissão da hanseníase, pois antes mesmo da manifestação clínica dos sintomas, o indivíduo já seria um transmissor em potencial.

As manifestações clínicas da doença dependem da resposta imune dos indivíduos infectados, e foram descritas formando um espectro contínuo dos estados da doença (Ridley & Jopling, 1966). Este espectro apresenta duas formas polares opostas, consideradas imunologicamente estáveis. Em um dos pólos do espectro estão os pacientes que possuem uma boa resposta imune celular, apresentando a forma tuberculóide polar (TT); no outro pólo estão os pacientes que possuem uma imunidade celular deficiente, manifestando a forma lepromatosa polar (LL). Os estados intermediários do espectro são: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatosa (BL). A terapia e as mudanças na imunidade podem levar a modificação da manifestação da doença dentro desse espectro.

A OMS estabeleceu a classificação clínica dos pacientes em dois grupos para melhor delimitar os esquemas terapêuticos: 1) Multibacilar (LL, BL, BB), caracterizada pela presença de carga bacilar positiva na biopsia, seis ou mais lesões cutâneas e esfregaço positivo para a presença da bactéria; e 2) Paucibacilar (TT, BT), onde raros bacilos são observados, apresentando cinco ou menos lesões cutâneas e esfregaço negativo (WHO, 1998).

É importante ressaltar que os danos nos nervos periféricos estão presentes em todas as formas de manifestação da doença. Nas formas iniciais, os nervos sensoriais e motores da pele são afetados, levando a perda da sensibilidade a estímulos externos, enquanto os danos em nervos cutâneos mais profundos podem levar a perda da função muscular e a paralisia. A perda das pontas dos dedos, uma característica da desfiguração dos pacientes com hanseníase, ocorre devido à osteoporose resultante da inflamação, traumas e a infecções bacterianas secundárias (Wilder-Smith & Brakel, 2008).

O tratamento da doença é feito através de poliquimioterapia, que é uma associação dos antibióticos dapsona, clofazimina e rifampicina, empregada para eliminar o bacilo (WHO, 2010). Para a prevenção é utilizada a vacina BCG

(bacilo Calmette-Guérin), elaborada a partir de uma bactéria atenuada de origem bovina (*Mycobacterium bovis*) e que confere proteção parcial contra a hanseníase (Düpre *et al.*, 2008). Sendo assim, o Ministério da Saúde estabeleceu como norma a vacinação de todos os contatos intradomiciliares de pacientes com hanseníase e que se apresentem sem presença de sinais e sintomas (Ministério da Saúde, 2009).

2.2. A tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), ou bacilo de Koch, um patógeno intracelular facultativo que pode afetar todos os órgãos, em especial os pulmões. A transmissão é direta de pessoa-a-pessoa, através de gotículas aerossóis contendo o bacilo, quando o indivíduo com tuberculose ativa pulmonar tosse, fala, espirra ou cospe. A probabilidade de transmissão de uma pessoa para outra depende do número de bacilos expelidos por um transportador, a eficácia da ventilação, a duração da exposição e a virulência da cepa micobacteriana. Pessoas com contato próximo àquelas com tuberculose sofrem maior risco de contaminação (revisto por Kumar *et al.*, 2010)

Outros grupos sob risco incluem pessoas de áreas onde a tuberculose é comum, pacientes com o sistema imunológico debilitado (por exemplo, com AIDS), profissionais da saúde que lidam com pacientes de risco, pessoas não servidas por sistema de saúde, populações de baixa renda, crianças expostas a adultos nas categorias de risco e usuários de drogas injetáveis ilícitas (revisto por Roberts *et al.*, 1998).

A infecção pode ser causada também por *M. bovis* e *M. africanum*. Estes organismos estão agrupados juntamente com *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. canetti*, *M. pinnipedi* e *M. microti* no Complexo *M. tuberculosis* (MTC), de acordo com suas características sorológicas, bacteriológicas, bioquímicas e por sua estreita relação filogenética e patogênica (Kremmer *et al.*, 1999).

Como já foi mencionado, anteriormente, a infecção se instala principalmente no pulmão (tuberculose pulmonar), porém pode se apresentar de forma disseminada (tuberculose miliar) ou então atingindo as meninges

(meningite tuberculosa). Para todos os propósitos práticos, somente pacientes com tuberculose ativa nos pulmões podem espalhá-la a outras pessoas. Embora pessoas com tuberculose latente não transmitam a infecção, é importante que elas sejam tratadas para prevenir a progressão para doença tuberculose ativa (Ahmad, 2010).

Um importante aspecto para o controle da tuberculose está relacionado com o tratamento, que consiste da administração das drogas de primeira linha: isoniazida, rifampicina e pirazinamida. Em caso de falha ou impossibilidade deste esquema, o tratamento terá continuidade com a administração das drogas de segunda linha: estreptomicina, etambutol, etionamida e pirazinamida (WHO, 2010). A falha de um esquema terapêutico relaciona-se principalmente à resistência do *M. tuberculosis* às drogas utilizadas no tratamento. Normalmente a resistência surge quando um paciente é submetido a um esquema terapêutico inadequado, quando não se observa as recomendações para a ingestão do medicamento ou quando ocorre o abandono do tratamento (WHO, 2010).

O sucesso do controle da infecção pelo *M. tuberculosis* ocorre em 90% dos indivíduos expostos ao bacilo, enquanto 10% irão desenvolver a doença ativa. A infecção latente pelo *M. tuberculosis* é ativamente controlada pela resposta imunológica, mas quando a imunidade diminui, ocorre a reativação, o que leva à tuberculose ativa. A qualidade e a magnitude da resposta imune, por isso, decide se o indivíduo infectado permanece saudável, apesar de abrigar o patógeno, ou se a infecção se transforma em doença (Kaufmann, 2005; Young & Dye, 2006).

A prevenção usual da tuberculose é a vacina BCG (bacilo Calmette-Guérin), que como já foi mencionado, é elaborada a partir de uma bactéria atenuada, de origem bovina (*Mycobacterium bovis*), semelhante ao microrganismo causador da doença. A BCG não impede a infecção e nem o desenvolvimento da tuberculose pulmonar, mas pode conferir proteção para a meningite tuberculosa e para as formas disseminadas da doença (Young & Dye, 2006).

O uso da vacina BCG, que é bastante controverso, basicamente restringe-se aos países de maior prevalência da doença. No Brasil, a BCG está no Calendário Básico de Vacinação e sua aplicação é feita por via intradérmica

no primeiro mês de vida. Caso o indivíduo contraia a doença, o tratamento poliquimioterápico deve ser instituído (WHO, 2010).

Nenhum desenvolvimento de novas drogas tem sido feito para a tuberculose em mais de cinco décadas, e a única vacina tem quase um século de idade. Ainda havia mais de 9 milhões de novos casos em 2009 com uma prevalência global de 170 casos por 100.000 habitantes (**Figura 3**) e essa doença curável mata 1,7 milhões de pessoas por ano. No Brasil, a tuberculose é a terceira causa de óbitos por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes com AIDS, estando entre os 22 países que ainda concentram 80% dos casos da doença no mundo (WHO, 2010).

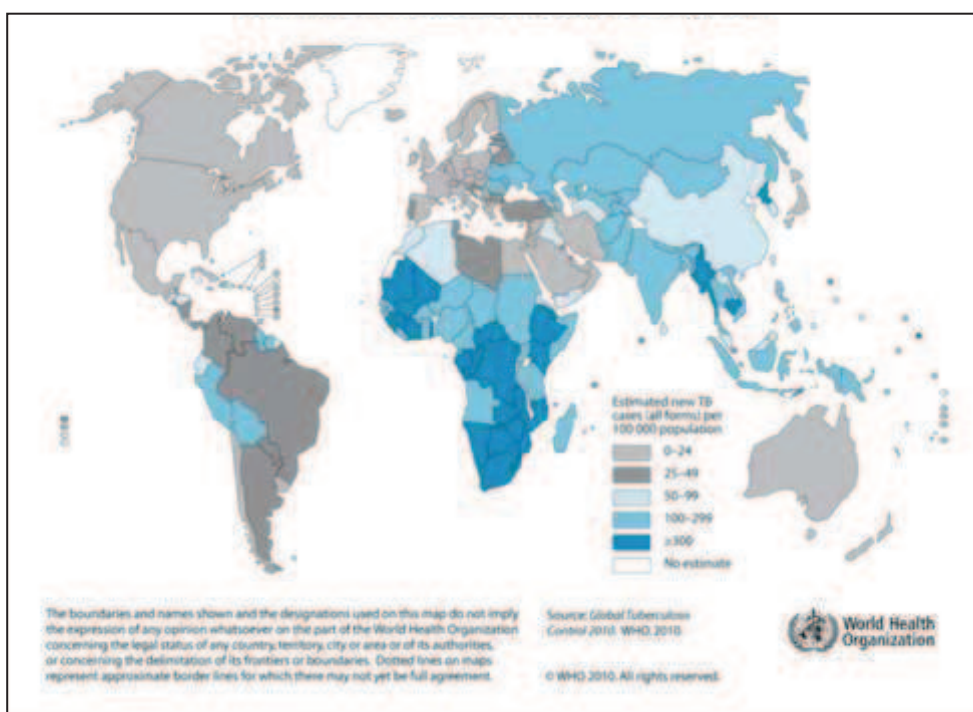


Figura 3: Mapa representativo da distribuição mundial da tuberculose no ano de 2009
(http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/TBincidence_2009.png)

2.3. Infecções atípicas

As infecções atípicas são causadas por micobactérias não-tuberculosas ou ambientais e os sintomas destas doenças muitas vezes são semelhantes aos da tuberculose, porém as contaminações só ocorrem em circunstâncias especiais (Wayne, 1985). Atualmente, em razão do desenvolvimento de métodos mais apurados de detecção e pela importância das micobactérias atípicas como causadoras de doenças em portadores de AIDS, transplantados

e imunossuprimidos por drogas, o estudo deste grupo de micobacterioses tem sido mais valorizado (Taippeiner & Wolff, 1993).

A transmissão deste tipo de infecção pode ocorrer através do contato pessoa-pessoa, no entanto é mais comum que ocorra quando o indivíduo está em exposição direta com o bacilo no ambiente (Heifeits, 2004). A principal porta de entrada destas micobactérias no organismo é o trato respiratório, porém pode ocorrer também através de injúrias na pele ou através de aparelhos hospitalares de uso comum (Fontana, 2008).

Em um estudo feito por Runyon e Timpe (1981), foram demonstradas as micobactérias atípicas mais comuns, bem como suas apresentações clínicas, o tempo de crescimento e a classificação quanto à produção de pigmentos (Tabela 1).

Tabela 1: Micobactérias atípicas patogênicas para o homem, de acordo com a classificação de Runyon & Timpe (1981)

Grupos	Espécies de crescimento	Apresentação clínica comum	Tempo
Grupo I	Fotocromogênicas		
	<i>M. kansasii</i>	Pulmonar e ganglionar	Lento
	<i>M. marinum</i>	Lesões cutâneas	Rápido
	<i>M. simiae</i>	pulmonar	Lento
	<i>M. asiaticum</i>	pulmonar	Lento
Grupo II	Escotocromogênicas		
	<i>M. scrofulaceum</i>	Pulmonar e ganglionar	Lento
	<i>M. xenopi</i>	pulmonar	Lento
	<i>M. szulgai</i>	pulmonar	Lento
	<i>M. goodii</i>	*Não patogênica	
	<i>M. flavescens</i>	*Não patogênica	
Grupo III	Não cromogênicas		
	Complexo <i>M. avium</i> (inclui <i>M. intracellulare</i>)	Pulmonar, ganglionar ou disseminada	Lento
	<i>M. malmoense</i>	pulmonar	Lento
	<i>M. hemophilum</i>	Cutânea e de tecidos moles	Lento
	<i>M. terrae</i>	* Não patogênica	Lento
	<i>M. ulcerans</i>	Úlceras cutâneas	Lento
	<i>M. nonchromogenicum</i>	Úlceras cutâneas	Lento
Grupo IV	De Crescimento Rápido-Complexo		
	<i>M. fortuitum</i> (inclui <i>M. chelonae</i>), <i>M. abscessus</i>	Pulmonar, tecidos moles, ósseos	Rápido
	<i>M. thermoresistibile</i>	* Não patogênica	Rápido
	<i>M. neoaurum</i>	*Não patogênica	Rápido

* Usualmente saprófitas, porém há registros de doenças provocadas por elas.
Fonte: adaptado de Runyon (ATS Statement, 1997) In: Ministério da Saúde, 2007.¹⁰

Como observado na **tabela 1**, as infecções podem atingir diversos órgãos e tecidos tais como a pele, o sistema respiratório, o sistema esquelético e muscular, o trato urinário e o sistema nervoso central, sendo que as que afetam os pulmões são as mais freqüentes. As formas disseminadas também

podem ocorrer principalmente em indivíduos imunocomprometidos (revisto por Portaels, 1995).

O estudo da prevalência destes tipos de enfermidades é escasso devido a vários motivos: essas doenças não são encontradas com frequência em diversos países, a sua importância clínica nem sempre é clara, em muitos países em desenvolvimento as infecções não são diagnosticadas ou não relatadas devido à falta de infraestrutura de laboratórios e hospitais, ou simplesmente não há interesse pelos serviços de saúde pública, que subestimam a importância destas doenças (revisto por Jarzembowski & Young, 2008).

As micobactérias causadoras de infecções atípicas mais estudadas até o momento pertencem ao Complexo *M. avium*, devido a seus variados mecanismos que permitem que este grupo infecte com eficiência macrófagos, monócitos e células epiteliais (Bermudez *et al.*, 1991; Yamazaki *et al.*, 2006). Estes patógenos podem causar diversos danos pulmonares em pacientes imunocomprometidos ou, até mesmo, em pessoas consideradas imunocompetentes (Middleton *et al.*, 2000). Diferentemente de grande parte das micobactérias oportunistas, estes bacilos são capazes de aderir e, posteriormente invadir as células do hospedeiro, suprimir a resposta inflamatória local e translocar através da parede do trato respiratório (Yamazaki *et al.*, 2006). Esta habilidade de translocação através das células epiteliais tem chamado bastante atenção, já que representa uma forma do bacilo se disseminar para outros órgãos do corpo.

Como dito anteriormente, as doenças pulmonares são as mais frequentes neste tipo de infecção e não somente o Complexo *M. avium* é capaz de colonizar o epitélio do trato respiratório. O *M. kansasii*, por exemplo, é conhecido por causar a cavitação das paredes do pulmão, porém também são capazes de causar infecções disseminadas, no espaço pleural, nos ossos e articulações, nas meninges e nos gânglios (Kaur *et al.*, 2011; Mazor *et al.*, 2010; Williams *et al.*, 2010). Dentro do grupo que causa infecções pulmonares ainda estão o *M. simiae*, *M. asiaticum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. szulgai*, *M. malmoense*, *M. abscessus*, *M. chelonae* e as espécies pertencentes ao Complexo *M. fortuitum* (revisto por Alvarez-Uria, 2010).

Dentre as que provocam lesões na pele, a principal micobactéria atípica é o *M. ulcerans*, agente da úlcera de Buruli, uma doença com grande impacto na saúde humana. Esta doença é caracterizada por ulcerações típicas devido ao desenvolvimento de necrose da derme. As úlceras tendem a afetar os membros, mas também podem ocorrer em outras partes do corpo: freqüentemente causam destruição da pele e do tecido subcutâneo, resultando em profundas deformações e sequelas, e, geralmente, é necessária a realização de intervenções cirúrgicas, incluindo amputação do membro (Meyers, 1994; revisto por Silva *et al.*, 2009). Infecções causadas por *M. marinum* também resultam em lesões cutâneas, porém em menos gravidade e freqüência (Tran *et al.*, 2008).

O *M. haemophilum* também é responsável por causar lesões na pele, entretanto, é mais comum que cause linfadenite cervical, podendo evoluir para uma infecção disseminada, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Minani *et al.*, 2010). Já o *M. genavense* é um patógeno oportunista capaz de causar infecções em sítios gastrointestinais como o fígado, o baço e intestino. No entanto, ocorre quase que exclusivamente em pacientes portadores do vírus da AIDS (Escapa *et al.*, 2010).

O reconhecimento do patógeno causador das infecções é o primeiro passo para iniciar o tratamento das micobacterioses atípicas. Contudo, os métodos de detecção ainda não são totalmente apurados, o que dificulta a terapêutica das doenças. Além disso, as formas de prevenção ainda são escassas e, em alguns casos, inexistentes (revisto por Esteban & Ortiz-Pérez, 2009).

O tratamento exigido varia de acordo com a espécie. A combinação de drogas antituberculosas de primeira linha (isoniazida, rifampicina, etambutol), claritromicina, aminoglicosídeos e/ou quinolonas é usada para infecções por espécies de crescimento lento. No caso de infecções por micobactérias de crescimento rápido são empregados os macrolídeos, quinolonas, amicacina e outros antibióticos. O tratamento cirúrgico é também importante para algumas espécies e para infecções localizadas. O tratamento de contaminações por espécies raras ainda não está bem definido e é determinado pelos resultados de testes *in vitro* de cepas individuais. Devido ao número crescente de cepas resistentes, novos antibióticos devem ser usados e a prevenção seria o passo

mais importante para a eliminação de tais doenças (revisto por Esteban & Ortiz-Pérez, 2009).

3. O epitélio do trato respiratório: a principal via de entrada das micobactérias

Atualmente muitos estudos têm sido realizados para investigar a relação entre as células epiteliais e os patógenos. Isto se justifica pelo fato da maioria dos patógenos utilizarem as mucosas dos tratos gastrintestinal e respiratório como porta de entrada para atingir os tecidos internos do hospedeiro (Tortora *et al.*, 2005).

Os órgãos que constituem o sistema respiratório são: fossas nasais, faringe (nasofaringe), laringe, traquéia, brônquios (e suas subdivisões) e os pulmões, propriamente ditos, divididos em bronquíolos (e suas subdivisões), e os alvéolos pulmonares reunidos em sacos alveolares (Junqueira & Carneiro, 2003). O pulmão representa a maior superfície epitelial do corpo, sendo continuamente exposto a um enorme conjunto de partículas transportadas pelo ar e organismos invasores durante a respiração (Zhang *et al.*, 2000). Esta é a principal forma pela qual o bacilo da tuberculose pode alcançar o epitélio alveolar e os macrófagos presentes ali, que, apesar de não possuírem características epiteliais, mantém estreita relação com as células constituintes do trato respiratório (Junqueira & Carneiro, 2003). Acredita-se que o *M. leprae* e a maioria das micobactérias atípicas também se utilizem dessa via para poder penetrar no hospedeiro (Zhang *et al.*, 2000). No caso de *M. tuberculosis*, quando aerossóis alcançam o alvéolo os bacilos são engolfados pelos macrófagos, os quais irão transportá-los para a corrente sangüínea, atravessando o epitélio, para assim causar infecções sistêmicas (Pessolani *et al.*, 2003).

Estudos *in vivo* em modelo de camundongo mostram que os bacilos são capturados pelas células M do trato respiratório e transportados através do epitélio (Teitelbaum *et al.*, 1999). Pode-se sugerir, portanto, que o *M. tuberculosis* utilize a célula epitelial como principal via de disseminação extrapulmonar.

Pouco se sabe sobre a relação do *M. tuberculosis* com as células epiteliais brônquicas, que provavelmente também entram em contato com o bacilo. Outras micobactérias, tais como o *M. avium*, tem como evento chave em sua patogenia a sua interação com as células brônquicas o que irá ocasionar inflamação granulomatosa evoluindo para uma bronquiectasia, o que raramente ocorre na tuberculose (Middleton *et al.*, 2003).

Experimentos demonstraram que o *M. tuberculosis* é capaz de cruzar uma monocamada intacta de pneumócitos da linhagem A549, enquanto que o *M. bovis* BCG não possui tal habilidade (Bermudez *et al.*, 2002). Este cruzamento através das células epiteliais ocorreu sem perda da integridade de membrana. Neste sentido, pode-se sugerir que a preferência do *M. tuberculosis* pelo pneumócito e do *M. avium* pelas células brônquicas provavelmente ditam os aspectos clínicos das doenças (Middleton *et al.*, 2003).

Como foi dito anteriormente, ainda não se conhece a rota de entrada do *M. leprae* no seu hospedeiro, assim como acontece com grande parte das micobactérias atípicas, mas pesquisas indicam que a via mais provável de entrada seja a mucosa respiratória, tornando a interação destas micobactérias com o epitélio respiratório uma etapa inicial importante da patogênese (Job *et al.*, 2008; Britton & Lockwood, 2004). Além disso, diversos estudos demonstram a presença de grande quantidade de micobactérias não-tuberculosas em isolados de pulmão de pacientes acometidos por alguma micobacteriose atípica (Simons *et al.*, 2011; Nair, 2011; Theerawit *et al.*, 2010; Sawahata *et al.*, 2010).

Apesar dos trabalhos realizados com *M. tuberculosis* e *M. avium* e sua relação com as células epiteliais, são raros os relatos que analisam a interação do *M. leprae* e das micobactérias atípicas com células epiteliais do trato respiratório.

Um recente estudo mostra que uma proteína do *M. leprae* chamada Mce1 A, presente também na maioria das micobactérias, é capaz de se ligar a células epiteliais alveolares, além de promover a invasão de microesferas de poliestireno recobertas com a proteína em células de pólipos nasais (Sato *et al.*, 2007). Um outro estudo, utilizando *M. smegmatis*, que é reconhecidamente não-patogênico, demonstrou que a indução de macropinocitose e invasão de células epiteliais não são características exclusivas de organismos

patogênicos. Neste estudo, o tratamento de células A549 com o *M. smegmatis* provocou a redistribuição dos filamentos de actina e o aumento da captação da fase fluida, sugerindo a macropinocitose (García-Pérez *et al.*, 2008).

4. O epitélio respiratório e sua interação com microrganismos

A defesa contra microrganismos é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e as respostas tardias da imunidade adquirida. A imunidade inata é a linha de defesa inicial contra os microrganismos, consistindo em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecções. Esses mecanismos reagem apenas contra microrganismos (e aos produtos das células lesadas) e respondem essencialmente da mesma maneira a sucessivas infecções (Abbas *et al.*, 2008).

Os principais componentes do sistema imune inato são: barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais; células fagocitárias profissionais (neutrófilos e macrófagos) e células NK (*natural killer*); proteínas do sangue, incluindo frações do sistema complemento e outros mediadores da inflamação e proteínas denominadas citocinas, que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade inata. Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos semelhantes e não conseguem distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas (Akira, 2011).

O epitélio respiratório representa o sítio primário para a introdução e deposição de microrganismos potencialmente patogênicos no corpo humano, principalmente através do ar inspirado. Dessa forma, o epitélio mantém um efetivo ambiente antimicrobiano para prevenir a colonização por patógenos (revisado por Parker & Prince, 2011) (**Figura 4**).

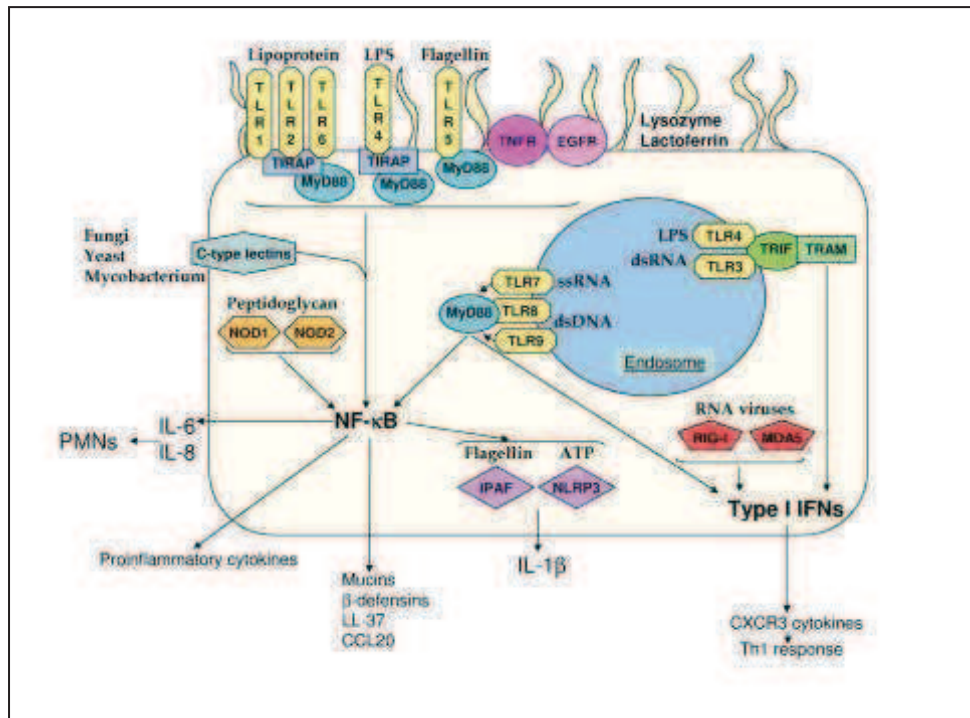


Figura 4: A imunidade inata no epitélio respiratório. Esquema representativo de uma célula epitelial das vias aéreas reconhecendo, através de receptores TLRs e NODs, ligantes como lipoproteínas, lipopolissacarídeos (LPS), flagelina, DNA e RNA, levando a ativação da resposta imune inata e consequente produção de proteínas antimicrobianas (mucinas, β -defensinas, LL-37 e CCL20) e citocinas pró-inflamatórias que irão manter um efetivo ambiente antimicrobiano para prevenir a colonização por patógenos (Parker & Prince, 2011).

A primeira barreira para conter a infecção é através da remoção física feita pelos cílios presentes nas células epiteliais. Contudo, as células epiteliais também podem responder à presença de microrganismos através de duas vias complementares de resposta imune inata. A primeira via induz o aumento da produção de agentes antimicrobianos de amplo espectro, como por exemplo, as β -defensinas, LL-37 e as mucinas. A segunda via leva à indução de uma rede de sinais para recrutar células do sistema imune ao local da infecção (revisado por Diamond *et al.*, 2000).

Neste sentido, um estudo demonstrou que a infecção *in vitro* de células epiteliais alveolares com *M. tuberculosis* induz a secreção de IFN- γ por essas células. Esta citocina possui um papel importante na resposta imune contra as micobacterioses, pois ativa a resposta celular do tipo Th1, importante na contenção das micobactérias durante a infecção (Sharma *et al.*, 2007). Outro trabalho mostrou que pneumócitos infectados com *M. tuberculosis* secretam IL-

8 e a proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1), moléculas importantes na quimiotaxia de leucócitos para o sítio de infecção (Lin *et al.*, 1998).

Foi demonstrado, ainda, que pneumócitos da linhagem A549 são capazes de produzir óxido nítrico (NO) após uma estimulação *in vitro* com o *M. tuberculosis* ou com lisados totais da parede micobacteriana. Após a produção de NO, foi observada uma redução no número de micobactérias associadas a estas células, demonstrando uma correlação na produção de NO com a resposta imune inata no local da infecção (Roy *et al.*, 2004). Além disso, células alveolares, tanto primárias quanto da linhagem A549, foram capazes de produzir RANTES após uma estimulação com meio condicionado por monócitos humanos infectados com *M. tuberculosis*. RANTES possui um papel crucial na imunidade inata por recrutar linfócitos T e monócitos (Wickremasinghe *et al.*, 2004).

O epitélio respiratório se utiliza dos receptores do sistema imune inato, que interagem com estruturas microbianas conservadas, para o reconhecimento de agentes infecciosos. Dentre esses, destacamos os receptores do tipo Toll-like (TLRs) (Medzhitov & Janeway, 1997). Até o momento, foram identificados onze TLRs em mamíferos, dos quais TLR-1 a 6, assim como o TLR-9 já foram demonstrados em células epiteliais respiratórias (Greene *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 2007; Droemann *et al.*, 2005; Melkamu *et al.*, 2008; Gribar *et al.*, 2008).

O papel do TLR-9 na imunidade inata de células epiteliais respiratórias ainda não foi totalmente esclarecido, porém sabe-se que este receptor, que é expresso somente no endossomo, reconhece DNA de bactérias e vírus, bem como seus fragmentos sintéticos chamados CpG-ODN (revisto por Kumagai *et al.*, 2007). Na maioria das células constituintes do sistema imune, sabe-se que após a internalização do CpG, o TLR-9 o reconhece e este reconhecimento leva a ativação de complexas vias de sinalização intracelular que irão ativar a resposta imune local (revisto por Vilaysane & Muruve, 2009) (**Figura 5**).

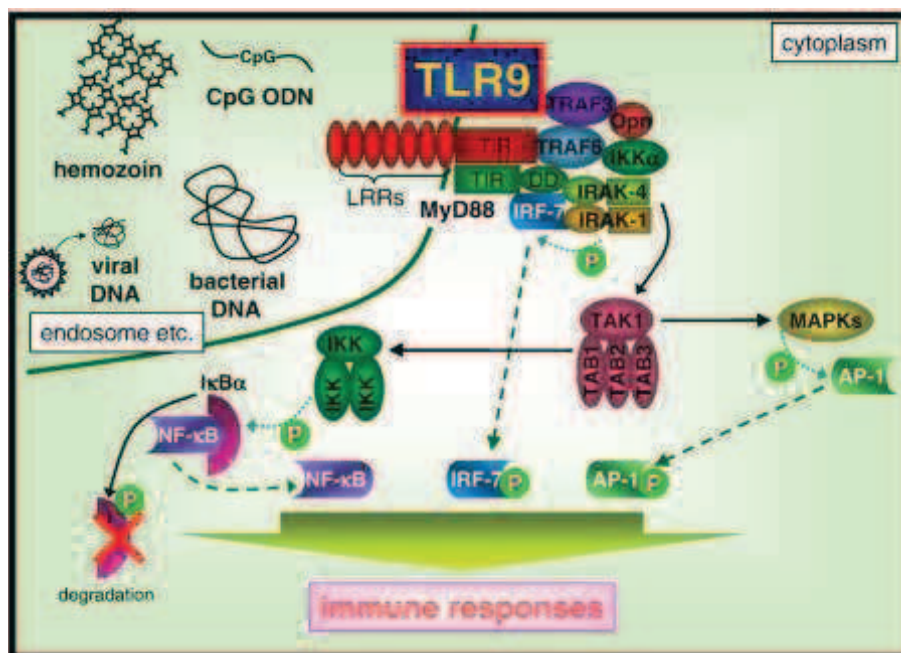


Figura 5: Via de sinalização mediada por TLR-9. Visão geral do TLR-9 presente no endossomo celular reconhecendo seus ligantes (DNA viral e bacteriano e oligonucleotídeo CpG), desencadeando complexas vias de sinalização intracelular e, conseqüentemente, ativando a resposta imune inata (Kumagai *et al.*, 2008).

Um estudo mostrou que ligantes de TLR-9 são capazes de aumentar a proliferação de células T CD4⁺ e modular a atividade de células T supressoras (Chiffolleau *et al.*, 2007). No caso de células epiteliais da linhagem A549, sabe-se que o CpG induz a produção de MCP-1 por estas células, além de ter a expressão aumentada após esta estimulação (Droemann *et al.*, 2005). Um outro estudo demonstrou uma regulação positiva de CD40, CD80, CD86 e MHC-II nas células A549 tratadas com o CpG, além da produção de citocinas Th1. Além disso, ocorreu a diminuição na expressão de TLR-4 e aumento da expressão de TLR-9 (Li *et al.*, 2011).

Além dos TLRs existem outros receptores de reconhecimento de padrões moleculares de microrganismos importantes, como a Dectina-1 e os receptores pertencentes à família NOD. Dados recentes sugerem que a sinalização simultânea da via de Dectina-1 e do complexo TLR-2/TLR-6 confere um efeito sinérgico amplificando as respostas disparadas por cada receptor individualmente (Gantner *et al.*, 2003; Dennehy & Brown, 2007).

Estudos recentes mostraram que a expressão de Dectina-1, inicialmente descrita como receptor relevante no reconhecimento de fungos

(Dennehy & Brown, 2007), está envolvida na internalização de *M. tuberculosis* em células epiteliais, assim como a produção de citocinas inflamatórias e a ativação de mecanismos microbicidas, inibindo a sobrevivência intracelular do patógeno (Lee *et al.*, 2009).

No que diz respeito aos receptores da família NOD, foi mostrado que o NOD2 é um receptor intracelular que reconhece peptidoglicanas bacterianas (Girardin *et al.*, 2003). Já foi demonstrado que camundongos deficientes em NOD2 apresentaram uma produção inadequada de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico após um desafio intranasal com o *M. tuberculosis* (Ferwerda *et al.*, 2005; Ferwerda *et al.*, 2007).

Todos estes dados reforçam a idéia de que o epitélio respiratório é capaz de modular uma resposta imune local. Esta modulação é regida principalmente por moléculas secretadas pelo epitélio, após entrarem em contato com o patógeno. Estas moléculas são capazes de recrutar e ativar células profissionais do sistema imune, como as células dendríticas, que irão promover a diferenciação de linfócitos Th1, Th2 e Th17, passando a orquestrar defesas contra a infecção (revisito por Mayer & Dalpke, 2007) (**Figura 6**).

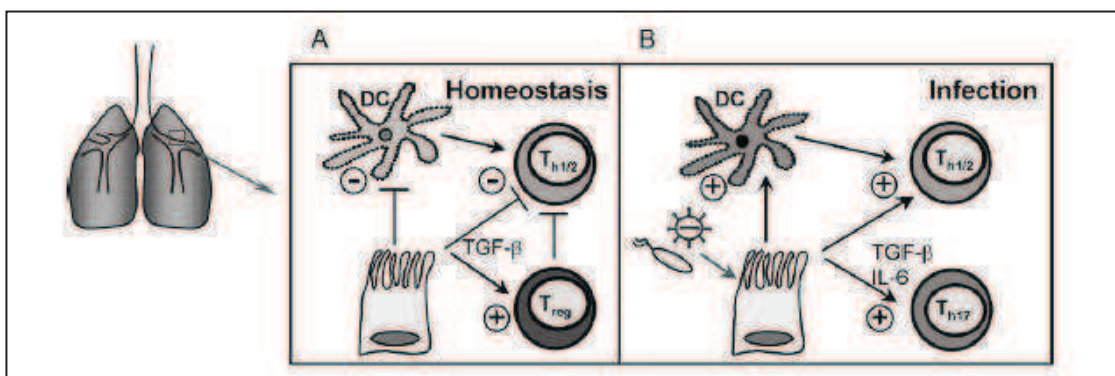


Figura 6: Modulação da resposta imune por células epiteliais respiratórias. Participação do epitélio respiratório na regulação da resposta imune antes (A) e durante (B) uma infecção (Mayer & Dalpke, 2007).

Devido à participação ativa do epitélio respiratório na resposta imune contra patógenos, a via intranasal de vacinação vem sendo estudada como uma nova estratégia para controlar infecções micobacterianas, (revisito por Oliveira *et al.*, 2007). De fato, trabalhos têm mostrado que a inoculação de vacinas, construídas a partir de produtos micobacterianos, em mucosas respiratórias, tem sido eficiente na prevenção de infecções por *M. tuberculosis*

e BCG. Um estudo demonstrou que imunização intranasal com adenovírus, expressando antígeno 85 micobacteriano foi capaz de inibir o crescimento de *M. tuberculosis* em camundongos (Ronan *et al.*, 2009). Outro trabalho mostrou que a proteína HBHA, reconhecida como fator de virulência micobacteriano, ao ser administrada pela via intranasal, foi capaz de suprimir a disseminação extrapulmonar de BCG em camundongos infectados (Kohama *et al.*, 2008).

5. A proteína Hlp e sua importância na patogênese das micobactérias

Nos últimos anos, tem se dado bastante ênfase às bases moleculares da patogênese microbiana. Esta área de pesquisa vem ganhando cada vez mais espaço no campo da biologia, uma vez que áreas como microbiologia, biologia celular, bioquímica e imunologia estão cada vez mais próximas, com o objetivo de entender como os patógenos são capazes de colonizar, invadir e, subsequentemente, manipular os mecanismos intracelulares do hospedeiro (Ramaut & Waksman, 2004).

É sabido que a aderência do patógeno às superfícies cutâneo-mucosas é o primeiro passo para a colonização do hospedeiro. Sendo assim, os patógenos microbianos possuem uma enorme variedade de estruturas presentes na superfície celular, incluindo as fímbrias e as adesinas não fimbriais (Pizzaro-Cerdá & Cossart, 2006), que permitem a adesão bacteriana às células hospedeiras.

No contexto das micobactérias, duas adesinas têm sido intensamente estudadas: a proteína semelhante à histona (Hlp) e a hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) (Menozzi *et al.*, 1996; Shimoji *et al.*, 1999).

A Hlp foi caracterizada primeiramente em *M. leprae* pelo grupo de Shimoji e colaboradores (1999). Neste estudo, foi descrita a identificação e a caracterização molecular da Hlp como uma proteína de superfície, de 21 kDa, capaz de se ligar à laminina-2 presente nos nervos periféricos. Estes achados foram reforçados quando experimentos demonstraram que a Hlp recombinante de *M. leprae* é capaz de se ligar à cadeia α -2 da laminina além de aumentar a aderência da bactéria a uma linhagem de célula de Schwann ST 88-14 após adição exógena desta proteína (Marques *et al.*, 2000). Foi mostrado também que microesferas recobertas com Hlp são internalizadas por células de

Schwann primárias (Shimoji *et al.*, 1999). Além disso, a Hlp atua como uma adesina provocando a infecção pelo *M. bovis* BCG e *M. tuberculosis* em células epiteliais alveolares da linhagem A549 através de sua ligação ao ácido hialurônico. A utilização de anticorpo para Hlp foi capaz de bloquear a adesão do *M. tuberculosis* e do BCG às células A549. Este estudo sugere, então, um importante papel da Hlp na interação das micobactérias com o epitélio pulmonar (Aoki *et al.* 2004).

Neste mesmo estudo foi analisada, através de Western-blotting, a presença da Hlp nas diferentes subfrações celulares de BCG e verificou-se que a Hlp está presente na fração da parede celular e no citoplasma, mais especificamente ligado aos ribossomos. Neste trabalho foi mostrado que a Hlp de BCG é capaz de se ligar às células epiteliais alveolares A549 e esta ligação é inibida quando as células são tratadas com heparinase, hialuronidase ou então com condroitinase. Contudo, esta inibição é mais acentuada quando as células são tratadas com hialuronidase (Aoki *et al.*, 2004).

Em um trabalho feito através de ensaios de interação em fase sólida, utilizando Hlp de *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, foi demonstrado que a proteína é capaz de se ligar à heparina, à laminina-2 e ao colágeno I, além de aumentar a adesão de microesferas a células epiteliais brônquicas da linhagem 16HBE, confirmando a interação direta e específica entre a Hlp e a matriz extracelular (Lefrançois *et al.*, 2011).

Além de desempenhar papel de adesina, a Hlp também é conhecida como proteína-1 ligante de DNA (MDP-1), e corresponde a 7% do total de proteínas presente no *M. bovis* BCG (Matsumoto *et al.*, 1999). A Hlp se liga a resíduos de citosina e guanina e é capaz de inibir a transcrição, regulando a expressão gênica e subsequente biossíntese de macromoléculas *in vitro*, e suprimindo substancialmente o crescimento bacteriano (Matsumoto *et al.*, 2000; Furugen *et al.*, 2001). Estes dados sugerem que a Hlp é importante para o metabolismo celular das micobactérias, mas ainda não se sabe que tipos de vias metabólicas são regulados por esta proteína.

O alinhamento das seqüências de aminoácidos da Hlp de diferentes espécies de micobactérias indicou que esta proteína é altamente conservada (Lefrançois *et al.*, 2011) (**Figura 7**). Em trabalhos realizados em nosso laboratório, utilizando peptídeos sintéticos derivados das regiões N e C-

terminais da Hlp de *M. leprae*, foi mostrado que a proteína interage com proteoglicanas da superfície celular, principalmente através de dois sítios distintos, ricos em alanina e lisina, pertencentes tanto à porção N quanto à porção C-terminal (Portugal *et al.*, 2008). A região pertencente à porção N-terminal, chamada de região I, coincide com o sítio de ligação ao DNA previamente caracterizado (Matsumoto *et al.*, 2009) (Figura 8).



Figura 7: Alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hlp de diferentes micobactérias. *, resíduos idênticos; :, substituições conservadas; ., substituições semi-conservadas. Mtb, *M. tuberculosis*; Mb, *M. bovis*; BCG, *M. bovis* BCG; Ml, *M. leprae*; Map, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*; Maa, *M. avium* subsp. *avium*; Mah, *M. avium* subsp. *hominissuis*; Ms, *M. smegmatis*; C, consenso (Lefrançois *et al.*, 2011).

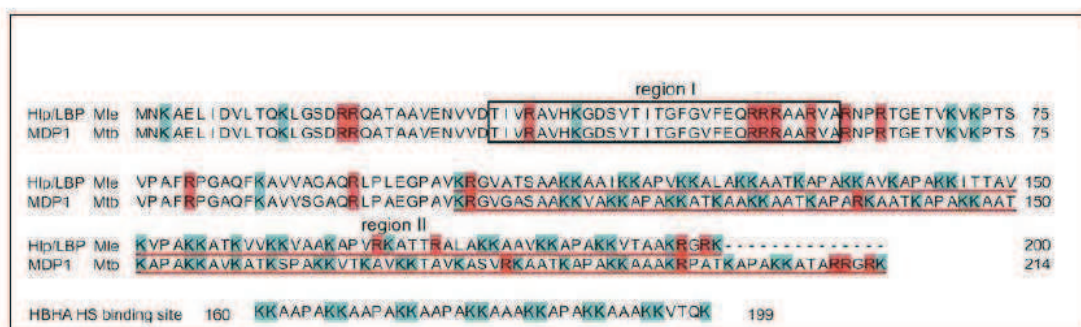


Figura 8: Seqüência de aminoácidos da Hlp de *M. leprae* e *M. tuberculosis* e identificação dos sítios de ligação ao DNA (região I) e à matriz extracelular (regiões I e II) (Portugal *et al.*, 2008)

A Hlp também possui propriedades antigênicas, sendo reconhecida pelo sistema imune durante a infecção por micobactérias (Prabhakar *et al.*, 1998). Neste caso, como participa de uma fase muito precoce da infecção, a Hlp pode ser considerada uma proteína alvo para o desenvolvimento de vacinas mais

eficazes contra as micobacterioses. Neste sentido, um estudo recente mostrou que a imunização simultânea utilizando Hlp e oligonucleotídeo CpG promoveu proteção contra a infecção com *M. tuberculosis* em camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c (Matsumoto, *et al.*, 2005). O complexo Hlp-CpG, gerado devido à capacidade da Hlp de se ligar ao DNA, foi capaz de ser reconhecido pelo receptor TLR-9, ativando a resposta imune inata e aumentando a resposta imune celular e humoral específica contra a Hlp. Dentro deste contexto, a Hlp poderia ter grande potencial de agir, quando combinada ao DNA, tanto como um bom imunógeno, assim como adjuvante, em intervenções imunes contra as micobacterioses, como a vacinação intranasal.

1. Geral

Investigar a capacidade da proteína Hlp micobacteriana e peptídeos derivados de sua seqüência de induzir, quando combinados ou não a DNA bacteriano, a secreção de mediadores inflamatórios envolvidos na imunidade inata em células epiteliais alveolares e macrófagos.

2. Específicos

2.1. Dosar as citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α , as quimiocinas RANTES e MCP-1 e o óxido nítrico secretados por células epiteliais alveolares e macrófagos (TNF- α) após estimulação com a Hlp ou seus peptídeos ligados ou não ao oligonucleotídeo CpG;

2.2. Comparar o grau de associação de *Mycobacterium smegmatis* selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* (Δhlp) às células epiteliais alveolares e macrófagos;

2.3. Dosar as citocinas IL-6, IL-8 e TNF- α , as quimiocinas RANTES e MCP-1 e o óxido nítrico secretados por células epiteliais alveolares e macrófagos (TNF- α) após estimulação com *M. smegmatis* wt e Δhlp pré-tratados ou não com o oligonucleotídeo CpG ou DNA genômico micobacteriano.

1. Meios de cultivo de células eucarióticas

Para o cultivo das células epiteliais alveolares, foi utilizado meio D-MEM/high-glucose (LGC Biotecnologia); já para o cultivo dos macrófagos e das células mononucleares de sangue periférico (CMS) foi utilizado meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia). No momento da sua utilização adicionou-se 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB; Invitrogen), assim como a combinação de antibióticos penicilina/estreptomicina a 100U/mL (PEES; Sigma).

2. Meio de cultivo de micobactérias

O meio líquido 7H9 foi preparado dissolvendo 4,7 g da base Middlebrook 7H9 (Difco) 0,05% de Tween 80 (Difco) e 0,2% de glicerol (LGC Biotecnologia) num volume final de 1L de água deionizada. Após esterilização a 121°C por 15 minutos, adicionou-se ao meio frio 10% (v/v) de Middlebrook ADC (cloreto de sódio 8,5g/L; albumina séria bovina 50g/L, dextrose 20g/L e catalase 0,03g/L; BD) no momento da sua utilização. Adicionar ou não 20µg/mL do antibiótico kanamicina (LGC Biotecnologia).

3. Linhagens celulares

As células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549 e os macrófagos derivados de camundongos da linhagem RAW 264.7 foram adquiridos do banco de células ATCC (American Type Cultures Collection, E.U.A.). Para o início do cultivo, as células estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho-maria a 37°C, e ressuspensas em um volume de 10mL de meio RPMI 1640 (para os macrófagos) ou D-MEM/high-glucose (para as células epiteliais) completos (suplementados com 100U/mL de PEES e 10% de SFB). As células foram incubadas em garrafas de cultura de 25cm² (NUNC A/S) em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C até obter uma confluência de 80%. As células epiteliais foram descoladas adicionando-se 1mL de solução salina contendo 8,5g/L de NaCl e 25g/L de tripsina 1x

(Sigma) e mantendo-se por 2 minutos a 37°C. Já os macrófagos foram descolados com auxílio de um *scraper*. Em seguida, 5mL de meio de cultura completo foram adicionados e a suspensão centrifugada por 10 minutos a 514 x g a 4°C. As células foram ressuspensas em meio de cultura, contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em nova garrafa para a manutenção da cultura, ou então plaqueadas para serem utilizadas nos experimentos.

4. Separação e obtenção de células mononucleares de sangue periférico (CMS) humano

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos heparinizados e então processadas para obtenção das CMS. A cada experimento, o sangue coletado foi diluído numa proporção 1:1 em solução salina tamponada (PBS) e centrifugado a 913 x g sobre gradiente de densidade Ficol-Paque (LGC Biotecnologia) por 30 minutos, a temperatura ambiente. O anel contendo as CMS, que se encontra na interface Ficol-Paque/plasma, foi coletado, lavado com PBS e centrifugado a 329 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de PBS gelado, havendo, então, uma nova centrifugação a 514 x g por 10 minutos a 4°C. Esse processo foi repetido e o *pellet* foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI contendo 10% de SFB. A quantificação de células viáveis foi feita pelo método de exclusão por meio de coloração pelo azul Tripán (corante vital). O processamento do sangue dos indivíduos incluídos neste estudo foi realizado em câmara de fluxo laminar respeitando as normas de precauções para manipulação de material biológico. Os testes e procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos na Fundação Oswaldo Cruz (parecer 366/07 de 12/02/2007).

5. Cepas micobacterianas

Foram utilizadas as cepas selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* (Δhlp) do *M. smegmatis* mc² 155 doadas pelo Doutor Thomas Dick da Universidade de Singapura. Para o início do cultivo, um inóculo de 1% de cada amostra foi adicionado ao meio Middlebrook 7H9 completo e mantido a 37°C

sob constante agitação por 3 dias. A cepa mutante foi cultivada na presença de 20µg/mL de kanamicina.

6. Quantificação de micobactérias

Os bacilos foram quantificados pelo método de Shepard & McRae, 1968. Para tal, 10µL de suspensão bacteriana foram utilizadas para preparação de esfregaços em lâminas de vidro com anel gravado (Fisherbrand), nas diluições de 10 e 100 vezes ou sem diluição. Após esta etapa, o material foi fixado por calor e corado pelo método de Kynion. Seguindo este método de coloração, as lâminas foram coradas com fucsina básica por 5 minutos e lavadas com água corrente. As lâminas foram, então, tratadas com solução álcool-ácida e, em seguida, lavadas com água novamente para a retirada de excesso do corante. Finalmente, os esfregaços foram corados com azul de metileno por 3 minutos e lavados com água. A contagem do número de bacilos foi realizada em microscópio óptico com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de 1000x. A suspensão de bacilos foi, então, alíquotada e estocada a -70°C em 25% de glicerol estéril até o momento da utilização em experimentos ou para novo cultivo.

7. Obtenção do lisado total de *M. smegmatis* wt e Δhlp

Alíquotas de 400µL da suspensão dos bacilos foram centrifugadas a 16000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspenso em tampão de amostra (3% de Tris/HCl 0,5M; 10% de glicerol; 0,5% de SDS; 1,25% de β -mercaptoetanol e 0,6% de solução de bromofenol), sonificado por 1 minuto e aquecido a 100°C por 5 minutos. Após repetir o último procedimento duas vezes, a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 5 minutos e o sobrenadante estocado a -20°C até o seu uso.

8. Proteína Hlp recombinante de BCG

A proteína Hlp recombinante (rHlp) de *M. bovis* BCG foi previamente obtida em nosso laboratório após sua expressão em *E. coli* BL21 utilizando o

plasmídeo pDEST17-Hlp, doado pelo Dr. Franck Biet do Instituto de Infectologia Animal/INRA de Nouzilly (França). Resumidamente, amostras de *E. coli* transformadas com o plasmídeo foram cultivadas a 37°C por 18 horas em meio LB contendo 100µg/mL de ampicilina. Após atingir fase log de crescimento, foi adicionada arabinose a 0,2% a uma alíquota do cultivo, induzindo a expressão recombinante da rHlp por 3 horas a 37°C. Ao final da indução, o cultivo foi avaliado por SDS-PAGE 15% (Laemmli *et al.*, 1970), juntamente com uma amostra do cultivo coletada antes da indução. O clone exibindo maior capacidade de expressão recombinante foi selecionado para produção em maior escala da rHlp e, novamente, cultivado em meio LB. Ao final, o volume total da cultura foi centrifugado por 20 minutos a 1306 x g e o peso úmido das células aferido. O precipitado celular de *E. coli* contendo rHlp foi ressuspensão em Tampão de lise (10mM Tris-HCl pH 8,0; Triton X-100 0,1%; 0,5mM PMSF; 0,5mg DNase; 50mg Lisozima). O lisado celular foi centrifugado a 8162 x g por 5 minutos e o sobrenadante aplicado na coluna PD-10 (GE Healthcare) equilibrada com a resina Ni-NTA (QIAGEN). O material foi mantido a 4°C por 18 horas com homogeneização constante. Após este período, o eluato foi coletado e guardado, sendo utilizada a proteína recombinante com cauda de histidina ligada ao níquel da resina Ni-NTA. Após a retenção da rHlp na resina Ni-NTA, a coluna foi lavada 2x com 4mL de TN (Tris 100mM/ NaCl 300mM)/uréia 8M, com homogeneização por 5 minutos em cada lavagem. A seguir, foram realizadas 14 etapas de eluição, sendo cada eluato coletado. As frações foram analisadas por SDS-PAGE 15% para seleção das proteínas eluídas sem contaminante. Um *pool* das frações selecionadas foi aplicado em tubo de membrana de celulose Spectra/Por® (Spectrum Laboratories Inc.) com *cut-off* de 6-8kDa nos poros para diálise, armazenando a rHlp eluída. Ao final da diálise, a rHlp foi coletada com seringa e o material quantificado pelo método de Bradford, empregando o kit Comassie Protein Assay Kit (Thermo Scientific).

9. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE)

Nesta etapa, aproximadamente 5µg da proteína rHlp de BCG purificada ou da amostra contendo proteínas do lisado total, foram aplicados em géis com 15% de poliacrilamida e 0,1% de SDS. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida (Tris 0,25M/Glicina 19,2M; 0,1% de SDS), utilizando-se cuba Might Small Transphor (Amersham Biosciences) sob amperagem de 25mA por 2 horas, ou até o indicador da frente da corrida (azul de bromofenol) chegar ao final do gel. O padrão de massa molecular (GE Healthcare) utilizado é composto pelas seguintes proteínas: fosforilase b (97kDa); albumina (66kDa); ovalbumina (45kDa); anidrase carbônica (30kDa); inibidor de tripsina (20,1kDa) e α-lactalbumina (14,4kDa).

10. Immunoblotting

As proteínas submetidas a um dos géis de eletroforese foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra – GE Healthcare) em mini cuba de transferência (Amersham Biosciences) contendo tampão de transferência (Tris 0,25M/Glicina 19,2M) sob amperagem de 400mA durante 1 hora a 4°C. Logo após, a membrana foi corada com solução de 0,1% de *amido black* para a confirmação da eficiência da transferência e identificação do padrão de massa molecular. Em seguida a membrana foi lavada com TBS (Tris/HCl 1M; NaCl 5M) contendo 0,1% de Tween 20 (TBS-T) e bloqueada por 2 horas com solução de TBS-T contendo 3% de BSA (TBS-T/BSA 3%). Após esta etapa, a membrana foi incubada por 1 hora com anticorpo monoclonal anti-Hlp (5G9) (Marques *et al.*, 2000) diluído 1:1000 em TBS-T/BSA 3%. Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com TBS-T por 5 minutos e incubada por 1 hora com IgG anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina (Sigma) diluído 1:5000 em TBS-T/BSA 3%. A membrana foi lavada 3 vezes por 15 minutos com TBS-T, revelada com o substrato colorimétrico NBT/BCIP (Invitrogen) e lavada mais 2 vezes com água deionizada.

11. Coloração do gel pela prata

Após eletroforese, as proteínas presentes no gel de poliacrilamida foram coradas, utilizando-se o método de coloração pela prata (Bio-Rad). Seguindo

as recomendações do fabricante, o gel foi incubado durante 30 minutos com solução fixadora (40% metanol/10% ácido acético) e 5 minutos com o reagente oxidante. Em seguida, foi feita a lavagem com água deionizada por 15 minutos, trocando a água a cada 3 minutos. Após esta etapa, o gel foi incubado com o reagente de prata por 20 minutos, enxaguado com água deionizada por 30 segundos e incubado com solução reveladora até que a banda do gel ficasse visível. Por fim, a revelação foi interrompida com 5% de ácido acético. O reagente oxidante, o reagente de prata e a solução reveladora foram fornecidos pelo fabricante. Para secar o gel, foi utilizada solução contendo 50% de metanol e 1% de glicerol.

12. Peptídeos sintéticos

Os peptídeos p2, p3 e p10 foram doados pelo Dr. Tom Ottenhoff da Universidade Centro Médico de Leiden (Holanda) e fazem parte de um painel de peptídeos sintéticos de 30 meros cada. Os peptídeos p2 e p3 cobrem parte do domínio N-terminal da proteína Hlp de BCG, já o p10 cobre parte do domínio C-terminal. O peptídeo p3 corresponde à região I que possui sítios de ligação aos componentes de matriz extracelular e ao DNA, o p10 corresponde à Região II que possui sítios de ligação somente a componentes de matriz extracelular e o p2 não possui nenhum dos sítios mencionados (**Tabela 2**) (Portugal *et al.*, 2008). Os peptídeos foram estocados a -20°C em solução de PBS estéril.

Tabela 2: Peptídeos sintéticos contendo sequencia de aminoácidos da proteína Hlp micobacteriana utilizados neste trabalho. pI, ponto isoelétrico

Peptídeo	Sequencia de aminoácidos	pI
p2	¹⁶ SDRRQATAAVENVDTIVRAVHKGDSVTIT ⁴⁵	6,48
p3	³¹ TIVRAVHKGDSVTITGFGVFEQRRRAARVA ⁶⁹	11,83
p10	¹³⁶ KKAVKAPAKKITTAVAVPAKKATKVVKVA ¹⁶⁵	11,00

13. Extração de DNA genômico de *Mycobacterium bovis* BCG

Para a realização desta etapa, foi utilizada massa de cultura de *M. bovis* BCG cepa Moreau cedida pela Fundação Ataulpho de Paiva (RJ, Brasil). O protocolo abaixo descrito foi adaptado de Santos e colaboradores (1993). Para o início do processo de extração, microtubo de polipropileno (capacidade para 2mL; Eppendorf) contendo 3% de massa bacteriana, 25% de tampão TE 1x (10mM Tris/HCl, pH 8,0 e 1mM EDTA), 25% de fenol (saturado com Tris/HCl) e esferas de vidro de 0,1mm de diâmetro (Sigma), foi vigorosamente agitado por 3 minutos. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 16000 x g por 15 minutos e o sobrenadante (primeira fase aquosa) foi transferido para outro tubo. No tubo contendo as esferas de vidro, foi adicionado 6% do volume inicial de tampão TE 1X, agitado por 10 segundos e novamente centrifugado a 16000 x g por 15 minutos. O sobrenadante (segunda fase aquosa) foi retirado e transferido para o tubo contendo a primeira fase aquosa. Logo após, 0,1% de deoxicolato de sódio foi adicionado à fase aquosa e incubado a 56°C por 90 minutos com agitações ocasionais. Após este período, foi adicionado igual volume de fenol/clorofórmio (1:1), e o tubo agitado por 10 segundos e centrifugado a 16000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, sem retirar parte da interface da fase inferior e foi repetido o processo com fenol/clorofórmio, até que a interface não fosse mais visível. O DNA foi precipitado, acrescentando-se 1% de acetato de sódio 3M (pH 5,2) na fase aquosa, e 2x o volume de álcool etílico absoluto, centrifugadando-se a 16000 x g por 10 minutos. O material foi incubado por 16 horas a 4°C. A precipitação e a centrifugação foram repetidas como descrito anteriormente e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi ressuspensão com etanol a 70% e centrifugado a 16000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado. O *pellet* foi ressuspensão com tampão TE 1x e incubado a 55°C por 30 minutos. Após este período, o DNA foi dosado no espectrofotômetro (NanoDrop ND1000) e estocado a -20°C até o seu uso.

14. Ligação da proteína Hlp ao DNA genômico ou ao colágeno I

Para a realização deste procedimento, foram usados 10µg/mL do DNA genômico ou 1µg/mL do colágeno I (Sigma) diluídos em 50µL de tampão carbonato/bicarbonato a 0,1M (pH 9,6) para cobrir os poços de microplacas de

poliestireno (Corning) e incubadas a 4°C por 16 horas. Os poços foram então lavados com PBS e bloqueados por 2 horas com 200µL de PBS contendo 3% de albumina séria bovina (BSA; Sigma) a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma; PBS/T), 50µL de diferentes concentrações da rHlp foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 2 horas. Logo após, os poços foram novamente lavados com PBS/T e incubadas com 50µL do anticorpo monoclonal para Hlp (5G9; 1:500) (Marques *et al.*, 2000) por 1 hora a 37°C. Os poços foram novamente lavados com PBS/T e 50µL do IgG anti-mouse conjugado a peroxidase (1:1000; Sigma) foi adicionado e incubado por um tempo adicional de 50 minutos a 37°C. A atividade da peroxidase foi revelada com peróxido de hidrogênio e O-fenilenediamina (OPD; Sigma) ou tetrametilbenzidina (TMB; LGC Biotecnologia) em um volume final de 100µL. A reação colorimétrica foi interrompida com 50µL de ácido sulfúrico a 2,5N e a leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro usando o programa SOFTmax®PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 490nm (OPD) ou 450nm (TMB).

15. Marcação de *M. smegmatis* com PKH2 fluorescente

A marcação dos bacilos foi feita utilizando o kit PKH2 Green Fluorescent Cell Linker (Sigma). De acordo com a metodologia fornecida pelo fabricante, aproximadamente 2×10^7 bacilos foram centrifugados a 16000 x g por 15 minutos, ressuspensos em solução contendo o diluente A e a solução de PKH2 a 2µM (fornecidos pelo kit) na mesma proporção e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente, protegidos da luz. Em seguida foi adicionado igual volume de SFB para neutralização e incubados por 1 minuto. A suspensão de bacilo foi então diluída em igual volume de meio de cultura e centrifugada por 10 minutos a 16000 x g. O sobrenadante foi removido e as bactérias foram lavadas 3 vezes com meio de cultura para a retirada do excesso de fluorocromo. Ao final, as bactérias foram ressuspensas no volume inicial de meio de cultura e a eficiência da marcação monitorada em microscópio de fluorescência com lente de imersão (Nikon Eclipse E400) em um aumento de

1000x. Uma alíquota foi separada para contagem do número de bacilos e as demais prontamente utilizadas ou estocadas a -70°C até o momento de uso.

16. Ensaio de associação de *M. smegmatis* wt ou Δ hlp com células epiteliais alveolares e macrófagos

As células epiteliais ou os macrófagos foram plaqueados (5×10^4 células) por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C em placa de 24 poços. A seguir, o sobrenadante das células foi descartado e foram adicionadas as bactérias fluorescentes pré-marcadas com PKH2, diluídas em meio de cultura específico sem antibiótico, numa relação de 10 bacilos por célula. As células foram centrifugadas a 730 x g por 10 minutos à temperatura de 25°C e incubadas por 24 horas à temperatura de 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após esse período, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e descoladas com o auxílio de um *scraper*. O grau de associação dos bacilos às células foi analisado em citômetro de fluxo (FACS Accuri) utilizando o programa Cflow Plus. Cada experimento foi feito em duplicata.

17. Ensaio de estimulação de células epiteliais alveolares e macrófagos

As células epiteliais ou os macrófagos foram semeados (aproximadamente 3×10^4 células por poço) por 24 horas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C em placa de 24 poços. Já as CMS foram semeadas em placas de 96 poços (aproximadamente 2×10^5 células por poço) nas mesmas condições. A seguir, o sobrenadante das células foi descartado e foram adicionados diferentes estímulos, diluídos em meio de cultura específico, sem antibiótico. As células epiteliais foram incubadas por 24, 48, 72 e 96 horas, os macrófagos foram incubados por 24 e 48 horas, e as CMS foram incubados por 24 horas apenas. Por fim, os sobrenadantes das culturas foram centrifugados a 16000 x g por 5 minutos, aliquoteados e estocados a -20°C para posterior dosagem de citocinas e/ou óxido nítrico. Os estímulos usados foram: oligonucleotídeo CpG (ODN 2395; Invivogen), proteína rHlp de BCG pré-incubada ou não a 37°C por 30 minutos com o CpG, os peptídeos p2, p3 e p10

pré-incubados ou não com CpG, o DNA genômico de BCG e os *M. smegmatis* wt e Δhlp pré-incubados ou não com o CpG ou com o DNA. Para as CMSs, os estímulos foram a rHlp de BCG, os peptídeos e o DNA genômico na presença ou ausência do antibiótico polimixina B. Como controle positivo foi usado lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*, doado pela Dra. Lillian de Oliveira Moreira (UERJ), na presença ou ausência de 20 μ g/mL polimixina B (Sigma) e nos experimentos com os macrófagos também foi usado IFN- γ (R&D Systems). A concentração dos estímulos variou de acordo com o tipo celular e encontra-se especificado no capítulo dos resultados. Cada experimento foi feito em duplicata.

18. Dosagem de citocinas e quimiocinas

As citocinas e quimiocinas TNF- α , IL-6, IL-8, RANTES e MCP-1 foram quantificadas separadamente por Ensaio Imunoenzimático (ELISA) utilizando kit DuoSet® (R&D Systems) específico para cada mediador. De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, placas de 96 poços de fundo chato (NUNC) foram recobertas com 50 μ L do anticorpo de captura específico para cada citocina, diluído em PBS por 16 horas a temperatura ambiente. Em seguida, os poços foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 em PBS) e bloqueados com 1% de BSA diluído em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram novamente lavados 3 vezes e foram adicionados 50 μ L de concentrações conhecidas de citocinas recombinantes (utilizadas para a geração da curva padrão) diluídas em reagente diluente ou 50 μ L da amostra de sobrenadantes das culturas. A placa permaneceu incubada por 2 horas a temperatura ambiente, seguida de 3 lavagens. Logo após, foram adicionados 50 μ L do anticorpo de detecção específico para cada citocina, conjugado a biotina e diluído em reagente diluente, e a placa foi incubada por mais 2 horas a temperatura ambiente. Os poços foram lavados mais 3 vezes e incubados com 50 μ L de estreptoavidina conjugada a peroxidase, diluída a 1:200 em reagente diluente por 20 minutos a temperatura ambiente. Após mais 3 lavagens, a atividade da peroxidase foi revelada com peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina (TMB; LGC Biotecnologia) em um volume final de 100 μ L. A reação colorimétrica foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico a 2,5N e a leitura da densidade óptica foi determinada em

espectrofotômetro usando o programa SOFTmax®PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 450nm. Após a leitura, os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão. As concentrações de cada anticorpo, os pontos da proteína padrão e os componentes do reagente diluente variavam de acordo com a citocina quantificada. As dosagens foram feitas em duplicatas.

19. Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas de células epiteliais e macrófagos foi estimada de forma indireta pela dosagem de nitrito de sódio (NaNO_2) utilizando o método de Griess (adaptado de Green *et al.*, 1982). Baseado neste método, foram adicionados em placas de 96 poços de fundo chato (NUNC) um volume de 50 μL de NaNO_2 em concentrações que variam de 5 μM a 100 μM (para elaboração da curva padrão) ou amostras de sobrenadantes de cultura das células e 50 μL do reagente de Griess (Sigma). A placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e a leitura da densidade óptica foi determinada em espectrofotômetro usando o programa SOFTmax®PRO 4.0 (Life Sciences Edition, Molecular Devices Corporation) a 570nm. Após a leitura os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão. As dosagens foram feitas em duplicatas.

20. Análise estatística

Os resultados dos ensaios tiveram suas médias aritméticas e erros padrões das médias calculados. Diferenças estatisticamente significativas entre os valores foram determinadas com o uso do programa GraphPad Prism 5 Project (GraphPad Software Inc.), após aplicação dos testes *One-way analysis of variance* (ANOVA) e Bonferroni, tendo sido considerado significativo um valor de $p < 0,05$.

1. Ensaio iniciais de controle de qualidade e padronização

1.1. Análise do grau de pureza e integridade da rHlp de BCG

A proteína rHlp de *M. bovis* BCG, expressa em *E. coli* e obtida em nosso laboratório, foi utilizada nos ensaios de estimulação de células epiteliais alveolares e macrófagos realizados neste trabalho. Antes da sua utilização, alguns testes foram realizados no sentido de confirmar a qualidade desta preparação. Primeiramente, foi verificado o grau de pureza e integridade da rHlp de BCG. Para tal, a proteína foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS (SDS-PAGE), seguida de coloração pela prata (**figura 9A**) ou transferência para uma membrana de nitrocelulose e identificação, através de *immunoblotting* com anticorpo monoclonal para Hlp (5G9) (**figura 9B**). Estes testes confirmaram que a preparação de rHlp de BCG apresentava-se como uma banda única com peso molecular esperado de aproximadamente 21 kDa. Como mostra a **figura 9**, não foi possível observar a ocorrência de degradação da rHlp ou de proteínas contaminantes na amostra.

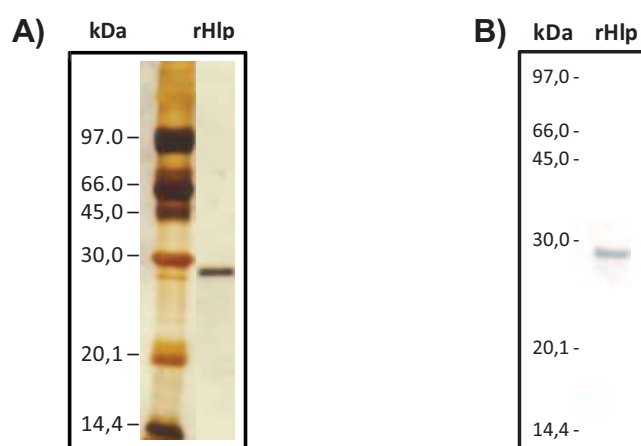


Figura 9: Análise do grau de pureza e integridade da proteína Hlp recombinante de BCG. Amostras da proteína previamente purificada foram submetidas a SDS-PAGE em gel a 15%. (A) O gel foi corado pela prata. (B) A proteína foi transferida para uma membrana de nitrocelulose e identificada com anticorpo monoclonal para Hlp (5G9) seguido de IgG anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina. A revelação do *blotting* foi realizada utilizando substrato colorimétrico. Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

1.2. Análise da contaminação por LPS na rHlp de BCG, peptídeos e DNA genômico de BCG

Como a proteína foi expressa em *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa que apresenta altos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) em seu envelope, a próxima etapa foi avaliar o grau de contaminação por LPS da rHlp. Nesta etapa do trabalho foram também analisadas as amostras do DNA genômico de BCG e dos peptídeos sintéticos derivados da seqüência da Hlp.

A Hlp, *per se*, não é capaz de induzir a secreção de mediadores inflamatórios em macrófagos (Matsumoto *et al.*, 2005), em contraste com o LPS que é reconhecidamente um forte indutor destes mediadores nestas células. O grau de contaminação de LPS foi, então, estimado através da dosagem de TNF- α no sobrenadante de cultura de células mononucleares de sangue periférico humano (CMSC) estimuladas com rHlp, com os peptídeos p2, p3 e p10 ou com o DNA de BCG. Os testes foram realizados utilizando LPS de *E. coli* como controle positivo e, em alguns testes, foi incluída a droga polimixina-B, que se liga a sítios de carga negativa do LPS, neutralizando sua ação.

A **figura 10A** mostra que após o tratamento com a rHlp, os níveis de TNF- α secretados pelas células foram semelhantes aos níveis basais secretados pelas células não tratadas, ao contrário do ocorrido quando as células foram estimuladas com LPS. Sendo assim, com estes resultados foi possível inferir que a contaminação por LPS na amostra da rHlp era indetectável no ensaio utilizado.

A **figura 10B** resume os resultados obtidos com os peptídeos e DNA genômico. Também foi possível constatar que os peptídeos e o DNA não apresentavam contaminação detectável pelo ensaio escolhido. Como esperado, a adição de polimixina-B foi capaz de inibir a secreção de TNF- α em resposta ao LPS nos poços onde o lipopolissacarídeo foi adicionado, mas não nos poços controle e naqueles estimulados com as moléculas micobacterianas.

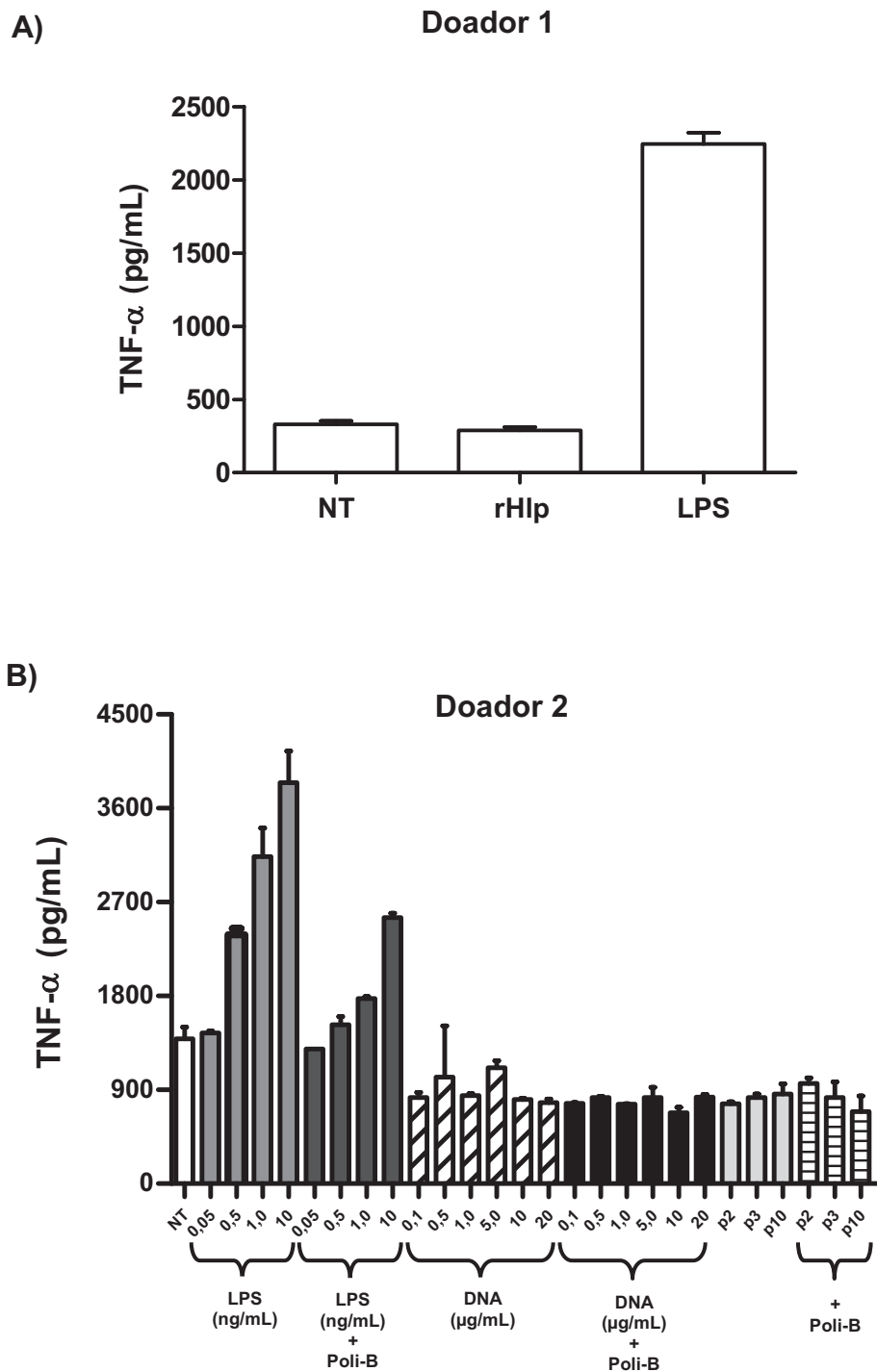


Figura 10: Secreção de TNF- α por CMS humano após tratamento com rHlp, peptídeos ou DNA genômico micobacteriano. As células foram obtidas de indivíduos saudáveis e cultivadas por 24 horas na presença de rHlp (0,5 μ M) (A), bem como de peptídeos (0,5 μ M) ou DNA genômico em diferentes concentrações, na presença ou ausência de polimixina-B (25 μ g/mL) (B). LPS de *E. coli* foi utilizado como controle positivo a 10ng/mL ou em concentrações crescentes. NT, não tratado. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Os experimentos foram feitos em duplicatas.

1.3. Ligação da rHlp de BCG à colágeno I e DNA genômico micobacteriano

A Hlp micobacteriana é uma proteína que possui a capacidade de interagir com diferentes componentes de matriz extracelular, como, por exemplo, o colágeno (Lima *et al.*, 2005; Lefrançois *et al.*, 2011), bem como com o DNA micobacteriano (Matsumoto *et al.*, 1999). Sendo assim, foi investigado se a Hlp recombinante de BCG seria capaz de se ligar ao colágeno I ou ao DNA genômico obtido a partir de massa de cultivo de BCG.

Para atingir tal objetivo, foram feitos ensaios em fase sólida em que o colágeno I foi imobilizado em uma placa de poliestireno, seguido da adição de diferentes concentrações da proteína rHlp. Como pode ser observado na **figura 11A**, a rHlp foi capaz de se ligar ao colágeno de maneira dose-dependente. Não se observou ligação da rHlp ao BSA, proteína utilizada como controle de ligação inespecífica.

A **figura 11B** mostra o resultado obtido quando DNA genômico de BCG, em vez de colágeno, foi imobilizado na microplaca de poliestireno. Foi possível confirmar que a rHlp de BCG obtida em nosso laboratório foi também capaz de se ligar ao DNA de maneira dose-dependente, com valores de densidade óptica (D.O.) pelo menos 2 vezes acima dos observados nos poços controles, onde BSA foi imobilizada .

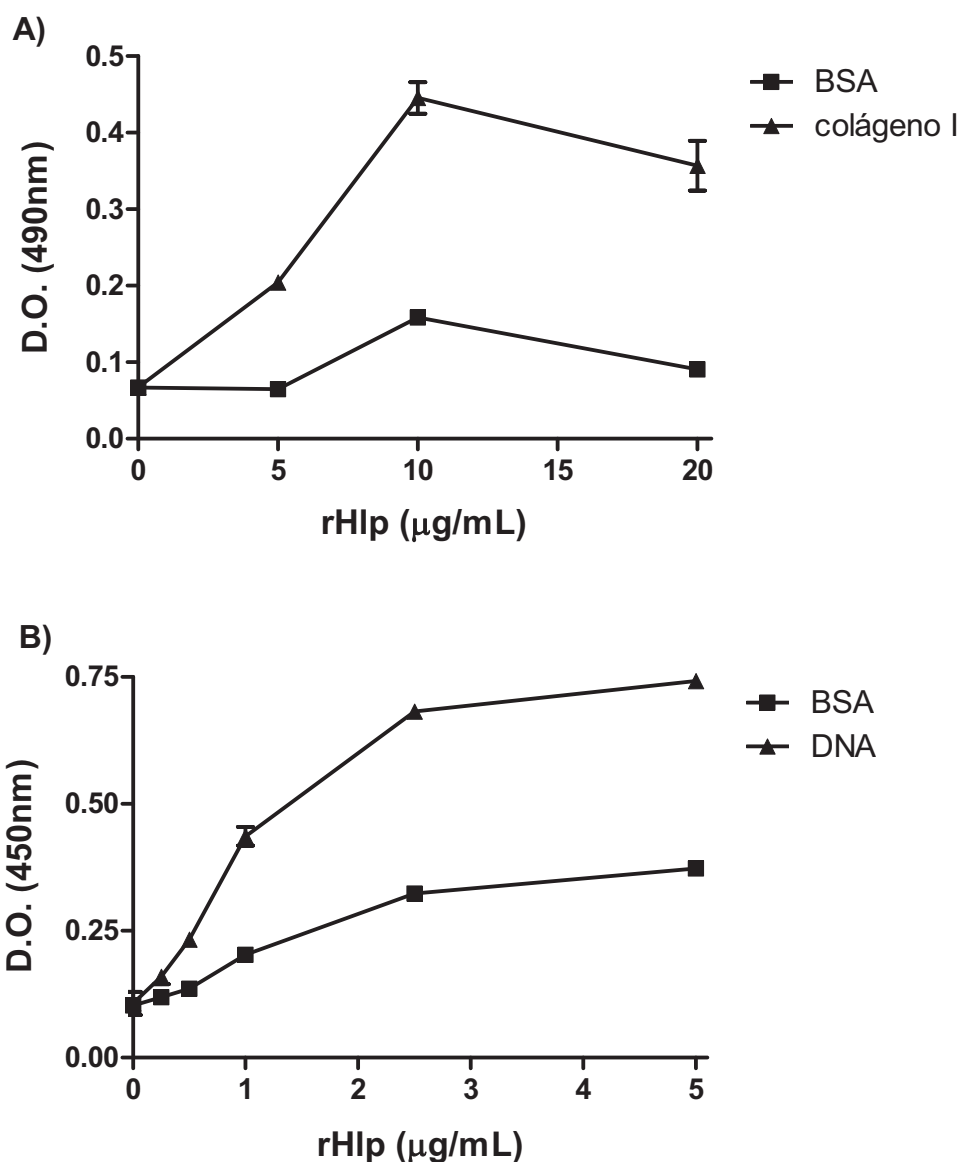


Figura 11: Ligação da proteína rHlp de BCG à colágeno I e DNA genômico micobacteriano. Colágeno I (A) ou DNA genômico de BCG (B) foram usados para cobrir os poços de microplaca de poliestireno. Os poços foram lavados com PBS e bloqueados com PBS contendo 3% de BSA. Em seguida, foram adicionados aos poços concentrações crescentes da rHlp. Os poços foram então lavados com PBS/T e incubados com anticorpo monoclonal 5G9 para Hlp (1:500). Após nova lavagem com PBS/T, foi adicionado aos poços a IgG anti-mouse conjugada a peroxidase. A atividade da peroxidase foi revelada com peróxido de hidrogênio e O-fenilenediamina (OPD) (A) ou tetrametilbenzidina (TMB) (B). O resultado foi monitorado pela análise da absorvância a 490 nm ou 450nm. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado representativo de três experimentos independentes feitos em duplicata.

1.4. Padronização da concentração ideal do oligonucleotídeo CpG necessária para estimular células epiteliais alveolares e macrófagos

Nesta etapa, foi feita a padronização da concentração ideal do oligonucleotídeo CpG (ODN 2395) necessária para induzir as células epiteliais alveolares e os macrófagos a produzirem diferentes mediadores inflamatórios. Para tal, as células foram semeadas em placas de 24 poços (aproximadamente 5×10^4 células por poço) e tratadas com concentrações crescentes do CpG diluído em meio de cultura por 24 horas. Após este período, foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) para quantificar diferentes citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes das culturas celulares. A secreção de óxido nítrico também foi quantificada de forma indireta, através da mensuração de nitrito com o reagente de Griess.

A **figura 12** representa a secreção de IL-8 e MCP-1 por células epiteliais alveolares em resposta a doses crescentes de CpG. Foi possível constatar a secreção de tais mediadores somente após o tratamento do CpG na concentração de $1\mu\text{M}$. Por outro lado, não ocorreu secreção significativa de IL-6, TNF- α , RANTES e óxido nítrico em nenhum dos momentos analisados (dado não mostrado).

TNF- α e óxido nítrico foram quantificados nos sobrenadantes de macrófagos estimulados com doses crescentes de CpG. Na **figura 13** pode-se observar que a secreção de TNF- α foi crescente com o aumento da concentração do CpG, porém o mesmo não ocorreu após a dosagem de óxido nítrico (dado não mostrado).

Após a análise dos resultados, foi escolhida a concentração de $1\mu\text{M}$ de CpG para estimular as células alveolares nos próximos experimentos, pois, somente nesta concentração, foi possível observar um incremento na secreção de IL-8 e MCP-1. No caso dos macrófagos, foi escolhida a concentração sub-ótima de $0,1\mu\text{M}$.

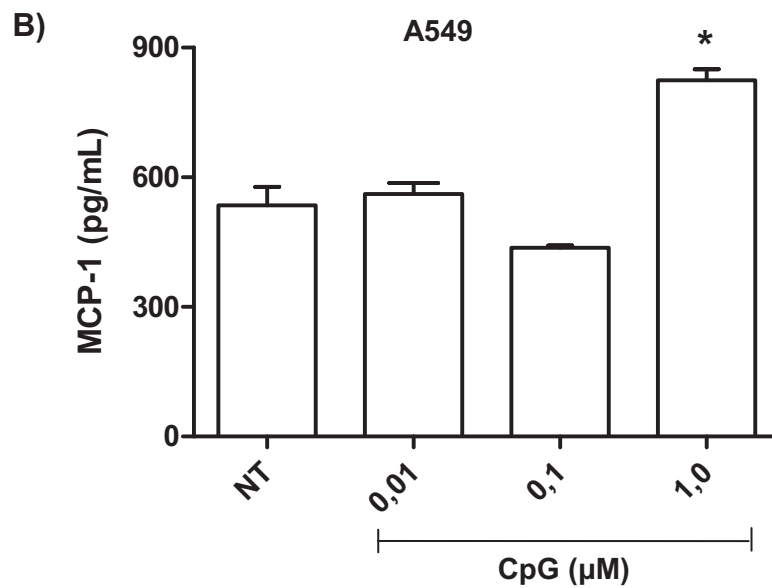
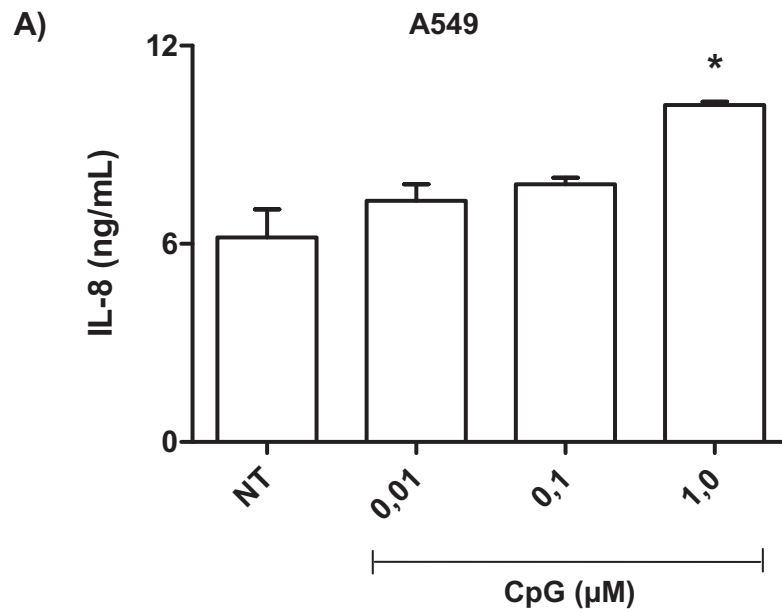


Figura 12: Secreção de IL-8 e MCP-1 por células epiteliais alveolares em resposta ao oligonucleotídeo CpG. As células alveolares foram tratadas com doses crescentes do CpG por 24 horas. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 (A) e MCP-1 (B) presentes no sobrenadante da cultura celular. NT, não tratado. Os valores representam a média \pm desvio padrão. O experimento foi feito em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado ($P < 0,05$).

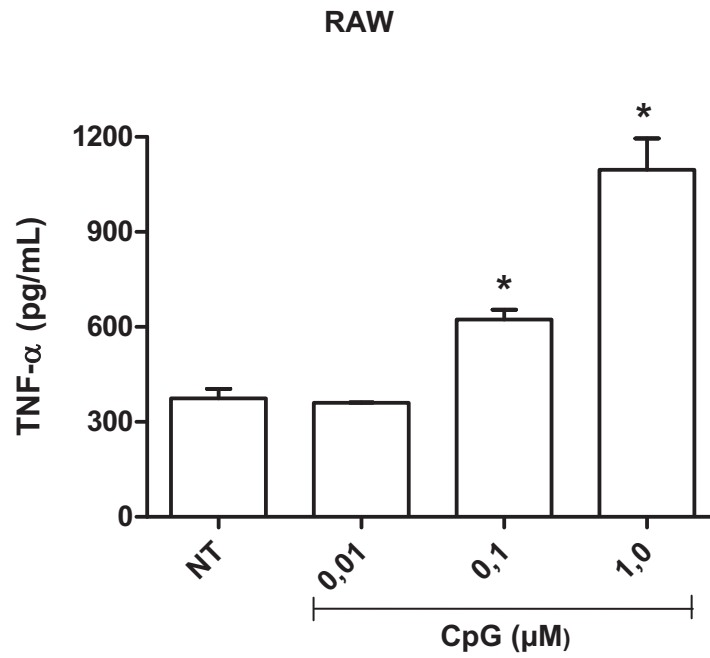


Figura 13: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao oligonucleotídeo CpG. Os macrófagos foram tratados com doses crescentes do CpG por 24 horas. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α presentes no sobrenadante da cultura celular. NT, não tratado. Os valores representam a média \pm desvio padrão. O experimento foi feito em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa em relação ao controle não tratado ($P < 0,05$).

2. Efeito da proteína rHlp ligada ao oligonucleotídeo CpG na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos

Após a padronização da concentração ideal do CpG, foi feita a análise da secreção de citocinas, quimiocinas e do óxido nítrico pelas células alveolares em resposta à rHlp de BCG ligada ou não ao CpG.

Primeiramente, utilizamos rHlp, CpG e LPS para estimular as células epiteliais alveolares em diferentes tempos. Através do resultado representado pela **figura 14A**, podemos sugerir que as células epiteliais respondem ao CpG e ao LPS produzindo IL-8 de modo tempo-dependente, porém não há resposta após estímulo com rHlp.

Após a confecção da curva-temporal, foram feitos experimentos com as células estimuladas por 96 horas utilizando agora a rHlp pré-incubada com o CpG. A **figura 14B** mostra que a rHlp pré-incubada com o CpG foi capaz de induzir um maior aumento na secreção de IL-8 em comparação ao estímulo com o CpG somente.

Não foi possível observar diferença significativa na secreção de IL-6, RANTES, TNF- α , MCP-1 e óxido nítrico pelas células alveolares após os diferentes estímulos utilizados (dado não-mostrado).

No caso dos macrófagos, foi feita a análise da secreção de TNF- α e óxido nítrico por até 48 horas de estímulo com a rHlp, pré-incubada ou não com o CpG. Através da **figura 15**, podemos observar que a secreção de TNF- α induzida pela rHlp ligada ao CpG também é tempo-dependente, porém não foi possível observar aumento significativo na secreção de óxido nítrico (dado não-mostrado). Neste experimento foi utilizado IFN- γ , além do LPS, como controle positivo.

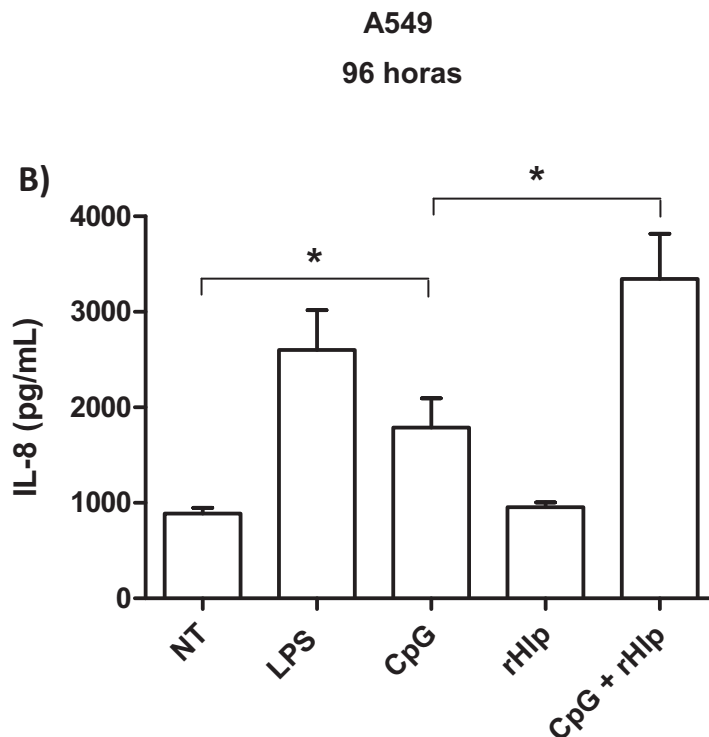
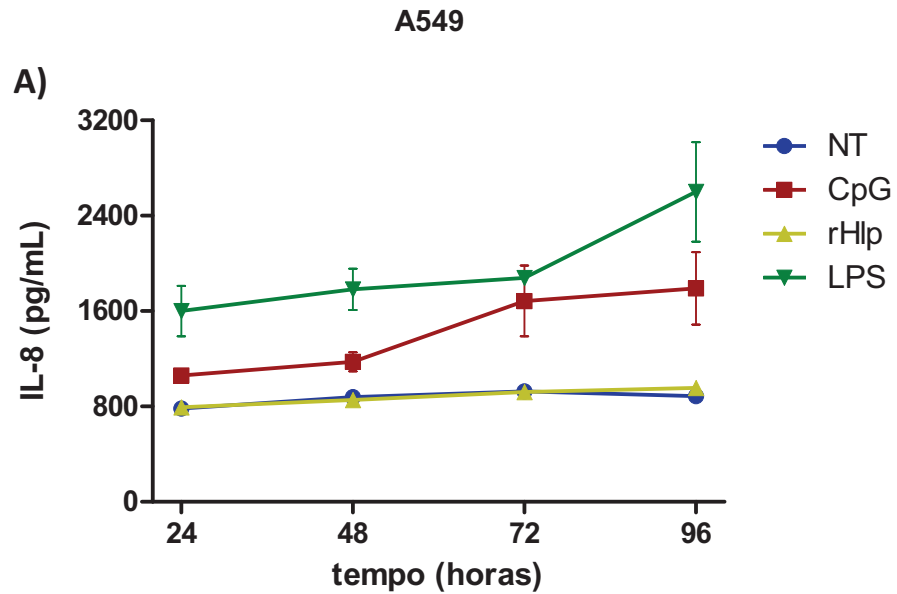


Figura 14: Secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com CpG na presença ou ausência de rHlp. As células alveolares foram tratadas com rHlp (0,5 μ M) pré-incubados ou não com CpG (1 μ M), ou então com CpG somente por tempos variáveis. O LPS (1 μ g/mL) foi usado como controle positivo. Após cada período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 presentes no sobrenadante da cultura celular. A, curva-temporal da secreção de IL-8 após diferentes estímulos. B, resultado do período de 96 horas expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. Os valores representam a média \pm desvio padrão. NT, não tratado. * Diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

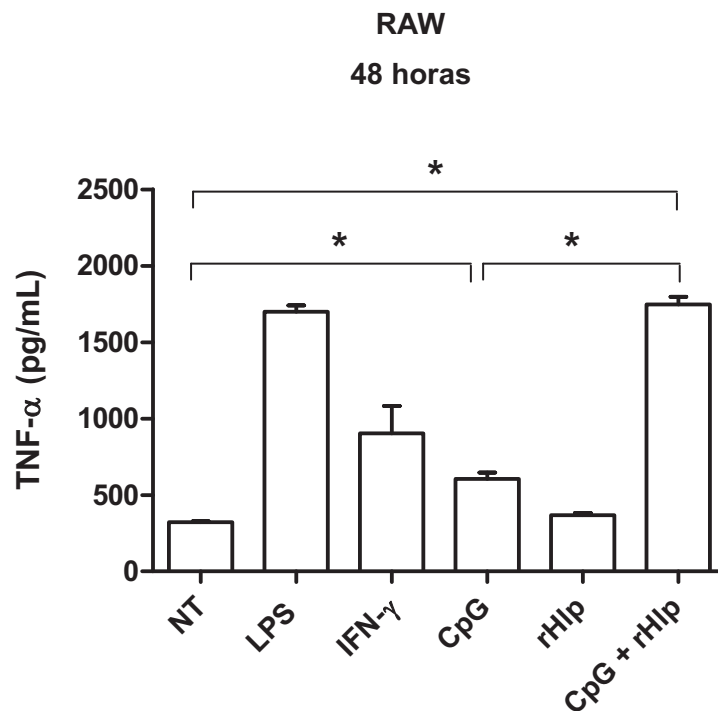
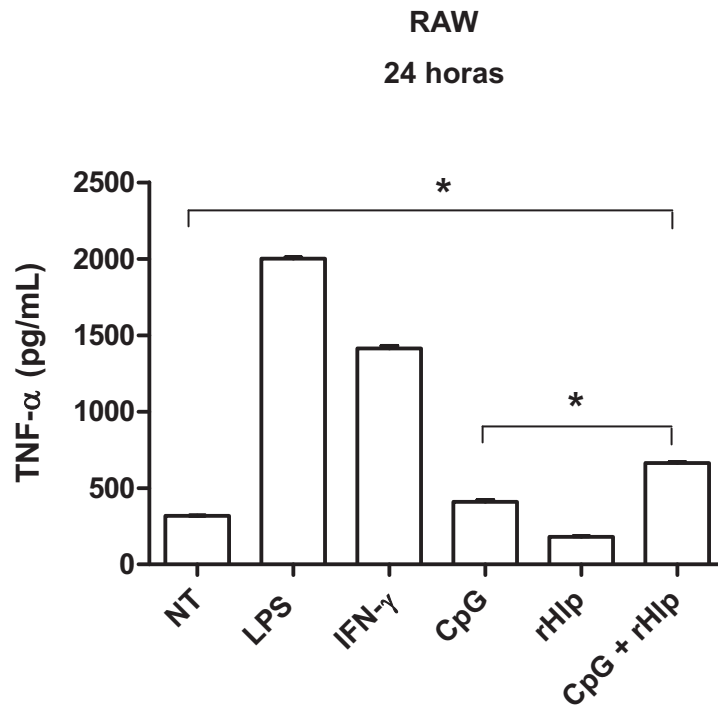


Figura 15: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao estímulo com CpG na presença ou ausência de rHlp. Os macrófagos foram tratados com rHlp (0,05 μ M) pré-incubados ou não com CpG (0,1 μ M), ou então com CpG somente por 24 e 48 horas. O LPS (100ng/mL) e o IFN- γ (10ng/mL) foram usados como controles positivos. Após cada período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

3. Efeito dos peptídeos derivados da seqüência da Hlp combinados com o oligonucleotídeo CpG na secreção de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos

A seguir foi realizada a análise da secreção de IL-8 e TNF- α pelas células alveolares e macrófagos, respectivamente, em resposta aos peptídeos sintéticos de 30 aminoácidos com sequencias derivadas de diferentes regiões da Hlp combinados ao CpG. Os três peptídeos analisados foram p2, p3 e p10, sendo que o p3 inclui sítios de ligação aos componentes de matriz extracelular e ao DNA, o p10 possui sítio de ligação somente a componentes de matriz extracelular e o p2 não possui nenhum dos sítios mencionados (Portugal *et al.*, 2008).

A **figura 16** demonstra que em 96 horas, nenhum dos peptídeos pré-incubados com o CpG foi capaz de aumentar significativamente a secreção de IL-8 nas células alveolares, ao contrário do observado quando a rHlp inteira foi utilizada. Porém, no caso dos macrófagos, foi possível notar um aumento da secreção de TNF- α após estímulo com o p3 pré-incubado com o CpG por 48 horas, como pode ser observado pela **figura 17**.

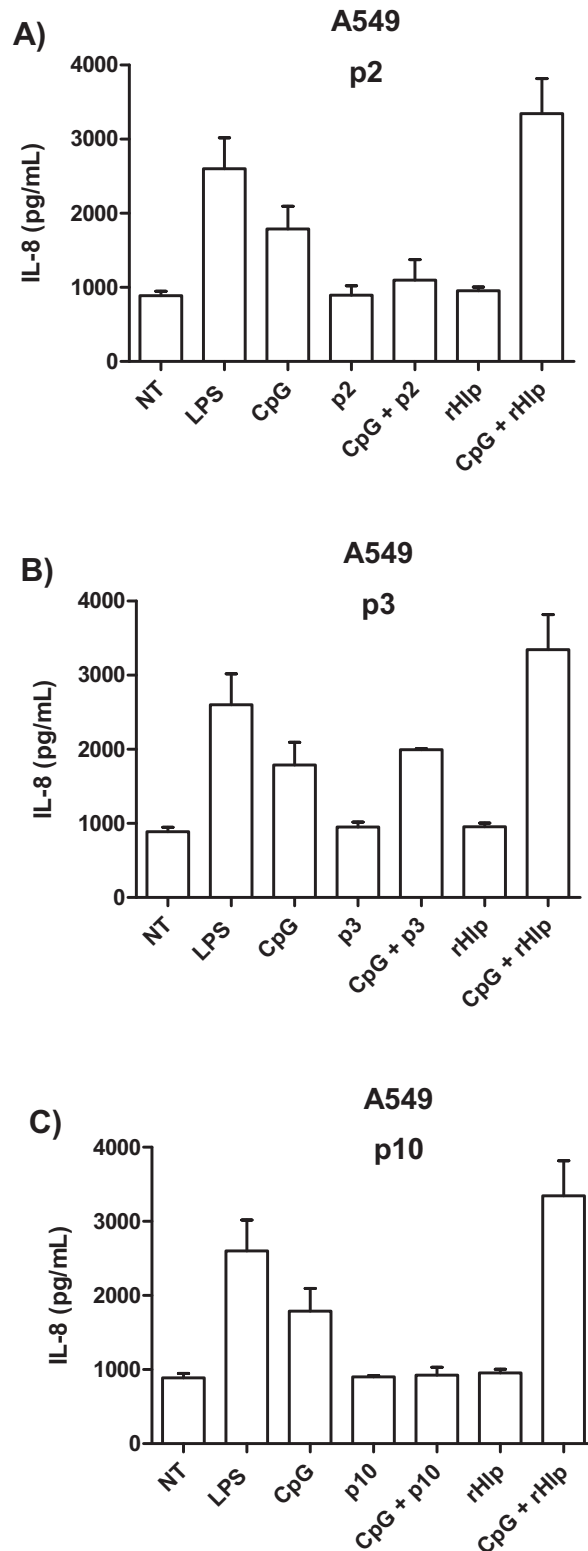


Figura 16: Secreção de IL-8 por células epiteliares alveolares em resposta ao estímulo com peptídeos sintéticos derivados da seqüência da Hlp na presença ou ausência de CpG. As células alveolares foram tratadas com 0,5 μ M da rHlp ou 0,5 μ M dos peptídeos p2 (A), p3 (B) ou p10 (C) pré-incubados ou não com 1 μ M de CpG, ou então com CpG somente por 96 horas. O LPS (1 μ g/mL) foi usado como controle positivo. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão. NT, não tratado. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas.

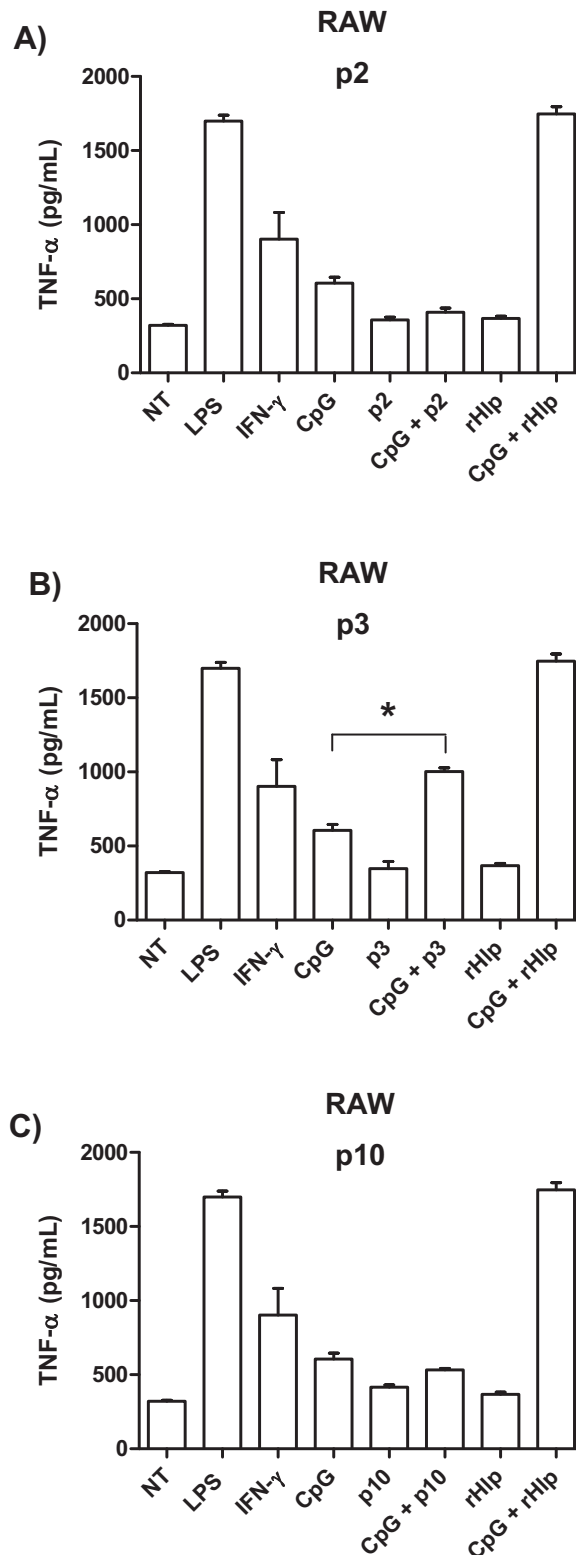


Figura 17: Secreção de TNF- α por macrófagos em resposta ao estímulo com peptídeos sintéticos derivados da sequência da Hlp na presença ou ausência de CpG. Os macrófagos foram tratados com 0,05 μ M da rHlp ou 0,05 μ M dos peptídeos p2 (A), p3 (B) ou p10 (C) pré-incubados ou não com 0,1 μ M de CpG, ou então com CpG somente por 48 horas. O LPS (100ng/mL) e o IFN- γ (10ng/mL) foram usados como controles positivos. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α presentes no sobrenadante da cultura celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão. NT, não tratado. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa (P < 0,05).

4. Efeito da adição de CpG a cepas de *M. smegmatis* selvagem e mutante para o gene *hlp*, na indução de mediadores inflamatórios por células epiteliais alveolares e macrófagos

Nos experimentos seguintes, passamos a avaliar o efeito da Hlp e sua interação com CpG no contexto da bactéria inteira, utilizando as cepas de *M. smegmatis* selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* (Δhlp). Inicialmente, para avaliar a expressão da Hlp nestas cepas, foi obtido um lisado total da suspensão dos bacilos. O lisado foi submetido à SDS-PAGE seguido de *immunoblotting* com anticorpo monoclonal para Hlp (5G9). Analisando a **figura 18**, foi possível confirmar a expressão da Hlp apenas pela cepa selvagem.

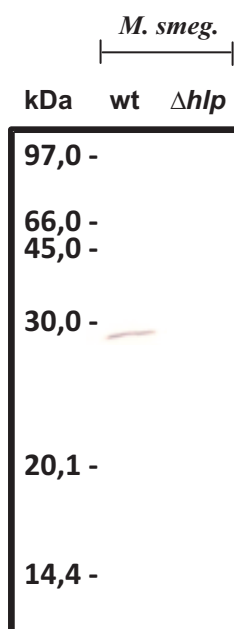


Figura 18: Immunoblotting do lisado total de *M. smegmatis* selvagem e mutante para o gene *hlp*. A suspensão dos bacilos foi centrifugada, ressuspendida em tampão de amostra, sonicada por 1 minuto e aquecida a 100°C. Após repetir o último procedimento duas vezes, a amostra foi centrifugada e submetida a gel de SDS-PAGE 15%. As proteínas retidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, que, posteriormente, foi bloqueada com BSA 3% e identificada pelo tratamento com anticorpo monoclonal para Hlp (5G9) seguido de IgG anti-mouse conjugado a fosfatase alcalina. A revelação foi realizada utilizando substrato colorimétrico. Os marcadores de peso molecular estão indicados à esquerda.

Numa etapa seguinte, a associação de *M. smegmatis* wt e Δhlp às células epiteliais alveolares e aos macrófagos foi comparada. Para tal, as células foram tratadas com as bactérias pré-marcadas com PKH2 fluorescente, numa relação de 10 bacilos para cada célula. Após 24 horas, o grau de associação das bactérias às células foi avaliado em citômetro de fluxo (FACSAccuri). O resultado representado pela **figura 19** mostra uma associação maior do *M. smegmatis* wt às células epiteliais alveolares em comparação ao *M. smegmatis* Δhlp . No caso dos macrófagos, foi possível observar um grau de associação semelhante nas duas cepas de micobactérias, como pode ser visto no resultado representado pela **figura 20**.

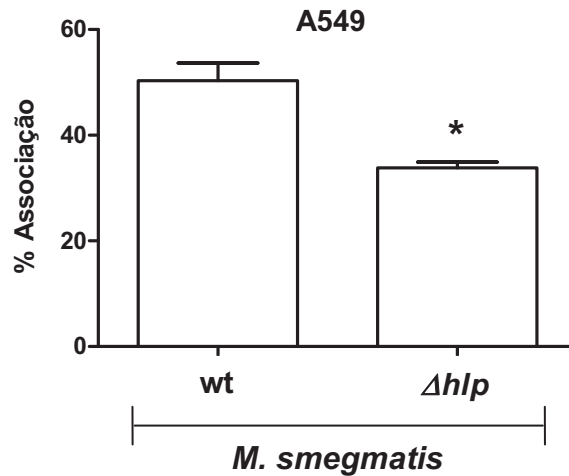


Figura 19: Efeito da proteína Hlp na associação de *M. smegmatis* às células epiteliais alveolares. As células epiteliais foram tratadas com *M. smegmatis* selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* (Δhlp) pré-marcadas com PKH2 fluorescente numa relação de 10 bacilos para cada célula por 24 horas. Após este período, o grau de associação foi analisado em citômetro de fluxo (FACSAccuri). Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

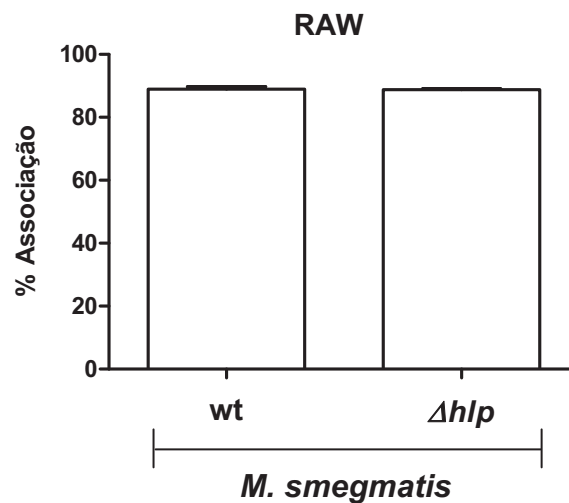


Figura 20: Efeito da proteína Hlp na associação de *M. smegmatis* aos macrófagos. Os macrófagos foram tratados com *M. smegmatis* selvagem (wt) e mutante para o gene *hlp* (Δhlp) pré-marcadas com PKH2 fluorescente numa relação de 10 bacilos para cada célula por 24 horas. Após este período, o grau de associação foi analisado em citômetro de fluxo (FACSAccuri). Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado expresso como a média de 3 experimentos independentes feitos em duplicatas.

Para finalizar o trabalho, foi feita a análise da secreção de citocinas, quimiocinas e óxido nítrico após estímulo com *M. smegmatis* wt ou Δhlp pré-incubados ou não com o oligonucleotídeo CpG ou com o DNA genômico de BCG. Para tal, as células foram tratadas com os estímulos mencionados e também com o LPS, que foi usado como controle positivo. No caso dos macrófagos também foi utilizado IFN- γ como controle.

É possível notar na **figura 21A** que, após 96 horas de estímulo, as células alveolares secretaram uma quantidade maior de IL-8 em resposta ao *M. smegmatis* wt pré-incubado com o CpG em comparação às células só estimuladas com a micobactéria, o mesmo não sendo observado com a cepa mutante. O mesmo fenômeno foi observado em relação à secreção de RANTES, como mostra a **figura 21B**. Porém, neste caso, a estimulação das células com a cepa mutante combinada ao CpG induziu a secreção desta quimiocina em níveis significativos, quando comparados aos observados nas culturas tratadas com estes estímulos separadamente. Não foram observadas diferenças significativas em relação à secreção de MCP-1, IL-6, TNF- α e óxido nítrico (dado não-mostrado).

A **figura 22** mostra a secreção de TNF- α pelos macrófagos em resposta aos estímulos após 48 horas. Foi possível constatar que também ocorreu um aumento significativo desta citocina frente ao estímulo com *M. smegmatis* wt pré-incubado com o CpG. Não foi possível identificar nenhuma diferença na secreção de óxido nítrico (dado não-mostrado). De forma inesperada, ao contrário do observado com o CpG, a adição de DNA genômico de BCG não causou nenhum efeito na secreção dos mediadores analisados, tanto nas células epiteliais como em macrófagos.

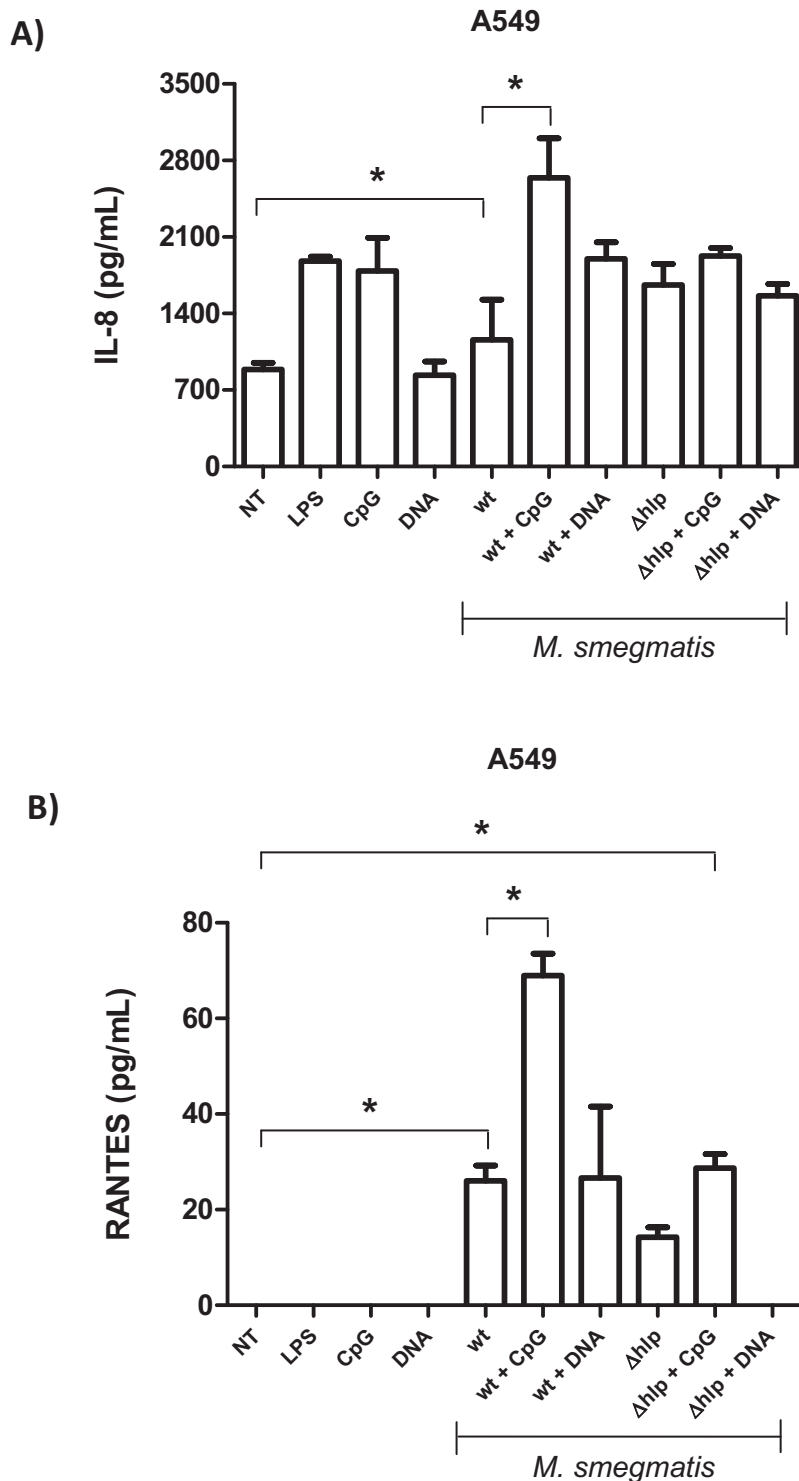


Figura 21: Secreção de IL-8 e RANTES por células epiteliais alveolares em resposta ao estímulo com *M. smegmatis* wt ou Δhlp na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG ou DNA micobacteriano. As células alveolares foram tratadas com *M. smegmatis* wt ou Δhlp pré-incubados ou não com CpG (1 μ M) ou com DNA (10 μ g/mL) na proporção de 10 bacilos para cada célula, ou então com CpG ou DNA somente por 96 horas. O LPS (1 μ g/mL) foi usado como controle positivo. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de IL-8 (A) e RANTES (B) presentes no sobrenadante da cultura celular. NT, não tratado. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

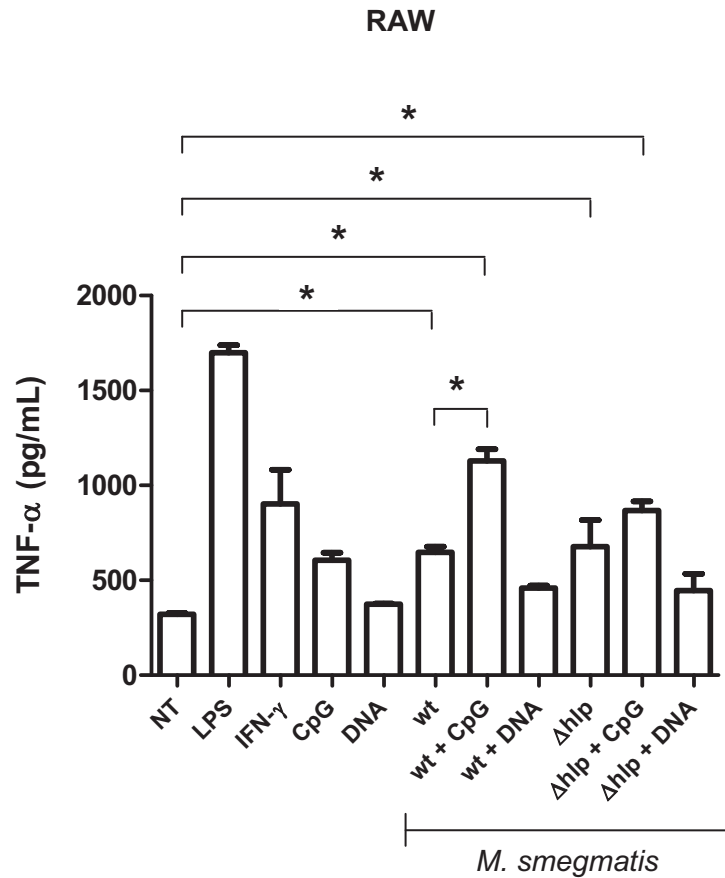


Figura 22: Secreção de TNF- α pelos macrófagos em resposta ao estímulo com *M. smegmatis* wt ou Δhlp na presença ou ausência do oligonucleotídeo CpG ou DNA micobacteriano. Os macrófagos foram tratados com *M. smegmatis* wt ou Δhlp pré-incubados ou não com CpG (0,1 μ M) ou com DNA (1 μ g/mL) na proporção de 10 bacilos para cada célula, ou então com CpG ou DNA somente por 48 horas. O LPS (100ng/mL) e o IFN- γ (10ng/mL) foram usados como controles positivos. Após este período, foi feita a quantificação por ELISA dos níveis de TNF- α presentes no sobrenadante da cultura celular. NT, não tratado. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Resultado expresso como representativo de 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. * Diferença considerada estatisticamente significativa ($P < 0,05$).

Apesar do uso intensivo de antibióticos e programas de vacinação, as doenças infecciosas provocadas por agentes microbianos continuam sendo uma das grandes causas de morbidade e mortalidade mundial. Estudos epidemiológicos prevêm que a incidência dessas doenças irá aumentar (WHO, 2010). Associado a isso, há o aumento de cepas resistentes a múltiplas drogas. Isso demonstra a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas mais eficazes e, conseqüentemente, a importância de entender como as bactérias causam doenças.

A hanseníase e a tuberculose são exemplos de doenças que, apesar da disponibilidade de um regime efetivo de tratamento, ainda constituem um grave problema de saúde pública em alguns países do mundo, inclusive no Brasil (WHO, 2010; Ministério da Saúde, 2010). No entanto, outras doenças associadas ao gênero *Mycobacterium* vêm adquirindo importância epidemiológica, tais como infecções cutâneas, pós-operatórias e danos pulmonares (Katoch, 2004; Middleton *et al.*, 2000; Yamazaki *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2011; Mazor *et al.*, 2010).

A célula epitelial vem ganhando destaque em estudos que abordam os mecanismos de patogenia das micobactérias. Por constituir a primeira célula que o patógeno entra em contato, representa o primeiro desafio a ser vencido no processo de colonização do hospedeiro. A interação com a mucosa respiratória é um evento chave na patogênese das micobacterioses por constituir a principal porta de entrada para a maioria das micobactérias (Murray, 2006).

Além de representar uma barreira física contra microrganismos patogênicos, o tecido epitelial desempenha um papel relevante na resposta imune inata mediada por receptores de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos, incluindo os TLRs. Neste contexto, alguns relatos têm demonstrado a participação ativa do epitélio respiratório na resposta do hospedeiro às micobactérias. Estas células são capazes de modular a inflamação local e gerar uma resposta imune específica contra as micobactérias, através da secreção de uma série de mediadores (Mayer *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2007; Wickremasinghe *et al.*, 2004; Medzhitov *et al.*,

1997). Isto é possível graças ao fato desses mediadores possuírem a função de recrutar células do sistema imune ao local da infecção. Sendo assim, a técnica de vacinação intranasal vem sendo estudada como uma nova estratégia para controlar infecções micobacterianas. Como os antígenos imunizantes são produzidos no trato respiratório superior, desenvolve-se, com isso, uma reação imunológica local, impedindo um posterior estabelecimento da infecção (revisito por Oliveira *et al.*, 2007).

Estudos realizados nos últimos anos indicam que o reconhecimento das micobactérias pelos receptores TLRs representa uma etapa essencial na geração de uma resposta imune capaz de conter a infecção. Camundongos deficientes em Myd88, uma proteína adaptadora que participa da sinalização intracelular da maioria dos receptores TLR, mostram um grande aumento de susceptibilidade à infecção por via aérea por *M. tuberculosis*, semelhante aos animais deficientes em IFN- γ (Scanga *et al.*, 2004; Fremond *et al.*, 2004). Igualmente, células apresentadoras de antígenos (APCs) destes animais, quando estimuladas *in vitro* com *M. tuberculosis* mostram uma marcante redução na produção de IL-12, TNF- α e NO (Fremond *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2003).

Dentre as moléculas que constituem as micobactérias, várias têm sido caracterizadas como ligantes e potentes estimuladoras de receptores TLR *in vitro*, envolvendo principalmente o TLR-2. A LAM, os PIMs e as lipoproteínas constituem exemplos de componentes micobacterianos ligantes de TLR-2 bem caracterizados (revisito por Krutzik & Modlin, 2004). Contudo, o reconhecimento *in vivo* das micobactérias parece depender de múltiplos receptores TLRs, uma vez que, camundongos deficientes em um único tipo de receptor, como o TLR-2 por exemplo, se mostram apenas um pouco mais susceptíveis quando expostos a aerossóis de *M. tuberculosis* (Drennan *et al.*, 2004), em contraste com a grande susceptibilidade observada nos camundongos Myd88^{-/-} (Scanga *et al.*, 2004; Fremond *et al.*, 2004).

Recentemente foi demonstrado que o reconhecimento concomitante de micobactérias via TLR-2 e TLR-9 gera a maior parte, senão todo o estímulo necessário para indução de resposta imune protetora antimicobacteriana dependente de receptores TLR (Bafica *et al.*, 2007). Os ligantes clássicos de TLR-9 são DNA de origem viral ou bacteriana, ricos em motivos CpG não

metilados, que constituem os sítios de interação com este receptor (revisto por Krieg, 2002). Antes mesmo da caracterização do mecanismo de reconhecimento via TLR-9, as propriedades imunoestimuladoras do DNA isolado de BCG e de outras bactérias já haviam sido descritas (Tokunaga *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1992). O receptor TLR-9 está localizado em compartimentos de membrana intracelular, tais como o retículo endoplasmático, o endossomo e o lisossomo (Leifer *et al.*, 2004; Latz *et al.*, 2004). Em seres humanos, a expressão de TLR-9 tem sido descrita principalmente em linfócitos B, monócitos e em células dendríticas plasmocitóides (Takeshita *et al.*, 2001). Contudo, Platz e colaboradores (2004) mostraram a expressão de TLR-9 também em células epiteliais respiratórias.

A proteína Hlp foi descrita como uma adesina importante na interação de micobactérias com células epiteliais respiratórias devido a sua ligação a glicosaminoglicanas presentes na superfície celular (Aoki *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005; Lefrançois *et al.*, 2011). Além de se ligar a glicosaminoglicanas, a Hlp possui a capacidade de se ligar ao DNA bacteriano regulando a expressão gênica (Furugen *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 1999) e é considerada como antígeno reconhecido pelo sistema imune durante a infecção por micobactérias (Prabhakar *et al.*, 1998). Um estudo recente mostrou que o complexo Hlp-CpG, gerado devido à capacidade da Hlp de se ligar ao DNA, foi capaz de ser reconhecido pelo receptor TLR-9, ativando a resposta imune inata e aumentando a resposta imune celular e humoral específica contra a Hlp em camundongos da linhagem C3H/HeJ infectados com *M. tuberculosis* (Matsumoto, *et al.*, 2005).

Até o presente, estudos sobre a resposta do hospedeiro a infecções por micobactérias têm se centrado na análise de células constituintes do sistema imune, tais como células do sistema de fagócitos mononucleares e linfócitos. Tentando preencher esta lacuna, o objetivo geral do presente trabalho foi investigar o papel do receptor TLR-9 no reconhecimento das micobactérias pelo epitélio respiratório. Para tal, analisamos a capacidade da Hlp, quando combinada ou não a DNA, de ativar a resposta imune inata de células epiteliais alveolares e macrófagos.

Para atingir este objetivo, utilizamos a proteína Hlp recombinante de *M. bovis* BCG produzida no nosso laboratório. Uma preocupação inicial foi verificar

se a forma recombinante da proteína produzida em *E. coli* preservava a capacidade de se ligar a DNA e a componentes da matriz extracelular como o colágeno, conforme descrito em trabalhos anteriores (Lima *et al.*, 2005; Lefrançois *et al.*, 2011). Para isto, ensaios de ligação em fase sólida foram realizados utilizando o DNA genômico isolado de BCG bem como o colágeno do tipo 1. Os resultados apresentados na **figura 12** mostram que a rHlp de BCG é capaz de se ligar tanto ao DNA quanto ao colágeno-1 de maneira dose-dependente, confirmando os achados feitos anteriormente.

Como a rHlp de BCG foi produzida em *E. coli*, uma etapa crítica para avançar no nosso estudo foi avaliar a possível contaminação da nossa preparação de rHlp com LPS, um forte indutor de resposta imune inata. Como as células epiteliais também expressam TLR-4 (MacRedmond *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2008), o principal receptor de reconhecimento de patógenos (PRR) que se liga a LPS, uma contaminação com este polissacarídeo poderia induzir a secreção de mediadores inflamatórios pela célula epitelial confundindo nossa análise. Como já havia sido demonstrado que a Hlp *per se* é incapaz de induzir a produção de TNF- α por macrófagos (Matsumoto, *et al.*, 2005), nos valemos desta propriedade para avaliar o grau de contaminação de nossa preparação por LPS. A partir dos dados mostrados na **figura 11** concluímos que o grau de contaminação da nossa preparação de rHlp não interferiria na análise dos ensaios posteriores.

O próximo passo foi investigar a capacidade imunoestimuladora da Hlp pré-incubada com DNA bacteriano. Para tal, foram utilizados dois modelos celulares, os macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 e as células epiteliais alveolares humanas da linhagem A549. Primeiramente, foram realizados ensaios para padronizar a concentração ideal do CpG capaz de induzir a secreção de diferentes mediadores inflamatórios por estas células. Para tal, as culturas celulares foram tratadas com concentrações crescentes de CpG, um oligonucleotídeo sintético análogo a DNA bacteriano, por 24 horas. As células epiteliais passaram a secretar IL-8 e MCP-1 em níveis superiores aos basais somente na concentração de 1 μ M de CpG, não sendo observado aumento na secreção dos outros mediadores analisados (IL-6, TNF- α , RANTES e óxido nítrico). Nossos resultados estão de acordo com os dados obtidos por Droemann e colaboradores (2005), que mostraram a produção de

MCP-1 por células A549 em resposta ao CpG, além de indicarem um aumento da expressão de TLR-9 por estas células após esta estimulação. No que se refere aos macrófagos, observou-se um aumento nos níveis de TNF- α (duas vezes em relação ao controle não estimulado) já a partir da concentração de 0,1 μ M de CpG; esta concentração sub-ótima foi a escolhida para os ensaios posteriores de estimulação .

Numa etapa seguinte do trabalho, iniciamos propriamente ditos os ensaios do nosso estudo, investigando o efeito da estimulação das células epiteliais e macrófagos simultaneamente com CpG e rHlp, sobre a secreção dos mediadores inflamatórios. Os resultados foram comparados com as células tratadas somente com o CpG ou com a rHlp. Foi possível observar um maior aumento na secreção de IL-8 após 96 horas de estímulo em células epiteliais. Os dados mostrados na **figura 15** indicam que a rHlp *per se* não foi capaz de estimular as células epiteliais a secretarem os mediadores estudados, nas condições experimentais utilizadas, em níveis superiores a aqueles constitutivamente produzidos. Por outro lado, como esperado, as células epiteliais responderam ao LPS e CpG produzindo mais IL-8. Já a combinação rHlp+CpG induziu uma secreção aproximadamente 2 vezes maior de IL-8 em relação às células só estimuladas com CpG e de quase quatro vezes mais em relação aos níveis observados com a célula só estimulada com rHlp, indicando um sinergismo entre estes dois estímulos.

Este mesmo comportamento da Hlp em combinação com a CpG já havia sido descrito anteriormente no contexto de macrófagos (Matsumoto, *et al.*, 2005) e foi confirmada no nosso estudo. Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 secretaram aproximadamente quatro vezes mais TNF- α , após 48 horas de estímulo, quando tratadas com rHlp+CpG em comparação às células estimuladas só com rHlp, e mais de duas vezes em relação às células só estimuladas com CpG. A Hlp foi a primeira proteína identificada que aumentava de forma considerável a resposta imune mediada por CpG (Matsumoto *et al.*, 2005). Uma possível explicação para o efeito sinérgico da Hlp sobre a CpG poderia ser explicada pela capacidade desta proteína de se ligar simultaneamente às moléculas de matriz extracelular presentes na superfície celular e ao DNA. Ao se ligar a componentes de matriz extracelular, a Hlp provavelmente facilitaria a internalização do CpG para os compartimentos

endossomais e seu subsequente reconhecimento pelo receptor TLR-9, levando à ativação da resposta imune inata, com produção de mediadores inflamatórios que são críticos na migração, maturação e ativação de células apresentadoras de antígenos.

Estudos mais recentes em malária murina reforçam essa hipótese e confirmam as propriedades imunoestimuladoras de complexos resultantes da interação DNA-proteína (Wu *et al.*, 2010; Gowda *et al.*, 2011). Na infecção por plasmódio, os nucleossomos (complexo DNA-histona) foram identificados como os principais componentes do parasita responsáveis pela ativação de células dendríticas e produção de mediadores inflamatórios. Estes trabalhos também mostraram que a formação do complexo DNA-proteína é essencial para a internalização do DNA pela célula dendrítica e para o seu posterior reconhecimento por TLR-9. Assim, o DNA *per se* seria uma molécula imunologicamente inerte, mas a sua associação com proteínas ligantes de DNA, como as histonas, o transformaria em uma molécula com fortes propriedades imunoestimuladoras. Estes autores também mostraram que polímeros catiônicos, como a polilisina, são igualmente capazes de ativar o DNA, indicando o envolvimento de interações iônicas na formação do complexo. Neste ponto, vale a pena lembrar que veículos catiônicos são igualmente a base para protocolos de transfecção, pois, possivelmente, ao se complexarem ao DNA e interagirem com a superfície negativa das células eucariotas, facilitam sua entrada no interior das células (Dass, 2004).

Os sítios da Hlp que interagem com DNA e proteoglicanas foram previamente mapeados (Furugen *et al.*, 2001; Portugal *et al.*, 2008). Dois sítios distintos de ligação a heparan sulfato, localizados, respectivamente, na porção N e C-terminal da proteína, foram identificados (Portugal *et al.* 2008), sendo que o sítio localizado na porção N-terminal coincide com a região de ligação ao DNA previamente caracterizado (Furugen *et al.*, 2001). Dando continuidade ao nosso estudo, testamos a capacidade de peptídeos sintéticos quanto à capacidade de mimetizar o efeito imunoestimulador da proteína inteira. Três peptídeos de 30 aminoácidos foram testados: o p2, correspondente a uma região da proteína externa a estes sítios; o p3, cuja seqüência compreende o sítio da proteína com capacidade de interação tanto com DNA, como com

heparan sulfato; e o p10, cuja seqüência corresponde ao sitio de interação com heparan sulfato.

Os peptídeos foram incubados com o CpG e posteriormente foram adicionados às células utilizando metodologia semelhante ao descrito para a Hlp inteira. Dentre os peptídeos utilizados era esperado que, assim como a Hlp inteira, apenas o p3 fosse capaz de aumentar a secreção de mediadores inflamatórios induzida por CpG. De fato, este foi o resultado observado com as células RAW 264.7. O peptídeo p3 juntamente com o CpG foi capaz de induzir um aumento na secreção de TNF- α em aproximadamente duas vezes em relação à célula estimulada somente com CpG. Contudo, interessante, não foi observado aumento da secreção de IL-8 nas células epiteliais ao utilizarmos o p3 juntamente com o CpG. Uma possível explicação para este resultado estaria numa menor eficiência do peptídeo p3, em relação à proteína inteira, na capacidade de promover a internalização do CpG e sua ligação ao TLR-9, disparando a sinalização por este receptor. Como, diferentemente dos macrófagos, tanto a expressão do receptor TLR-9 como a atividade endocítica nas células epiteliais é mais baixa (Takeshita *et al.*, 2001; Platz *et al.*, 2004), isto poderia resultar numa menor sensibilidade destas células ao complexo p3-CpG, requerendo, possivelmente, a utilização de concentrações maiores do complexo para visualização do efeito.

Os ensaios com os peptídeos confirmaram que a presença de um sitio de ligação a DNA é essencial para a atividade imunoestimuladora sobre o CpG. Apesar de p10 ser um peptídeo catiônico rico em resíduos de lisina, com capacidade de interagir com proteoglicanas da superfície celular, o não incremento da atividade imunoestimuladora da CpG por este peptídeo poderia ser explicada pela sua incapacidade de se complexar ao DNA, tornando-o imunologicamente inerte no contexto da ativação do receptor TLR-9.

Já havia sido demonstrado previamente que o receptor TLR9 participa do reconhecimento das micobactérias pelos macrófagos e células dendríticas, com subsequente indução da produção de mediadores inflamatórios por estas células (von Meyenn *et al.*, 2006; Bafica *et al.*, 2007; Pompei *et al.*, 2007). Como a Hlp também está presente na superfície das micobactérias, o próximo passo foi investigar se a ativação da célula epitelial e macrófago pela micobactéria viva poderia ser aumentada na presença de CpG. Como outras

moléculas na superfície bacteriana poderiam ligar CpG, o envolvimento específico da Hlp nestes ensaios foi monitorado, comparando o comportamento de uma cepa de *M. smegmatis* mutante para o gene *hlp* com a cepa selvagem. Primeiramente, ensaios foram realizados para avaliar o grau de associação das duas cepas de *M. smegmatis* às células em estudo. Observamos um decréscimo na capacidade da cepa mutante de se associar às células epiteliais alveolares de aproximadamente duas vezes em comparação à cepa selvagem. Por outro lado, o mesmo não pôde ser observado com os macrófagos, em que o perfil de associação foi semelhante para ambas as cepas de *M. smegmatis*. Estes dados estão de acordo com a literatura, onde a participação da Hlp como adesina foi demonstrada na interação de micobactérias com células epiteliais, mas não com macrófagos. (Aoki *et al.*, 2004; Lefrançois *et al.*, 2011; Pethe *et al.*, 2001).

Conforme observado na **figura 22**, as células epiteliais alveolares passaram a secretar mais IL-8 quando foram estimuladas, por 96 horas, com a cepa selvagem pré-tratada com o CpG. O mesmo não ocorreu com a cepa mutante em que o pré-tratamento com o CpG não promoveu nenhum aumento de estímulo. Em outra análise foi possível constatar que o CpG isoladamente não foi capaz de induzir as células epiteliais a secretarem RANTES. A secreção desta quimiocina só pôde ser observada nas células estimuladas com *M. smegmatis* selvagem ou mutante, sendo que a diferença mais significativa foi observada em estímulos em que foi utilizado o bacilo selvagem pré-incubado com o CpG. Nos macrófagos também foi possível notar um aumento na secreção de TNF- α , após estímulo por 48 horas com a cepa selvagem juntamente com o CpG. Estes resultados sugerem que o CpG foi capaz de se ligar à Hlp presente no *M. smegmatis*, o qual interagiu com a superfície celular levando à sua internalização e facilitando a ativação do receptor TLR-9 promovida pelo CpG. Esta ativação resultou, então, na secreção de tais mediadores.

Era esperado que o DNA genômico isolado de BCG agisse de forma semelhante ao CpG, porém o mesmo não ocorreu em nenhuma situação testada. Podemos pensar que ocorreu, durante os experimentos, uma degradação do DNA ou que a amostra não apresentava um grau de pureza

ideal. Podemos sugerir também que uma maior quantidade de DNA genômico seja necessária para que ocorra a ativação de TLR-9 (revisado por Krieg, 2002).

Os resultados descritos acima indicam que, uma vez internalizadas, as micobactérias podem ativar células epiteliais respiratórias via reconhecimento por TLR-9. Estes dados estão de acordo com um estudo recente que analisou a interação de *M. avium paratuberculosis*, agente etiológico da doença de Johnes, uma enfermidade crônica intestinal muito prevalente em ruminantes, com células epiteliais do intestino (Pott *et al.*, 2009). Os autores mostraram que estas células são ativadas por *M. avium paratuberculosis*, passando a produzir a quimiocina MIP-2, e que esta ativação é dependente da internalização da bactéria na célula e do seu subsequente reconhecimento pelos receptores TLR-9 e NOD1.

A sinalização via reconhecimento por TLR-9 tem sido reconhecida como importante para a geração de resposta imune adaptativa do tipo Th1, específica contra vírus e bactérias (Bafica *et al.*, 2007). No processo de diferenciação dos linfócitos T CD4 virgens para células T CD4 efetoras com o fenótipo Th1, as células apresentadoras de antígenos (células dendríticas e macrófagos) desempenham papel central, produzindo a citocina IL-12, fator determinante para que esta diferenciação ocorra (Zhu *et al.*, 2010). Um estudo recente comparou o grau de magnitude da expressão de IL-12, assim como os TLRs envolvidos, em células dendríticas e macrófagos em resposta ao *M. tuberculosis* (Pompei *et al.*, 2007). Foi demonstrado que as células dendríticas produzem níveis bem maiores de IL-12 em resposta ao *M. tuberculosis*, sendo esta expressão dependente de TLR-9. Já os macrófagos mostraram uma expressão significativamente menor de IL-12 quando estimuladas com *M. tuberculosis*, sendo a mesma regulada através da ativação de TLR-2 e não TLR-9. A importância da sinalização via TLR-9 na resistência a infecções por micobactérias foi reforçada por estudo recente que demonstrou a participação de TLR-9 na formação do granuloma e diferenciação de células Th17 via aumento da expressão do ligante Notch dll4 nas células dendríticas (Ito *et al.*, 2009). Estes dados estão de acordo com os resultados obtidos com adjuvantes, baseados na combinação de CpG com veículos catiônicos, como peptídeos anti-bacterianos, que têm se mostrado eficientes na geração de resposta imune anti-*M. tuberculosis* (Parra *et al.*, 2004; Agger *et al.*, 2006).

Os nossos resultados se somam aos relatados por Matsumoto e colaboradores (2005), indicando que o complexo Hlp-DNA apresenta propriedades imunoestimuladoras tanto *in vitro*, em células epiteliais respiratórias e macrófagos, como *in vivo*, aumentando a resistência contra a infecção por *M. tuberculosis*. Dado o papel central desempenhado pelas células dendríticas que, através da produção de IL-12, promovem a diferenciação de células TCD4 Th1 produtoras de IFN- γ , importantes no controle da infecção por micobactérias, uma extensão natural deste trabalho será avaliar os efeitos imunoestimuladores do complexo Hlp-DNA nestas células. Conforme mencionado anteriormente, trabalhos recentes vêm demonstrando a importância da via de TLR-9, através do reconhecimento de DNA micobacteriano, na produção de IL-12 pelas células dendríticas e subsequente geração de resposta Th1 *in vivo* (Pompei *et al.*, 2007; Bafica *et al.*, 2007). Assim, a expectativa é que o complexo Hlp-DNA se mostre um potente estimulador destas células. Dentro deste contexto, aliado ao fato de tratar-se de uma proteína muito conservada e encontrada em todas as micobactérias, acreditamos que a Hlp tenha grande potencial de agir, quando combinada a DNA, tanto como um bom imunógeno, assim como adjuvante em intervenções imunes contra as micobacterioses, como na vacinação intranasal.

CONCLUSÕES

- A proteína rHlp de BCG mostrou capacidade de se ligar ao DNA micobacteriano e ao colágeno do tipo 1 de forma dose-dependente;
- O oligonucleotídeo CpG induziu a secreção de mediadores inflamatórios (IL-8 e MCP-1) em células epiteliais alveolares. Contudo, estas células se mostraram menos sensíveis ao CpG quando comparadas aos macrófagos, uma vez que concentrações maiores (na ordem de dez vezes) foram necessárias para sua estimulação;
- A proteína Hlp de BCG se mostrou imunologicamente inerte quando utilizada isoladamente como estímulo em culturas *in vitro* de células epiteliais alveolares e macrófagos. Porém, quando combinada ao oligonucleotídeo CpG, a Hlp potencializou a secreção de IL-8 por células epiteliais alveolares e de TNF- α por macrófagos induzida pelo CpG;
- Ensaio com peptídeos sintéticos derivados da sequência da Hlp indicaram que o sítio de ligação ao DNA da molécula é essencial para a potencialização da atividade imunoestimuladora do CpG;
- A cepa de *M. smegmatis* mutante para o gene *hlp* mostrou menor associação às células epiteliais alveolares quando comparada à cepa selvagem, sugerindo a participação da Hlp na adesão da micobactéria a estas células;
- O oligonucleotídeo CpG, quando adicionado ao *M. smegmatis*, potencializou a secreção de IL-8 e RANTES por células epiteliais alveolares, e TNF- α por macrófagos. Este efeito não foi observado com a cepa de *M. smegmatis* mutante para o gene *hlp*, indicando que a proteína Hlp constitui um componente essencial de ligação do CpG na superfície bacteriana.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 2008. 6ª ed. Ed. Elsevier;

Agger EM, Rosenkrands I, Olsen AW, Hatch G, Williams A, Kritsch C, Lingnau K, von Gabain A, Andersen CS, Korsholm KS, Andersen P. Protective immunity to tuberculosis with Ag85B-ESAT-6 in a synthetic cationic adjuvant system IC31. *Vaccine*. 2006. 24(26):5452-60;

Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Dev Immunol*. 2011. 2011:814943;

Akira S. Innate immunity and adjuvants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2011. 12;366(1579):2748-55;

Alvarez-Uria G. Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Curr Opin Pulm Med*. 2010. 16(3):251-6;

Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Domenech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K. Extracellular mycobacterial DNA-binding protein 1 participates in mycobacterium-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biol Chem*. 2004. 279(38):39798-806;

Bafica A, Scanga CA, Feng CG, Leifer C, Cheever A, Sher A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2005. 202(12):1715-24;

Barr J. A short history of dapsone, or an alternative model of drug development. *J Hist Med Allied Sci*. 2011. 66(4):425-67;

Bermudez LE, Young LS, Enkel H. Interaction of *Mycobacterium avium* complex with human macrophages: roles of membrane receptors and serum proteins. *Infect Immun*. 1991. 59(5):1697-702;

Bermudez LE, Sangari FJ, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun*. 2002. 70(1):140-6;

Berger E, Batra P, Ralston J, Sanchez MR, Franks AG Jr. Atypical mycobacteria infection in an immunocompromised patient. *Dermatol Online J*. 2010. 15;16(11):21;

Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet*. 2004. 363(9416):1209-19;

- Chiffolleau E, Heslan JM, Heslan M, Louvet C, Condamine T, Cuturi MC. TLR9 ligand enhances proliferation of rat CD4+ T cell and modulates suppressive activity mediated by CD4+ CD25+ T cell. *Int Immunol*. 2007. 19(2):193-201;
- Collins CH, Grange JM, Yates MD. *Tuberculosis Bacteriology – Organization and Practice*. 1997. Butterworth-Heinemann, Orford, 2nd ed.;
- Dass CR. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med (Berl)*. 2004. 82(9):579-91;
- Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. 2007. 82(2):253-8;
- Diamond G, Legarda D, Ryan LK. The innate immune response of the respiratory epithelium. *Immunol Rev*. 2000. 173:27-38;
- Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Frémond C, Wagner H, Kirschning C, Ryffel B. Toll-like receptor 2 deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Am J Pathol*. 2004. 164(1):49-57;
- Droemann D, Albrecht D, Gerdes J, Ulmer AJ, Branscheid D, Vollmer E, Dalhoff K, Zabel P, Goldmann T. Human lung cancer cells express functionally active Toll-like receptor 9. *Respir Res*. 2005. 6:1;
- Düppre NC, Camacho LA, da Cunha SS, Struchiner CJ, Sales AM, Nery JA, Sarno EN. Effectiveness of BCG vaccination among leprosy contacts: a cohort study. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008. 102(7):631-8;
- Escapa VM, Beltrán VP, Viudez LA, Durantez MS, Pastor VP, Felis TS. Intestinal involvement by *Mycobacterium genavense* in an immunodepressed patient. *Gastrointest Endosc*. 2010. 72(5):1108-10;
- Esteban J, Ortiz-Pérez A. Current treatment of atypical mycobacteriosis. *Expert Opin Pharmacother*. 2009. 10(17):2787-99;
- Ferwerda G, Kullberg BJ, de Jong DJ, Girardin SE, Langenberg DM, van Crevel R, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. *Mycobacterium paratuberculosis* is recognized by Toll-like receptors and NOD2. *J Leukoc Biol*. 2007. 82(4):1011-8;
- Ferwerda G, Girardin SE, Kullberg BJ, Le Bourhis L, de Jong DJ, Langenberg DM, van Crevel R, Adema GJ, Ottenhoff TH, Van der Meer JW, Netea MG. NOD2 and toll-like receptors are nonredundant recognition systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005. 1(3):279-85;
- Fontana, RT. As micobactérias de crescimento rápido e a infecção hospitalar: um problema de saúde pública. *Ver Bras Enferm*. 2008. 61,3:371-376;

Fremont CM, Yeremeev V, Nicolle DM, Jacobs M, Quesniaux VF, Ryffel B. Fatal *Mycobacterium tuberculosis* infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88. *J Clin Invest*. 2004. 114(12):1790-9;

Furugen M, Matsumoto S, Matsuo T, Matsumoto M, Yamada T. Identification of the mycobacterial DNA-binding protein 1 region which suppresses transcription *in vitro*. *Microb Pathog*. 2001. 30(3):129-38;

Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003. 197(9):1107-17;

García-Pérez BE, Hernández-González JC, García-Nieto S, Luna-Herrera J. Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microb Pathog*. 2008. 45(1):1-6;

Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, Philpott DJ, Sansonetti PJ. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*. 2003. 278(11):8869-72;

Goodfellow M, Wayne LG. Taxonomy and nomenclature. 472 – 521. *In: The biology of the mycobacteria*. C. Ratledge JL. Standofrd (ed), vol. 1. 1982. Academy Press Ltd. London;

Gowda NM, Wu X, Gowda DC. The nucleosome (histone-DNA complex) is the TLR9-specific immunostimulatory component of *Plasmodium falciparum* that activates DCs. *PLoS One*. 2011;6(6):e20398;

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982. 126(1):131-8;

Greene CM, Carroll TP, Smith SG, Taggart CC, Devaney J, Griffin S, O'neill SJ, McElvaney NG. TLR-induced inflammation in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis airway epithelial cells. *J Immunol*. 2005. 174(3):1638-46;

Gribar SC, Richardson WM, Sodhi CP, Hackam DJ. No longer an innocent bystander: epithelial toll-like receptor signaling in the development of mucosal inflammation. *Mol Med*. 2008. 14(9-10):645-59;

Heifets L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin Respir Crit Care Med*. 2004. 25(3):283-95;

Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JM, Engelhardt H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. 105(10):3963-7;

Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Sandor M, Lukacs NW, Chensue SW, Kunkel SL. TLR9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary

granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *J Clin Invest*. 2009. 119(1):33-46;

Jani MN, Rodrigues CS, Mehta AP. The neglected and often ignored: nontuberculous mycobacteria. *J Glob Infect Dis*. 2011. 3(1):94;

Jarzembowski JA, Young MB. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med*. 2008. 132(8):1333-41;

Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*. 2008. 78(3):518-21;

Junqueira LC, Carneiro J. *Basic Histology*. 10^a Ed. 2003. Ed Lange Medical Books McGraw-Hill;

Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res*. 2004. 120(4):290-304;

Kaur P, Fishman JA, Misdraji J, Varma MC, Kotton CN. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection with hepatic abscesses in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis*. 2011. 13(5):531-5;

Kohama H, Umemura M, Okamoto Y, Yahagi A, Goga H, Harakuni T, Matsuzaki G, Arakawa T. Mucosal immunization with recombinant heparin binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) in infected mice. *Vaccine*. 2008. 26(7):924-32;

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas WH, Hermans PW, Martín C, Palittapongarnpim P, Plikaytis BB, Riley LW, Yakrus MA, Musser JM, van Embden JD.

Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol*. 1999. 37(8):2607-18;

Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol*. 2002. 20:709-60;

Krutzik SR, Modlin RL. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol*. 2004. 16(1):35-41;

Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008. 60(7):795-804;

Kumar SV, Deka MK, Bagga M, Kala MS, Gauthaman K. A systematic review of different type of tuberculosis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2010. 14(10):831-43;

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004. 5(2):190-8;

Lee HM, Yuk JM, Shin DM, Jo EK. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol.* 2009. 29(6):795-805;

Lefrançois LH, Pujol C, Bodier CC, Teixeira-Gomez AP, Drobecq H, Rosso ML, Raze D, Dias AA, Hugot JP, Chacon O, Barletta RG, Loch C, Vidal Pessolani MC, Biet F. Characterization of the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* laminin-binding/histone-like protein (Lbp/Hlp) which reacts with sera from patients with Crohn's disease. *Microbes Infect.* 2011. 13(6):585-94;

Leifer CA, Kennedy MN, Mazzoni A, Lee C, Kruhlak MJ, Segal DM. TLR9 is localized in the endoplasmic reticulum prior to stimulation. *J Immunol.* 200. 173(2):1179-83;

Li R, Song Y, Chen W. Enhancing radiosensitivity of human pulmonary adenocarcinoma cell line A549 by CpG ODN1826. *Cancer Biother Radiopharm.* 2011. 26(1):69-76;

Lin Y, Zhang M, Barnes PF. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1998. 66(3):1121-6;

MacRedmond R, Greene C, Taggart CC, McElvaney N, O'Neill S. Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of human beta-defensin 2 by lipopolysaccharide. *Respir Res.* 2005. 12;6:116;

de Melo Marques MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Sarno EN, Brennan PJ, Vidal Pessolani MC. Bacterial and host-derived cationic proteins bind alpha2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes Infect.* 2000. 2(12):1407-17;

Matsumoto S, Yukitake H, Furugen M, Matsuo T, Mineta T, Yamada T. Identification of a novel DNA-binding protein from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Microbiol Immunol.* 1999;43(11):1027-36;

Matsumoto S, Furugen M, Yukitake H, Yamada T. The gene encoding mycobacterial DNA-binding protein I (MDPI) transformed rapidly growing bacteria to slowly growing bacteria. *FEMS Microbiol Lett.* 2000. 15;182(2):297-301;

Matsumoto S, Matsumoto M, Umemori K, Ozeki Y, Furugen M, Tatsuo T, Hirayama Y, Yamamoto S, Yamada T, Kobayashi K. DNA augments antigenicity of mycobacterial DNA-binding protein 1 and confers protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 2005. 1;175(1):441-9;

Mayer AK, Dalpke AH. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. Arch Immunol Ther Exp (Warsz). 2007. 55(6):353-62;

Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzius K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke AH. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. J Immunol. 2007. 1;178(5):3134-42;

Mazor Y, Sprecher H, Braun E. *Mycobacteria kansasii* disseminated disease. Isr Med Assoc J. 2010. 12(2):121-2;

McDougall AC, Rees RJ, Weddell AG, Kanan MW. The histopathology of lepromatous leprosy in the nose. J Pathol. 1975. 115(4):215-26;

Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. Cell. 1997. 31;91(3):295-8;

Menzio FD, Bischoff R, Fort E, Brennan MJ, Locht C. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998. 13;95(21):12625-30;

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Wilson R. The role of *Mycobacterium avium* complex fibronectin attachment protein in adherence to the human respiratory mucosa. Mol Microbiol. 2000. 38(2):381-91;

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Feldman C, Wilson R. Investigation of mycobacterial colonisation and invasion of the respiratory mucosa. Thorax. 2003. 58(3):246-51;

Minani TJ, Saubolle MA, Yu E, Sussland Z. *Mycobacterium haemophilum* as a novel etiology of cervical lymphadenitis in an otherwise healthy adult patient. J Clin Microbiol. 2010. 48(7):2636-9;

Ministério da Saúde; 2010 In: <http://portal.saude.gov.br>;

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. 5^a ed. Ed. Elsevier. 2006. Rio de Janeiro;

Nair P. Nontubercular mycobacterial pulmonary infection in severe asthma. Chest. 2011. 139(3):721; author reply 721-2;

Noordeen SK, Lopez Bravo L, Sundaresan TK. Estimated number of leprosy cases in the world. Bull World Health Organ. 1992. 70(1):7-10;

Ofori-Adjei D. Buruli ulcer disease. Ghana Med J. 2011. 45(1):1;

Oliveira ML, Arêas AP, Ho PL. Intranasal vaccines for protection against respiratory and systemic bacterial infections. Expert Rev Vaccines. 2007. 6(3):419-29;

Parker D, Prince A. Innate immunity in the respiratory epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011. 45(2):189-201;

Parra M, Pickett T, Delogu G, Dheenadhayalan V, Debie AS, Loch C, Brennan MJ. The mycobacterial heparin-binding hemagglutinin is a protective antigen in the mouse aerosol challenge model of tuberculosis. *Infect Immun*. 2004. 72(12):6799-805;

Pessolani MCV, Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesions play a role? *Microbes Infect*. 2003. 5(7):677-84;

Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatot C, Loch C, Menozzi FD. Characterization of the heparin-binding site of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J Biol Chem*. 2000. 275(19):14273-80;

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006. 124(4):715-27;

Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, Bals R. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol*. 2004. 173(2):1219-23;

Pompei L, Jang S, Zamylny B, Ravikumar S, McBride A, Hickman SP, Salgame P. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. *J Immunol*. 2007. 178(8):5192-9;

Portaels F. Epidemiology of mycobacterial diseases. *Clin Dermatol*. 1995. 13(3):207-22;

Portugal MI, Todeschini AR, de Lima CS, Silva CA, Mohana-Borges R, Ottenhoff TH, Mendonça-Previato L, Previato JO, Pessolani MC. Characterization of two heparan sulphate-binding sites in the mycobacterial adhesin Hlp. *BMC Microbiol*. 2008. 8:75;

Pott J, Basler T, Duerr CU, Rohde M, Goethe R, Hornef MW. Internalization-dependent recognition of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* by intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*. 2009. 11(12):1802-15;

Prabhakar S, Annapurna PS, Jain NK, Dey AB, Tyagi JS, Prasad HK. Identification of an immunogenic histone-like protein (HLPMt) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*. 1998;79(1):43-53;

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1966. 34(3):255-73;

Ronan EO, Lee LN, Beverley PC, Tchilian EZ. Immunization of mice with a recombinant adenovirus vaccine inhibits the early growth of *Mycobacterium tuberculosis* after infection. *PLoS One*. 2009. 4(12):e8235;

- Roy S, Sharma S, Sharma M, Aggarwal R, Bose M. Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an *in vitro* correlate of innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*. 2004. 112(3):471-80;
- Roberts CA, Boylston A, Buckley L, Chamberlain AC, Murphy EM. Rib lesions and tuberculosis: the palaeopathological evidence. *Tuber Lung Dis*. 1998. 79(1):55-60;
- Runyon EH. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med Clin North Am*. 1959. 43(1):273-90;
- Sani M, Houben EN, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, van Zon M, Wever B, Piersma SR, Jiménez CR, Daffé M, Appelmelk BJ, Bitter W, van der Wel N, Peters PJ. Direct visualization by cryo-EM of the mycobacterial capsular layer: a labile structure containing ESX-1-secreted proteins. *PLoS Pathog*. 2010. 5;6(3):e1000794;
- Santos AR, De Miranda AB, Sarno EN, Suffys PN, Degraeve WM. Use of PCR mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol*. 1993. 39(4):298-304;
- Sato N, Fujimura T, Masuzawa M, Yogi Y, Matsuoka M, Kanoh M, Riley LW, Katsuoka K. Recombinant *Mycobacterium leprae* protein associated with entry into mammalian cells of respiratory and skin components. *J Dermatol Sci*. 2007. 46(2):101-10;
- Sawahata M, Hagiwara E, Ogura T, Komatsu S, Sekine A, Tsuchiya N, Takahashi H. Pulmonary mycobacteriosis caused by *Mycobacterium peregrinum* in a young, healthy man. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2010. 48(11):866-70;
- Scanga CA, Bafica A, Feng CG, Cheever AW, Hieny S, Sher A. MyD88-deficient mice display a profound loss in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* associated with partially impaired Th1 cytokine and nitric oxide synthase 2 expression. *Infect Immun*. 2004. 72(4):2400-4;
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006. 19(2):338-81;
- Sharma M, Sharma S, Roy S, Varma S, Bose M. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunol Cell Biol*. 2007. 85(3):229-37;
- Shepard CC, McRae DH. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1968. 36(1):78-82;

Shi S, Nathan C, Schnappinger D, Drenkow J, Fuortes M, Block E, Ding A, Gingeras TR, Schoolnik G, Akira S, Takeda K, Ehrt S. MyD88 primes macrophages for full-scale activation by interferon-gamma yet mediates few responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 2003. 6;198(7):987-97;

Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999. 17;96(17):9857-62;

Silva MT, Portaels F, Pedrosa J. Pathogenetic mechanisms of the intracellular parasite *Mycobacterium ulcerans* leading to Buruli ulcer. *Lancet Infect Dis*. 2009. 9(11):699-710;

Simons S, van Ingen J, Hsueh PR, Van Hung N, Dekhuijzen PN, Boeree MJ, van Soolingen D. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, eastern Asia. *Emerg Infect Dis*. 2011. 17(3):343-9;

Takehita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takehita S, Gursel M, Klinman DM. Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA induced activation of human cells. *J Immunol*. 2001. 1;167(7):3555-8;

Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN, Bloom BR. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity*. 1999. 10(6):641-50;

Theerawit P, Vongsoasup A, Kiatboonsri S. Identifying non-tuberculous mycobacterium lung diseases in acid-fast bacilli positive patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2010. 41(6):1432-7;

Timpe A, Runyon EH. Classics in infectious diseases: the relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease: a preliminary report by Alice Timpe and Ernest H. Runyon. *Rev Infect Dis*. 1981. 3(5):1098-1103;

Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984. 72(4):955-62;

Taipeiner G & Wolff K. Tuberculosis and other mycobacterial infections. *In*: Fitzpatrick TB, Eien AZ, Wolff K, editors. *Dermatology in general medicine*. New York: McGraw-Hill; 1993. p. 1933-50;

Thomson RM; NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg Infect Dis*. 2010. 16(10):1576-83;

Tortoli E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006. 48(2):159-78;

- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia – Artmed. Rio de Janeiro. 2005;
- Tran H, Kamino H, Walters RF. Mycobacterium marinum infection. Dermatol Online J. 2008. 15;14(10):7;
- van Ingen J, Boeree MJ, Dekhuijzen PN, van Soolingen D. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans. Clin Microbiol Infect. 2009. 15(10):888-93;
- Vilaysane A, Muruve DA. The innate immune response to DNA. Semin Immunol. 2009. 21(4):208-14;
- von Meyenn F, Schaefer M, Weighardt H, Bauer S, Kirschning CJ, Wagner H, Sparwasser T. Toll-like receptor 9 contributes to recognition of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin by Flt3-ligand generated dendritic cells. Immunobiology. 2006;211(6-8):557-65;
- Wayne LG. The "atypical" mycobacteria: recognition and disease association. Crit Rev Microbiol. 1985;12(3):185-222;
- WHO/World Health Organization; 2010 *In*: <http://www.who.int>;
- Wickremasinghe MI, Thomas LH, O'Kane CM, Uddin J, Friedland JS. Transcriptional mechanisms regulating alveolar epithelial cell specific CCL5 secretion in pulmonary tuberculosis. J Biol Chem. 2004. 25;279(26):27199-210;
- Wilder-Smith EP, Van Brakel WH. Nerve damage in leprosy and its management. Nat Clin Pract Neurol. 2008. 4(12):656-63;
- Williams B, Neth O, Shingadia D, Dixon G, Jupp RS, Rosendahl K, Eastwood D, Klein N, Brogan P. *Mycobacterium kansasii* causing septic arthritis and osteomyelitis in a child. Pediatr Infect Dis J. 2010. 29(1):88-9;
- Wu X, Gowda NM, Kumar S, Gowda DC. Protein-DNA complex is the exclusive malaria parasite component that activates dendritic cells and triggers innate immune responses. J Immunol. 2010. 15;184(8):4338-48;
- Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. Microbiol Immunol. 1992. 36(9):983-97;
- Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, Hidaka E, Katsuyama T, Stang B, Petrofsky M, Bildfell R, Bermudez LE. The ability to form biofilm influences *Mycobacterium avium* invasion and translocation of bronchial epithelial cells. Cell Microbiol. 2006. 8(5):806-14;
- Young D, Dye C. The development and impact of tuberculosis vaccines. Cell. 2006. 24;124(4):683-7;

Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 2000. 173:39-51;

Zhou M, Wan HY, Huang SG, Li B, Li M. Expression of toll-like receptor 4 in human alveolar epithelial cells and its role in cellular inflammation. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008. 5;88(30):2112-6;

Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. *Immunol Rev.* 2010. 238(1):247-62;

Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffé M. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *J Bacteriol.* 2008. 190(16):5672-80.