

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

MICHELE FERNANDES RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DE MACRÓFAGOS
ALVEOLARES EM CAMUNDONGOS BALB/c
INFECTADOS COM CEPAS VIRULENTA E
ATENUADA DE *Mycobacterium bovis*

Juiz de Fora

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Michele Fernandes Rodrigues

AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS VIRULENTA E ATENUADA DE *Mycobacterium bovis*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2008

MICHELE FERNANDES RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA APOPTOSE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES
EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS
VIRULENTA E ATENUADA DE *Mycobacterium bovis*

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Saúde – área de concentração em Saúde Brasileira do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovada em: 06/08/2008

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Dra. Clarice Abramo
Universidade Federal de Juiz de Fora

Algumas pessoas marcam a nossa vida para sempre, umas porque nos vão ajudando na construção, outras porque nos apresentam projetos de sonho e outras ainda porque nos desafiam a construí-los. E muitas vezes quando damos conta, já é tarde para lhes agradecer, por isso dedico este trabalho...

À memória de Michele Mendes Barsante,
que contribuiu de forma imensurável para a realização deste trabalho, e que apesar do breve tempo de convivência deixou muitos ensinamentos e muitas saudades.

Aos meus pais Edson e Célia

“O filho que encontra no lar uma escola de amor e trabalho, de disciplina e compreensão, jamais esquecerá as lições ali aprendidas. Além das palavras de orientação, é muito importante o exemplo da boa conduta. Por mais duros que sejam os embates da vida, ele saberá sempre escolher e trilhar os melhores caminhos, agradecendo aos pais, que souberam educá-lo com amor”.

Obrigada por tudo !!!!!

Ao meu filho João Pedro

que entrou para a minha vida um pouco antes do início deste trabalho e assim durante nove meses assistiu aulas, participou de experimentos, leu artigos... Espero que este contato tão prematuro com o maravilhoso mundo da ciência te inspire um dia a ser um grande investigador.

Ao meu marido Tarcísio

por estar sempre ao meu lado me apoiando e me incentivando, e por todo carinho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que se faz presente em cada momento de minha vida, como um exemplo de força, solidariedade, persistência, compreensão e humildade.

Aos meus pais Edson e Célia, que sempre me apoiaram e contribuíram de diversas formas para tornar possível a realização deste trabalho.

A minha irmã Gisele, que esteve sempre presente e disposta a ajudar no que fosse necessário, aos meus irmãos Anderson e Egrison e a todos os meus familiares pelos momentos felizes e palavras de apoio que renovaram minhas forças a cada dia.

Ao meu marido Tarcísio, por todo amor, carinho, compreensão e incentivo. E ao nosso filho João Pedro que é a maior alegria de nossas vidas.

Ao Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira, pela confiança depositada e por todo o apoio fornecido para realização deste trabalho.

A Prof^a Dra. Maria Aparecida de Souza, pela alegria, pelo apoio e por estar sempre presente e disposta a ajudar.

A Prof^a Dra. Ana Paula, pela amizade, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Gustavo P. Amarante-Mendes pelo fornecimento da Anexina.

Ao Caio pela amizade e por sua colaboração fundamental.

À Rachel, Suelen e Luciano Casali pela amizade e apoio.

Aos velhos e novos amigos que conquistei no Laboratório de Imunologia, Alice, Alíria, Ana Márcia, Ana Maria, Bruno, Carol, Chico, Estael, Fernando, Juliana, Lívia, Luciano, Márcio, Marina, Michele Branca, Priscila, Sandra e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Sábio é o homem que conhece alguma coisa sobre tudo; e tudo sobre alguma coisa. O mais sábio é aquele que estuda como se fosse viver eternamente, e vive como se fosse morrer amanhã”.

Anônimo

RESUMO

Mycobacterium bovis é um membro do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, um grupo de microorganismos com a capacidade de causar tuberculose em humanos. A característica marcante das micobactérias patogênicas é a sua habilidade para sobreviver e replicar dentro do fagossomo do macrófago. A apoptose dos macrófagos infectados pode ser uma alternativa de defesa do hospedeiro, capaz de eliminar o ambiente de suporte para o crescimento da micobactéria. No presente trabalho investigamos, *in vivo*, a influência da virulência e da carga bacteriana na ocorrência da apoptose de macrófagos durante a fase inicial da infecção pulmonar experimental por *M. bovis*. Camundongos BALB/c foram infectados intratraquealmente com alta ou baixa carga das cepas virulenta (ATCC 19274) e atenuada (BCG Moreau) de *M. bovis*. Após 3 e 7 dias de infecção, avaliamos a frequência da apoptose dos macrófagos alveolares e sua correlação com o crescimento da micobactéria e com os níveis *in situ* das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 e da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Foi observado um aumento da apoptose de macrófagos após a infecção com ambas as cepas. Entretanto, a cepa virulenta induziu menos apoptose do que a cepa atenuada, sendo que, no 3^o dia houve redução da apoptose na infecção com alta carga, enquanto que no 7^o dia uma maior inibição ocorreu em baixa carga. Essa inibição da apoptose, promovida pela cepa virulenta, foi associada com o aumento da produção de IL-10, redução da produção de TNF- α e aumento da expressão de Bcl-2. Observamos ainda uma menor produção de IL-12 nos pontos de menor apoptose dos macrófagos o que reforça a hipótese de que a apoptose das células infectadas contribui para o desenvolvimento de imunidade específica contra o patógeno. Em conjunto esses dados sugerem que a cepa virulenta de *M. bovis* é capaz de modular a apoptose em um modo carga-dependente de acordo com suas necessidades de crescimento intracelular e disseminação para células adjacentes.

PALAVRAS CHAVES: Apoptose. Macrófagos. *M. bovis*. TNF- α . IL-10. Bcl-2.

ABSTRACT

Mycobacterium bovis is a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, a group of organisms with the capacity to cause tuberculosis in humans. The hallmark of pathogenic mycobacteria is their ability to survive and replicate inside macrophage phagosome. The apoptosis of macrophages infected can be a host defense alternative capable of removing the environment supporting bacterial growth. In this work we investigate, in vivo, the influences of virulence and bacterial load on the apoptosis of macrophages during the initial phase of experimental pulmonary *M. bovis* infection. BALB/c mice were infected intratracheally with high or low doses of the virulent (ATCC19274) and attenuated (BCG Moreau) strains of *M. bovis*. The frequency of apoptosis and the growth of mycobacteria in macrophages from lung tissue, and the in situ levels of the cytokines TNF- α , IL-10 and IL-12 and of the anti-apoptotic protein Bcl-2 were measured at day 3 and day 7 postinfection. An increase of macrophage apoptosis was observed after the infection with both strains, but the virulent strain induced less apoptosis than the attenuated strain. On the 3rd day of infection there was a reduction of apoptosis in the infection with high dose, whereas on the 7th day we found more inhibition in the lower dose. This inhibition of apoptosis was associated with the increased production of IL-10, reduced production of TNF- α and increases of Bcl-2. In addition, the production of IL-12 was reduced at the points of lowest apoptosis of macrophages, which suggests that the apoptosis of the infected cells contributes to the development of specific immune response against the pathogen. Our results indicate that the virulent strain of *M. bovis* is able to modulate apoptosis in a dose dependent fashion in accordance with its necessities for intracellular growth and dissemination to adjacent cells.

KEY WORDS: Apoptosis. Macrophages. *M. bovis*. TNF- α . IL-10. Bcl-2.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Bacilo da tuberculose e esquema representativo da parede celular de micobactérias do complexo <i>M. tuberculosis</i>	13
Figura 2	Inibição da fusão do fagossomo-lisossomo pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	14
Figura 3	Ativação dos macrófagos na imunidade contra micobactérias.....	15
Figura 4	Alterações celulares nos processos de apoptose e necrose	16
Figura 5	Formação dos corpos apoptóticos e sua remoção pelos fagócitos..	17
Figura 6	Vias de indução da apoptose	19
Figura 7	Análise da apoptose por citometria de fluxo.....	33
Figura 8	Número de bacilos em macrófagos infectados com baixa ou alta carga da cepa virulenta de <i>M. bovis</i> 3 e 7 dias após a infecção.....	39
Figura 9	Apoptose induzida pelo <i>M. bovis</i> 3 e 7 dias após a infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta.....	41
Figura 10	Produção de TNF- α e IL-10 após 3 e 7 dias de infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de <i>M. bovis</i>	49
Figura 11	Expressão de Bcl-2 em macrófagos do pulmão de camundongos controles e infectados com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de <i>M. bovis</i> após 3 e 7 dias de infecção.....	45
Figura 12	Produção de IL-12 após 3 e 7 dias de infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de <i>M. bovis</i>	46
Tabela 1	Porcentagem de macrófagos infectados com a cepa virulenta de <i>M. bovis</i>	37
Tabela 2	Porcentagem de macrófagos infectados com a cepa atenuada de <i>M. bovis</i>	38

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Célula apresentadora de antígenos
ATCC	American Type Culture Collection
BALB/c	Linhagem de camundongos susceptível à infecção pela micobactéria
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BR10R	Linhagem de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (B10A/Bcg ^R)- resistentes a infecção pela micobactéria
BR10S	Linhagem de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (B10A/Bcg ^S)- susceptíveis infecção pela micobactéria
BSA	Albumina de soro bovino
C57BL/6	Linhagem de camundongos susceptível à infecção pela micobactéria
DAB	Diaminobenzidina
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HE	Hematoxilina-Eosina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
i.t.	Intratraqueal
J774	Linhagem de macrófagos
KI	Inibidor de calicreína (Kallikrein inhibitor)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MOI	Multiplicidade de infecção
PBS	Salina tamponada com fosfato
PMSF	Fluoreto de fenilmetil sulfonil
PI	Iodeto de propídeo
RPMI	Meio líquido para cultura de células
SFB	Soro fetal bovino
sTNFR2	Receptor solúvel para o fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor para o fator de necrose tumoral
TMB	Tetrametilbenzidina
ZVAD-fmk	Pan-inibidor de caspase

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Epidemiologia da Tuberculose	12
1.2 O Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	13
1.3 Infecção e resposta do macrófago	14
1.4 Morte celular por apoptose	16
1.5 Apoptose durante a infecção pela micobactéria	20
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral.....	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3. METODOLOGIA	28
3.1 Animais	28
3.2 Bactérias.....	28
3.3 Infecção por via intratraqueal	29
3.4 Obtenção de células pulmonares	30
3.5 Avaliação do crescimento e disseminação da bactéria	31
3.6 Análise da apoptose de macrófagos	32
3.7 Determinação da concentração de citocinas no pulmão	34
3.8 Detecção imunohistoquímica da proteína anti-apoptótica Bcl-2	35
3.9 Análise estatística	36
4. RESULTADOS	37
4.1 Multiplicação e disseminação da micobactéria em macrófagos alveolares..	37
4.2 Efeito da alta e baixa carga bacteriana na indução da apoptose de macrófagos pelas cepas virulenta e atenuada de <i>M. bovis</i>	40
4.3 Produção de TNF- α e IL-10 no pulmão, após infecção com cepas virulenta e atenuada de <i>M. bovis</i>	42
4.4 Aumento de Bcl-2 na infecção com a cepa virulenta de <i>M. bovis</i>	44
4.5 Produção de IL-12 após a infecção com a cepa virulenta e atenuada de <i>M. bovis</i>	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXO	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da Tuberculose

A tuberculose é uma doença de importância mundial e há alguns anos, em muitos países, foi quase erradicada. No entanto, a ampliação da miséria das populações desfavorecidas, bem como, a estreita relação da doença com a pandemia do HIV, facilitaram o recrudescimento da tuberculose em todo o mundo, contribuindo também para isso o surgimento de cepas multidroga-resistentes (DYE, 2000).

A tuberculose é reconhecida como emergência global pela Organização Mundial de Saúde (OMS) desde 1993, por ser a maior causa de morte de adultos por doença infecciosa (LAVOR, 2008). Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com a micobactéria causadora da tuberculose. Aproximadamente, 5% desses infectados desenvolvem a doença ativa durante os primeiros anos após a exposição, o que representa oito milhões de novos casos e três milhões de mortes a cada ano (ROOK e HERNANDEZ, 1996; RAJA, 2004; KAUFMANN, 2008).

O Brasil, segundo a OMS, ocupa o 15º lugar entre os 22 países responsáveis por 80% do total de casos de tuberculose no mundo (RAVIGLIONE, 2003) e, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), são registrados, anualmente, 85 mil novos casos no país e cerca de 6 mil óbitos.

1.2 O Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Os bacilos que causam a tuberculose (Fig. 1A) estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por espécies altamente relacionadas. Este complexo inclui: *M. tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose humana; *M. africanum*, causador de tuberculose em humanos na África sub-Saara; *M. microti*, causadora de tuberculose em ratos; *M. bovis*, o qual infecta várias espécies de mamíferos incluindo o homem; *M. bovis BCG*, uma variante atenuada do *M. bovis* e *M. canetti*, descendente rara do *M. tuberculosis*, que causa tuberculose em humanos (COLE, 2002). Todos os membros do complexo *M. tuberculosis* apresentam crescimento lento com um tempo de duplicação de aproximadamente 24 horas. A lentidão do crescimento parece estar relacionada à absorção mais demorada de nutrientes, provavelmente devido à complexidade de sua parede celular que apresenta grande quantidade de lipídeos (BRENNAN, 2003) (Fig. 1B).

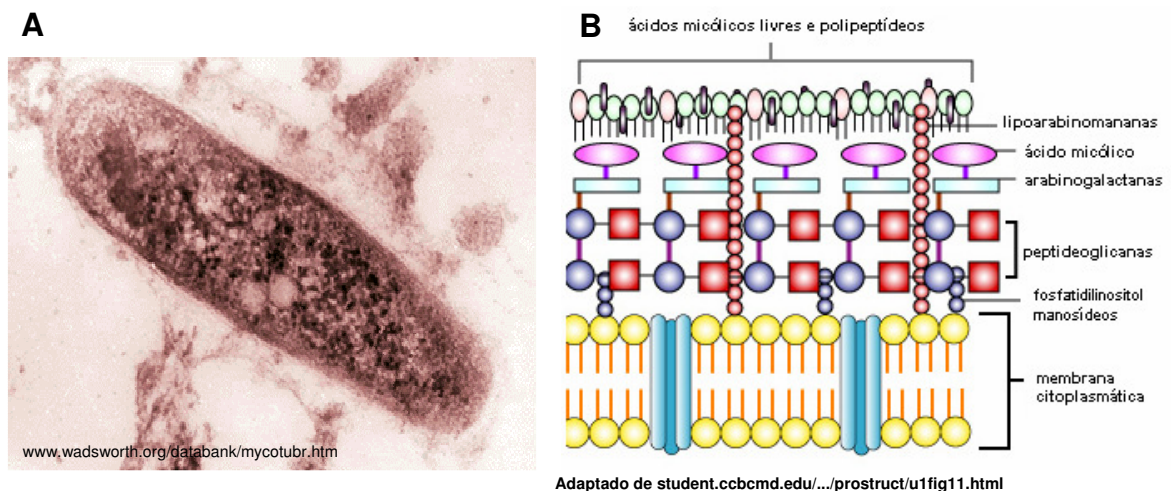


Figura 1: (A) Micrografia eletrônica de transmissão do bacilo da tuberculose. (B) Esquema representativo da parede celular de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A parede celular desses bacilos é constituída de grande quantidade de glicolipídeos. A camada de peptidoglicana está ligada a arabinogalactanas as quais estão ligadas a ácidos micólicos de alto peso molecular. Esta camada arabinogalactanas/ácido micólico é ainda coberta com uma camada de polipeptídeos e ácidos micólicos livres. Outros glicolipídeos incluem lipoarabinomananas e fosfatidilinositol manosídeos.

1.3 Infecção e resposta do macrófago

O *Mycobacterium tuberculosis*, bem como, o *Mycobacterium bovis*, são bacilos intracelulares facultativos estritamente aeróbicos, que apresentam uma predileção pelo tecido pulmonar o qual é ricamente suprimido de oxigênio. O bacilo entra no organismo principalmente pela via respiratória e a fagocitose da micobactéria pelos macrófagos alveolares é o primeiro evento na relação patógeno-hospedeiro (KAUFMANN, 1993; RAJA, 2004). Após a fagocitose, a micobactéria é retida dentro do vacúolo fagocítico e escapa da resposta imune inibindo a maturação do fagossomo e evitando sua fusão com o lisossomo (RUSSEL, 2001; KAUFMANN, 2001; WANER e MIZRAHI, 2007; AXELROD *et al.*, 2008) (Fig. 2A). Dessa forma, a micobactéria sobrevive no interior do fagossomo do macrófago mesmo depois que a imunidade mediada por células T foi estabelecida. Este ambiente endossomal protege o bacilo dos mecanismos efetores do hospedeiro e permite sua replicação. (MCDONOUGH *et al.*, 1993; SCHAIBLE *et al.*, 2003) (Fig. 2B).

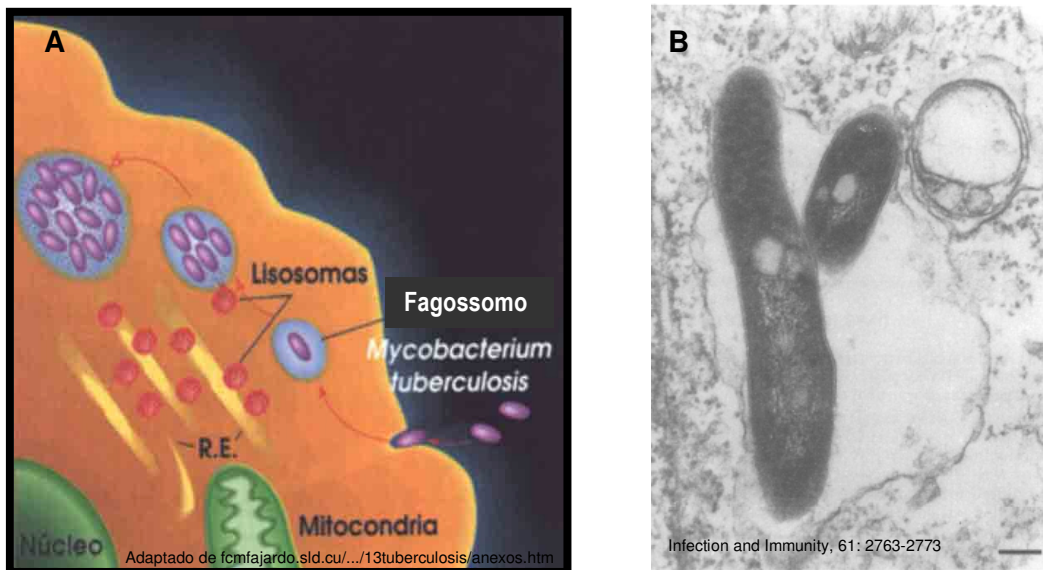


Figura 2: (A) Esquema ilustrativo mostrando a inibição da fusão do fagossomo-lisossomo pelo *Mycobacterium tuberculosis*, que sobrevive e replica-se no interior do fagossomo do macrófago. (B) Micrografia eletrônica mostrando a micobactéria (BCG) contida dentro de um vacúolo circundado por membrana. Barra 0,2 μm .

Na tuberculose a resposta do macrófago é muito importante, pois a micobactéria persiste no interior dessa célula (RUSSEL, 2003). Os macrófagos infectados promovem o recrutamento de linfócitos T $CD4^+$, os quais se diferenciam em efetores Th1 sob a influência da citocina IL-12 produzida por macrófagos e células dendríticas (DEMANGEL *et al.*, 2001). Os linfócitos Th1, por sua vez, promovem a ativação dos macrófagos principalmente através da secreção de $IFN-\gamma$. Os macrófagos ativados dispõem, então, de diversos mecanismos para tentar controlar e eliminar a bactéria intracelular, incluindo a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (FLYNN e CHAN, 2001) (Fig. 3). A ativação das células T $CD4^+$ ocorre aproximadamente 2 a 6 semanas após a infecção (RAJA, 2004). Portanto, durante os estágios iniciais da infecção, quando a imunidade específica por células T ainda não foi estabelecida, o controle da proliferação da micobactéria depende principalmente da resistência natural mediada por macrófagos (FENTON e VERMEULEN, 1996; MARTINO, 2008). Além dos mecanismos efetores inatos utilizados por essas células, tem sido demonstrado que a apoptose dos macrófagos infectados constitui uma estratégia alternativa, que pode contribuir para a defesa do hospedeiro (MOLLOY *et al.*, 1994; KEANE *et al.*, 2000; BOCCHINO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006).

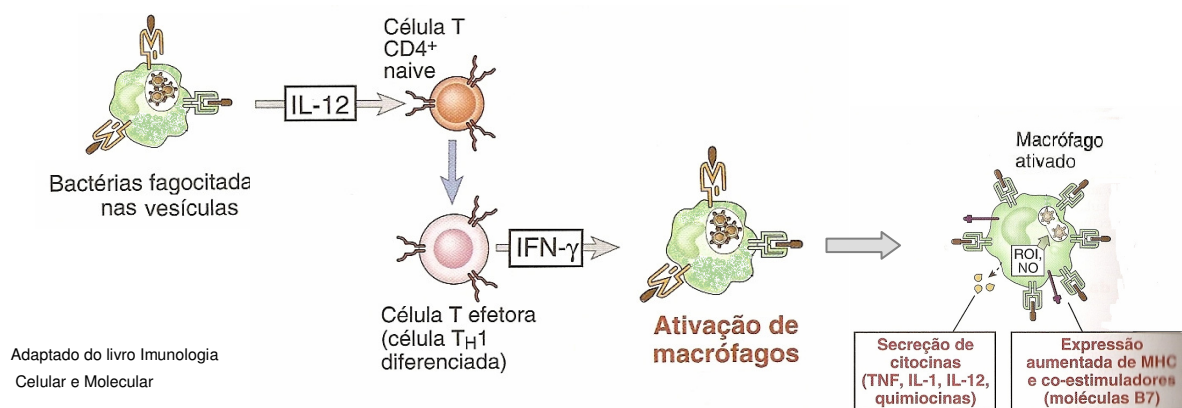


Figura 3: Ativação dos macrófagos na imunidade contra micobactérias. A IL-12, produzida por APC's estimula a diferenciação das células $TCD4^+$ naives em células T_H1 . Células T_H1 produzem $IFN-\gamma$ que aumenta a atividade microbicida dos macrófagos.

1.4 Morte celular por apoptose

A apoptose é processo de morte celular geneticamente programado e altamente controlado. Um dos aspectos marcantes da apoptose, que a distingue da necrose, é a preservação da integridade da membrana plasmática que evita a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular (Fig. 4).

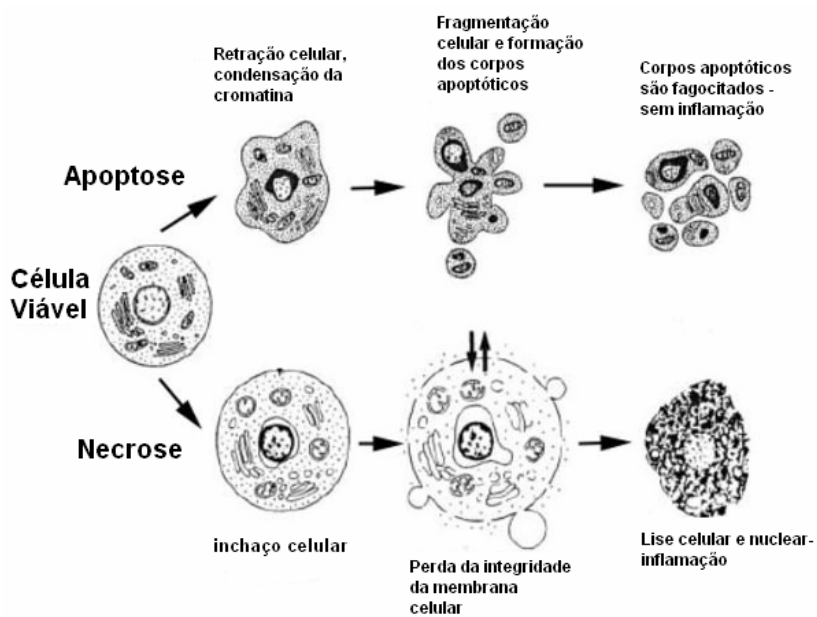
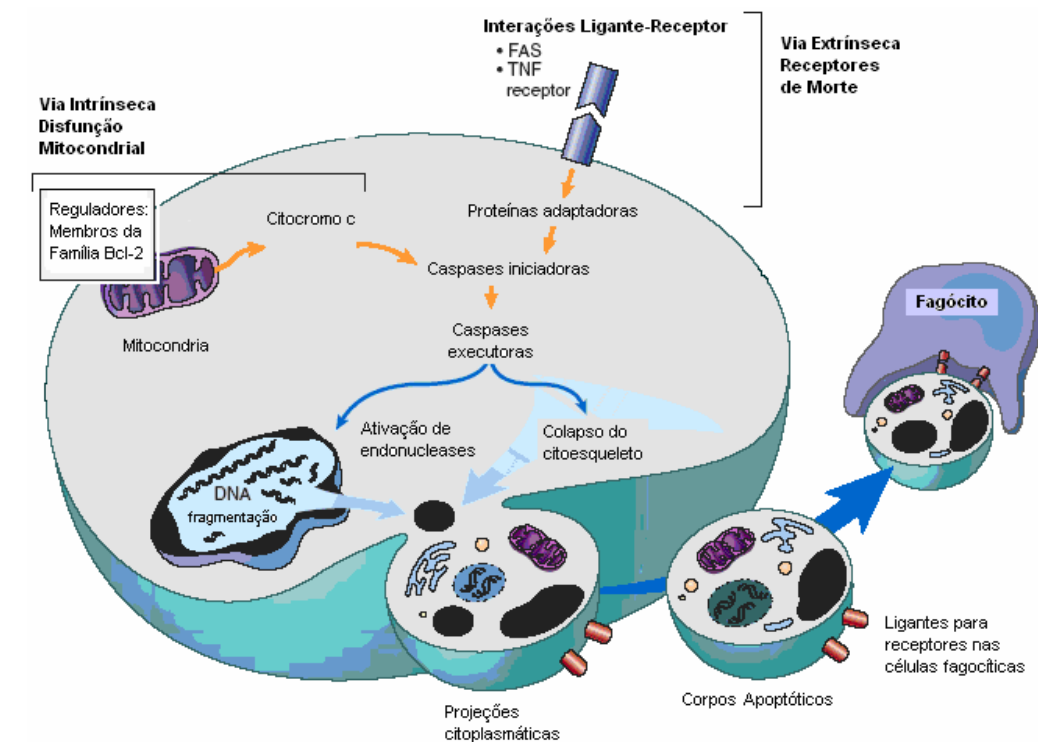


Figura 4: Diferentes alterações celulares nos processos de morte celular por apoptose e necrose. Na apoptose ocorre a preservação da membrana plasmática com formação dos corpos apoptóticos, não havendo liberação dos constituintes celulares. Na necrose há perda da integridade da membrana e lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas.

Na apoptose ocorre a ativação de proteases endógenas, conhecidas como caspases. Um dos resultados da ativação dessas cisteíno-proteases é a clivagem de proteínas estruturais, o que compromete a integridade do citoesqueleto. Ocorre contração do volume citoplasmático, formam-se projeções (blebs) na membrana celular e o posicionamento de seus lipídios constituintes é alterado. Em células viáveis a distribuição de fosfatidilserina se faz primariamente no folheto interno da membrana plasmática, mas durante o processo de apoptose esse lipídio se expõe no folheto externo da membrana. O novo posicionamento da fosfatidilserina serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os

fragmentos celulares e completam o processo de degradação. Durante a apoptose ocorrem, também, alterações características no núcleo celular graças à ativação de endonucleases que degradam o DNA em fragmentos oligonucleossomais. Por fim o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear e as projeções que se formam no citoplasma separam a célula em fragmentos circundados por membrana, denominados corpos apoptóticos, que contêm partes do núcleo e organelas intactas e são fagocitados pelos macrófagos teciduais ou células adjacentes (CREE *et al.*,1987; PAROLIN e REASON, 2001; AMARANTE-MENDES, 2003) (Fig. 5).



Adaptado do livro Pathologic Basis of Disease de Kumar, Abbas e Fausto

Figura 5: Formação dos corpos apoptóticos e sua remoção pelos fagócitos. A ativação de caspases iniciadoras pela via dos receptores de morte e/ou mitocondrial leva a ativação de caspases executoras que ativam endonucleases e proteases as quais degradam proteínas nucleares e do citoesqueleto, resultando em uma cascata de degradação intracelular, incluindo a fragmentação da cromatina nuclear e o colapso do citoesqueleto. Por fim, ocorre na formação de corpos apoptóticos contendo organelas intracelulares e outros componentes citosólicos. Estes corpos apoptóticos expressam novos ligantes para que sejam reconhecidos e englobados por células fagocíticas.

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos, através de receptores específicos localizados na superfície celular, denominados receptores de morte, ou por estímulos internos de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial. (GREEN, 1998; PAROLIN e REASON, 2001; AMARANTE-MENDES, 2003). Essas diferentes vias culminam na ativação das caspases que estão presentes no citosol sob a forma de pró-enzimas inativas, tornando-se ativas após clivagem proteolítica à altura de resíduos do ácido aspártico (Fig. 6).

Na via de sinalização pelos receptores de morte (via extrínseca) o sinal é fornecido pela interação entre o ligante e o receptor de morte (GUPTA, 2003). Grande parte dos receptores de morte pertencem à superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (TNFR) que inclui diversos receptores, entre eles o TNFR1 cujo ligante é o TNF- α . Os membros da família TNFR são caracterizados por apresentar uma porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada cadeia de morte ("death domain"), essencial para transdução intracelular do sinal apoptótico e ativação da cascata de caspases (GUPTA, 2003).

A apoptose pode também ser iniciada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial (via intrínseca), tais como lesão do DNA, estresse oxidativo e privação de fatores de crescimento. Na presença desses sinais ocorre translocação de proteínas pró-apoptóticas do citosol para mitocôndria, que alteram a permeabilização da membrana mitocondrial externa resultando na liberação do citocromo c, presente no espaço existente entre a membrana mitocondrial externa e interna. No citosol, o citocromo c associa-se ao fator ativador da apoptose 1 (APAF-1) e à pró-caspase 9 para formar um complexo conhecido como apoptossomo que, por sua vez, ativará caspases executoras, tal como a caspase 3 (HENGARTNER, 2000).

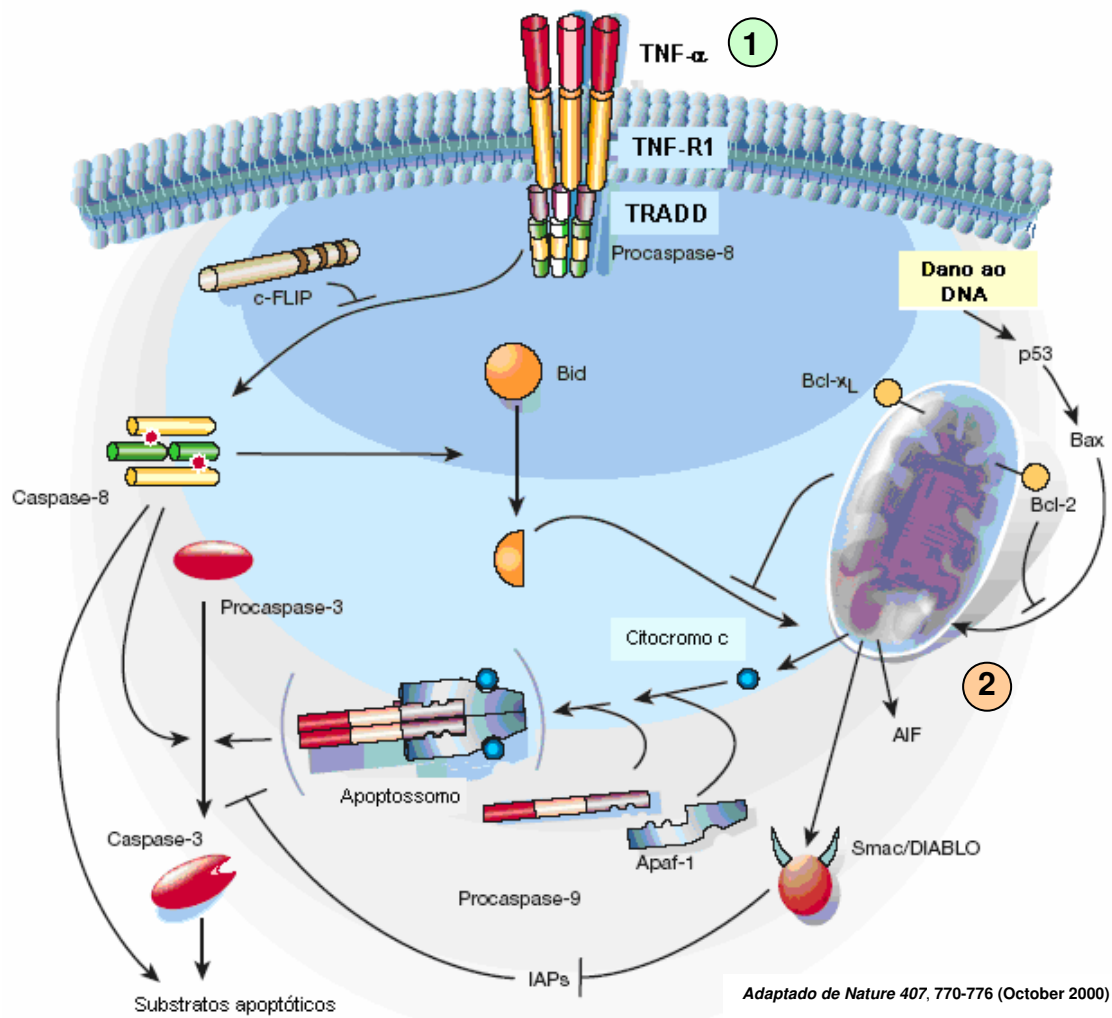


Figura 6: Vias de indução da apoptose. A via extrínseca (1) é desencadeada por membros da super-família de receptores de morte celular (tal como TNFR1 e Fas). Quando os ligantes específicos (TNF- α e FasL) se acoplam aos seus receptores, as moléculas individuais do receptor se trimerizam formando um agregado de cadeias de morte. Este permite que as mesmas se liguem a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia de morte associada ao receptor TNF (TRADD) ou ao Fas (FADD). A ligação do complexo à pró-caspase 8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (efetora). A ativação da caspase-8 pode ser bloqueada por um competidor denominado c-FILP que apresenta homologia estrutural com as caspases porém com o sítio catalítico inativo. A via intrínseca é ativada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial (tal como danos no DNA). Ocorre a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (Bax, Bid) que permitem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol e também de outras proteínas que podem interferir no processo apoptótico tais como SMAC/Diablo, AIF (Fator indutor de apoptose), IAPs (Proteínas inibidoras de apoptose). No citosol, o citocromo c associa-se com Apaf-1 (Fator ativador de apoptose 1) e pró-caspase-9, formando apoptossomo que por sua vez ativará a caspase 3. Ambas as vias de ativação da cascata de caspases culminam na clivagem de substratos específicos que levam a morte celular por apoptose.

1.5 Apoptose durante a infecção pela micobactéria

A ocorrência da apoptose durante a infecção pela micobactéria foi inicialmente demonstrada por Molloy *et al.* (1994), os quais constataram que a apoptose, mas não a necrose, de monócitos infectados reduzia a viabilidade da micobactéria, sendo sugerido por Keane *et al.* (1997) que a apoptose dos macrófagos poderia favorecer o hospedeiro por privar o patógeno de seu refúgio intracelular. A apoptose também impede a propagação da micobactéria por seqüestrar e reter o patógeno dentro dos corpos apoptóticos (FRATAZZI *et al.*, 1999). Além disso, macrófagos apoptóticos infectados podem ser fagocitados por macrófagos não infectados que, por sua vez, conseguem eliminar a micobactéria intracelular considerando que a ingestão dos bacilos contidos nos corpos apoptóticos resulta em aumento do efeito microbicida (FRATAZZI *et al.*, 1997).

Keane *et al.* (2000) em estudo *in vitro* com macrófagos alveolares humanos, testaram um painel de cepas de *Mycobacterium* de diferentes virulências e constataram que cepas virulentas tais como *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* selvagem induzem, significativamente, menos apoptose do que as cepas atenuadas *M. tuberculosis* H37Ra e *M. bovis* BCG. Verificaram ainda, que o aumento da apoptose não foi devido à alta taxa de replicação da micobactéria, pois cepas virulentas cresceram mais rapidamente do que cepas atenuadas, apesar de causarem menos apoptose nos macrófagos. Sugeriram, então, que a inibição da apoptose das células do hospedeiro é um fator de virulência associado à micobactéria, e que a apoptose dos macrófagos contribui para a imunidade na tuberculose.

A capacidade das cepas virulentas de inibir a apoptose dos macrófagos alveolares pode, razoavelmente, ser relacionada à preservação de um ambiente intracelular de suporte para o crescimento da bactéria. Inibindo a apoptose dos macrófagos, a micobactéria também evita seu aprisionamento nos corpos apoptóticos, que são submetidos à fagocitose secundária por novas células mononucleares recrutadas e conseqüentemente a um processamento microbida mais efetivo (FRATAZZI *et al.*, 1997; KEANE *et al.*, 2000).

Zhang *et al.* (2005), trabalhando com macrófagos J774 infectados com *M. tuberculosis* virulento (H37Rv) e atenuado (H37Ra), também constataram que a cepa virulenta induziu menos apoptose do que a cepa atenuada. Verificaram ainda, que bacilos da cepa virulenta foram liberados no sobrenadante da cultura em taxas maiores do que bacilos da cepa atenuada, sendo este fato simultaneamente acompanhado por aumento da necrose das células infectadas. Sugeriram então, que o crescimento mais eficiente dos bacilos da cepa virulenta pode ser melhor relacionado com a necrose do que com a apoptose, pois a necrose dos macrófagos infectados não elimina a micobactéria e ainda possibilita sua liberação para o meio extracelular.

Outro fator que parece influenciar na morte celular dos macrófagos infectados é a carga bacilar. Lee *et al.* (2006), avaliando, *in vitro*, o efeito da alta carga intracelular de *M. tuberculosis* na viabilidade dos macrófagos, verificaram que a apoptose em alto MOI (>25 bacilos/macrófago) difere notadamente da apoptose em baixo MOI (5-10 bacilos/macrófago), uma vez que é TNF- α independente e potencialmente induzida pelo *M. tuberculosis* virulento. Além disso, constataram que a apoptose em alto MOI, progride rapidamente para necrose e não reduz a

viabilidade da micobactéria e, portanto, pode constituir um mecanismo para que a bactéria escape da célula hospedeira.

Além de seu papel na imunidade inata, a apoptose de macrófagos infectados também parece contribuir para o desenvolvimento da imunidade específica contra a micobactéria, através da apresentação de antígenos. Conforme já mencionado, após a infecção do macrófago, a micobactéria inibe a fusão fagolisossomal, sobrevivendo no interior do fagossomo. Este ambiente, além de proteger o patógeno dos mecanismos efetores do hospedeiro, afasta seus antígenos das vias de processamento, o que conseqüentemente prejudica a ativação de células T (SCHAIBLE *et al.*, 2003).

Entretanto, Schaible *et al.* (2003) demonstraram que ao entrar em apoptose, macrófagos infectados com a micobactéria, liberam corpos apoptóticos contendo antígenos micobacterianos (proteínas e lipídeos). Essas vesículas apoptóticas são então fagocitadas por APCs não infectadas, incluindo células dendríticas, e dentro dessas APCs profissionais os antígenos são processados e subseqüentemente apresentados via MHC I, possibilitando, através de um mecanismo de apresentação cruzada, a ativação de células T CD8⁺. Constataram ainda que a inibição da apoptose dos macrófagos infectados, com o inibidor de caspases (ZVAD-fmk), reduzia a transferência de antígenos para as células apresentadoras, bem como a ativação de células T CD8⁺. Sugeriram então, que a apoptose dos macrófagos infectados constitui uma via alternativa para a ativação de células T CD8⁺ contra a micobactéria intracelular (SHAIBLE *et al.*, 2003).

Embora as células T CD8⁺ possam contribuir na proteção contra a micobactéria, são as células T CD4⁺ que desempenham papel crítico na imunidade contra este patógeno, o que é confirmado pela grande susceptibilidade de indivíduos HIV positivos ao *M. tuberculosis* (SELWIN *et al.*, 1989). A diferenciação das células T CD4⁺ para o fenótipo Th1 é essencial para que ocorra essa proteção (FAIRBAN, 2004; RAJA, 2004).

Yrliid *et al.* (2000) observaram, *in vitro*, que na infecção com *Salmonella typhimurium*, antígenos desta bactéria, derivados de macrófagos infectados que sofreram apoptose, foram apresentados associados a moléculas MHC-I e MHC-II após internalização dos macrófagos apoptóticos por células dendríticas. Portanto, é possível que na infecção com a micobactéria, a apresentação cruzada de antígenos micobacterianos derivados dos macrófagos apoptóticos, também possa contribuir para a ativação das células TCD4⁺ naíves através da apresentação de antígenos via MHC-II por células dendríticas. Para que células TCD4⁺ naíves se diferenciem para o fenótipo Th1, protetor na tuberculose, é necessário, além da apresentação de antígenos, a estimulação pela citocina IL-12 que é produzida por APC's.

Alguns estudos têm destacado o papel das citocinas Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Interleucina 10 (IL-10), e das proteínas da família Bcl-2 na modulação da apoptose durante a infecção pela micobactéria (KLINGLER *et al.*, 1997; ROJAS *et al.*, 1999; SLY *et al.*, 2003).

As citocinas TNF- α e IL-10 possuem efeitos opostos nas muitas funções dos macrófagos, inclusive durante a infecção por micobactérias, onde o TNF- α parece estar associado com a atividade micobactericida do macrófago enquanto a IL-10 atua inibindo as funções dos macrófagos. Em relação a apoptose induzida pela infecção, tem sido observado que o TNF- α e a IL-10 também apresentam papéis

antagônicos (ROJAS *et al.*, 1999). O TNF- α atua como promotor da apoptose, sendo que a sua produção parece ser necessária para a indução da apoptose dos macrófagos alveolares infectados com a micobactéria (KEANE *et al.*, 1997; SPIRA *et al.*, 2003). Como anteriormente destacado, a transdução de sinais através do receptor TNFR1 pode induzir a ativação de caspases, as quais são mediadoras da apoptose. Além disso, o TNF- α também aumenta a síntese de óxido nítrico (NO) em diferentes células e esta molécula pode estar associada com a indução de dano ao DNA e apoptose (MACMICKING *et al.*, 1997; CHAN *et al.*, 2001). A citocina IL-10, por sua vez, possui efeito anti-apoptótico e parece atuar principalmente na inibição do TNF- α (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al.*, 1999).

Rojas *et al.* (1999) estudando o efeito da infecção pela micobactéria em macrófagos resistentes (B10R) e macrófagos susceptíveis (B10S), constataram que macrófagos resistentes foram mais propensos a sofrer apoptose do que os susceptíveis, após a infecção com a cepa virulenta. Esta apoptose foi associada com altos níveis de produção de Óxido Nítrico (NO) pelos macrófagos resistentes. Verificaram ainda, que macrófagos resistentes produziram mais TNF- α após a infecção, e que macrófagos susceptíveis produziram mais IL-10. O bloqueio do efeito do TNF- α com anti-TNF inibiu a apoptose e reduziu a ativação de caspase-1, bem como, a produção do NO, e ainda, aumentou a expressão de Bcl-2. Já o tratamento com anti-IL-10 aumentou a apoptose e a ativação da caspase 1 e reduziu a expressão de Bcl-2.

Essas observações sugerem que alterações no balanço de TNF- α e IL-10 podem influenciar tanto nas funções efetoras e acessórias dos macrófagos como na indução da apoptose ou sobrevivência da célula, influenciando consequentemente na susceptibilidade do hospedeiro à infecção.

Outro mecanismo que pode estar envolvido na modulação da apoptose durante a infecção com a micobactéria, é a regulação da expressão de proteínas da família Bcl-2 (KLINGLER *et al.*, 1997; SLY *et al.*, 2003). As proteínas da família Bcl-2 constituem um grupo de reguladores apoptóticos que podem tanto inibir como promover a apoptose. A regulação exercida por essas proteínas ocorre, basicamente, a nível mitocondrial, uma vez que a mitocôndria guarda no espaço intermembranoso elementos, tais como o citocromo c, capazes de deflagrar o processo apoptótico (ARDJOMANDE-LUCKEN e MARTINOU, 2005).

Os membros anti-apoptóticos da família Bcl-2, localizam-se principalmente na membrana mitocondrial e inibem a morte da célula atuando na manutenção da integridade da mitocôndria e na regulação da permeabilidade de sua membrana a pequenas moléculas pró-apoptóticas (AMARANTE MENDES e GREEN, 1999). Já os membros pró-apoptóticos, são normalmente encontrados no citosol e quando ativados, translocam-se para a mitocôndria e alteram a permeabilidade de sua membrana, permitindo o extravasamento das proteínas pró-apoptóticas (PAROLIN e REASON, 2001; DLUGOSZ *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm demonstrado o aumento de expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em macrófagos infectados com cepas virulentas de micobactéria, bem como, a redução dessa proteína em macrófagos infectados com cepas atenuadas, sendo que o nível de Bcl-2 nas células infectadas parece estar diretamente relacionado com a maior virulência da cepa. Por outro lado, tem sido verificada a redução da proteína pró-apoptótica Bax em macrófagos infectados com cepas virulenta ou hipervirulenta de *M. tuberculosis* (MOGGA *et al.*, 2002; DANELISHVILI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005; RÍOS-BARRERA *et al.*, 2006).

Enfim, os mecanismos envolvidos na modulação da apoptose dos macrófagos durante a infecção pela micobactéria são complexos, e parecem incluir tanto sinais de indução como sinais de inibição da apoptose da célula hospedeira. Muitos investigadores têm focado sua atenção para tentar elucidar essas questões. Entretanto, a maioria dos estudos avaliando a importância da apoptose dos macrófagos durante a infecção pela micobactéria foram feitos *in vitro* (RÍOS-BARRERA *et al.*, 2006), permanecendo a dúvida de qual a relevância da modulação da apoptose dos macrófagos para o ciclo de replicação e disseminação da micobactéria e as conseqüências dessa modulação na resposta imune inata e adaptativa. Neste trabalho foi avaliado a influência da virulência e da carga bacteriana na ocorrência e modulação da apoptose dos macrófagos durante a fase inicial da infecção pulmonar experimental por *M. bovis* em camundongos, bem como, a sua contribuição no desenvolvimento da resposta imune específica contra a micobactéria.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in vivo*, a frequência e a modulação da apoptose dos macrófagos alveolares, durante a fase inicial da infecção pulmonar experimental pelas cepas virulenta e atenuada de *Mycobacterium bovis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da virulência da cepa de *Mycobacterium bovis* e da carga bacteriana na frequência da apoptose dos macrófagos.
- Avaliar o papel das citocinas TNF- α , IL-10 e da proteína anti-apoptótica Bcl-2 na indução/inibição da apoptose dos macrófagos, durante a infecção dos camundongos com as cepas virulenta e atenuada de *M. bovis*.
- Avaliar a contribuição da apoptose dos macrófagos para o desenvolvimento da imunidade específica contra a micobactéria.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, machos, 8-10 semanas de idade, provenientes do Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR-UFJF). Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF dentro de microisoladores acondicionados em estantes ventiladas (Alesco, Monte Mor, SP - Brasil) e receberam ração e água *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foram aprovados pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da UFJF, através do protocolo nº 019/2006-CEA.

3.2 Bactérias

Foram utilizadas duas cepas de *Mycobacterium bovis* de diferentes virulências: 1) Cepa atenuada: *M. bovis* Bacilo Calmette-Guérin (BCG) (subcepa Moreau), gentilmente cedida pela Fundação Ataúpho de Paiva e 2) Cepa Virulenta: *M. bovis* tipo selvagem (ATCC 19274), gentilmente cedida pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz/RJ). Ambas as cepas foram cultivadas em meio Lowenstein-Jensen (DIFCO Laboratories, Detroit, MI - USA) por 21 dias. Após este período, as colônias foram coletadas, agitadas vigorosamente por 5 minutos em tubo contendo pérolas de vidro estéreis e ressuspendidas em PBS estéril (Phosphate-Buffered Saline). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para 1×10^5 ou 1×10^7 bactérias em 50 μ l de PBS usando a escala padrão

de McFarland. A viabilidade do inóculo foi determinada através de diluição da suspensão e plaqueamento em meio Lowenstein-Jensen.

3.3 Infecção por via intratraqueal

Para cada experimento, os camundongos foram divididos em 5 grupos com 6 animais cada. As cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*, foram administradas sob duas cargas bacterianas 1×10^5 (baixa carga) ou 1×10^7 (alta carga) (BEKKER, *et al.*, 2000). Animais controles foram inoculados apenas com PBS. Portanto, foram constituídos os seguintes grupos:

- cepa atenuada/baixa carga
- cepa atenuada/alta carga
- cepa virulenta/baixa carga
- cepa virulenta/alta carga
- controle

Para estabelecimento da infecção pulmonar, a micobactéria foi injetada por via intratraqueal de acordo com Soares *et al.* (2003). Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,2 ml de solução anestésica contendo 0,9% NaCl, 2% xilazina e 5% ketamina. A traquéia foi exposta através de uma pequena incisão na pele e um total de 1×10^5 ou 1×10^7 bacilos em 50 μ l de PBS foram injetados usando uma microseringa de 50 μ l. A incisão na pele foi fechada com linha cirúrgica e os camundongos foram mantidos em posição vertical até o término do efeito da anestesia. Animais infectados foram colocados em gaiolas com microisoladores. Camundongos controles foram submetidos aos mesmos procedimentos recebendo como inóculo apenas 50 μ l de PBS.

3.4 Obtenção de células pulmonares

Três animais de cada grupo foram sacrificados no 3º e no 7º dias após a infecção, por superdose de anestesia (0.9% NaCl, 2% xilazina, 5% ketamina). Os pulmões foram então perfundidos por infusão de 10 ml de PBS através do ventrículo direito do coração, a fim de minimizar a contaminação por sangue. Os pulmões perfundidos foram assepticamente removidos e divididos de acordo com os diferentes objetivos. O lóbulo esquerdo do pulmão foi colocado em placa de Petri contendo meio RPMI-1640 (Sigma) contendo 10% SFB e mantidos no gelo. Logo após, foi cortado em pequenos pedaços com auxílio de um bisturi e incubado a 37°C por 40 minutos em 5 ml de RPMI contendo 2,5 mg/ml de colagenase tipo I (Gibco). Após o período de incubação, a ação da enzima foi interrompida pela adição de 10 ml de RPMI. A suspensão contendo o pulmão digerido foi filtrada através de uma tela de nylon de 70 µm (BD), sendo então transferido para um tubo plástico cônico de 50 ml. A suspensão celular foi então lavada e centrifugada a 1200 rpm/min por 10 min. Para lisar as hemácias contaminantes, as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão de lise contendo NH₄Cl 0,16 M e Tris-HCl 0,17 M pH 7,2 (9:1) e incubadas à temperatura ambiente por 5 minutos. Logo após, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspensas em RPMI e mantidas no gelo. A contagem de células viáveis do pulmão foi feita pelo método de exclusão por azul de Trypan.

3.5 Avaliação do crescimento e disseminação da bactéria

As micobactérias são bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), o que significa que durante os procedimentos de coloração pela fucsina, não se deixam descorar por uma mistura de álcool e ácido clorídrico. Esta propriedade parece ocorrer devido à firme fixação da fucsina a certos lipídeos da parede. O método para se verificar se uma bactéria é um BAAR é o de Ziehl-Neelsen. Este método consiste em se tratar o esfregaço por fucsina e, em seguida por uma mistura de álcool (97%) e ácido clorídrico (3%). Depois de lavado com água, o esfregaço é corado com azul de metileno. As bactérias que retêm a fucsina (BAAR) adquirem a cor deste corante (vermelho), e as demais estruturas celulares se coram pelo azul de metileno.

Como alternativa para mensurar o crescimento e a disseminação da micobactéria, realizou-se a coloração de Ziehl-Neelsen em lâminas preparadas por citocentrifugação das células pulmonares obtidas pela digestão enzimática. O número de macrófagos contendo a micobactéria de um total de 100 macrófagos por amostra foi registrado e o número de bacilos em cada macrófago infectado foi pontuado em 1 a 5 bacilos/macrófago, 5 a 10 bacilos/macrófago e >10 bacilos/macrófago. A partir desses dados, a porcentagem de macrófagos infectados e a porcentagem de macrófagos infectados com os diferentes números de bacilos por célula foram calculados. A ocorrência de disseminação da bactéria entre o 3^o e o 7^o dias foi verificada com base na alteração da porcentagem de macrófagos infectados entre os dois pontos (ZHANG, *et al.*, 1998).

3.6 Análise da apoptose de macrófagos

Para avaliar a frequência da apoptose dos macrófagos no pulmão dos camundongos infectados e controles, foi utilizada a técnica de detecção com Anexina-V, que permite identificar as células apoptóticas com base na exposição da fosfatidilserina. A fosfatidilserina é um aminofosfolípido normalmente presente no folheto interno da membrana plasmática que altera seu posicionamento, sendo exposto no folheto externo da membrana, logo no início da cascata apoptótica (MARTIN *et al.*, 1995). A Anexina-V, por sua vez, é uma proteína de 35 kDa com alta afinidade pela fosfatidilserina. A exposição da fosfatidilserina ocorre tanto nos estágios iniciais da apoptose como nas células em necrose. O que torna possível a diferenciação entre esses dois processos é a reação entre o iodeto de propídeo (PI) e o DNA nuclear, que ocorrerá de acordo com o estado de integridade da membrana plasmática. O PI é um corante fluorescente que cora DNA e não cruza a membrana plasmática de células viáveis ou nos estágios iniciais da apoptose, pois nestas células a integridade da membrana plasmática é mantida. Em células necróticas, ocorre a perda da integridade da membrana, que se torna permeável, permitindo assim a entrada do PI e sua reação com o DNA nuclear.

Através do uso do citômetro de fluxo com análise bivariada, é possível avaliar simultaneamente as diferentes populações de células: aquelas coradas com Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC), que mostra fluorescência verde e aquelas coradas com iodeto de propídeo (PI), que possuem fluorescência vermelha. Assim, identificam-se três populações celulares distintas: as células viáveis (ANEX V⁻/PI⁻), as células apoptóticas (ANEX V⁺/PI⁻) e as células necróticas (ANEX V⁺/PI⁺).

Após 3 e 7 dias de infecção, as células pulmonares obtidas por digestão enzimática, como anteriormente descrito, foram lavadas com 500 μ l de solução tampão de Anexina (10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 1,8 mM $CaCl_2$) e posteriormente ressuspendidas em 100 μ l de tampão Anexina contendo Anexina-V^{FITC} a uma concentração final de 1:500. A solução foi agitada suavemente e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após este período, foram adicionados em cada tubo, 400 μ l de solução tampão Anexina e 40 μ l (100 μ g/ml) de PI. As amostras foram então mantidas no gelo e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo (FacScalibur-BD). Para a população controle, foram utilizadas células não marcadas (autofluorescência), células marcadas somente com Anexina-V^{FITC} e células marcadas somente com PI. Foram adquiridas 50.000 eventos para a análise.

A população de macrófagos foi selecionada segundo suas características de tamanho (FSC = Foward Scatter) e granulosidade (SSC = Side Scatter) (Fig. 7A). Dot plot Anexina-V e PI desta população foram gerados e a porcentagem de macrófagos apoptóticos (Anexina V⁺/PI⁻) foi determinada (Fig. 7B).

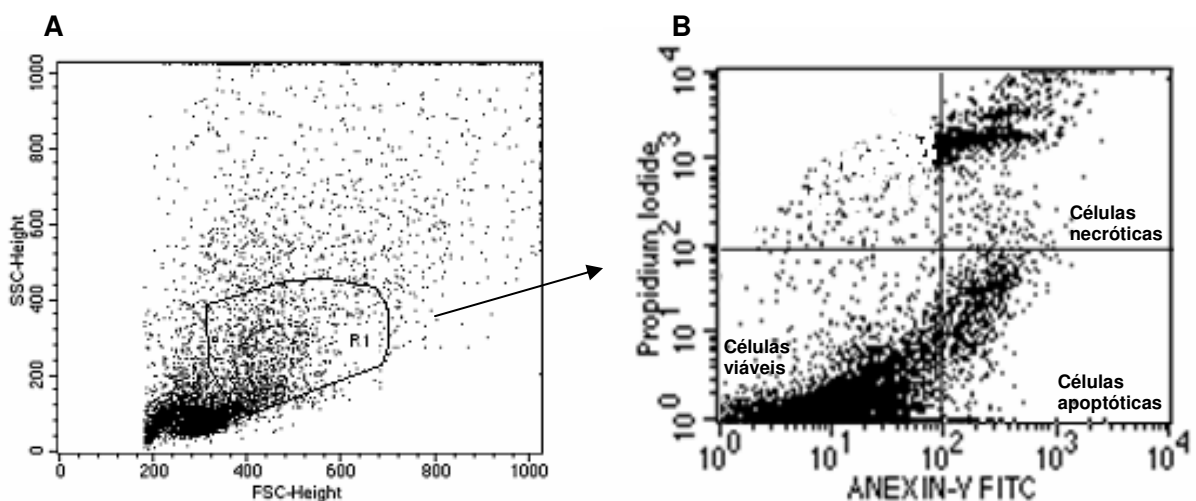


Figura 7: Análise da apoptose por citometria de fluxo. (A) Dot plot FSC/SSC das células pulmonares. A região R1 representa a população de macrófagos. (B) Dot plot AnexinaV/PI da região R1 (macrófagos).

3.7 Determinação da concentração de citocinas no pulmão

Para avaliar a correlação entre a apoptose e as citocinas produzidas no pulmão durante a infecção pelo *Mycobacterium bovis*, foi realizada a dosagem da concentração de TNF- α , IL-10 e IL-12p40 no pulmão dos animais infectados e controles, usando o método de ELISA de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (BD OptEIA, CA, USA) e conforme a técnica descrita em Soares *et al.* (2003). O lóbulo apical e o lóbulo cardíaco do pulmão foram coletados e armazenados a -20°C. Posteriormente, as amostras foram descongeladas e 100 mg de pulmão de cada animal foram homogeneizados em 1 ml de PBS-Tween 20 (0,05%) contendo antiproteases (0,1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A). As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 x g e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para posterior detecção das citocinas através da técnica de ELISA de captura, descrita a seguir.

Placas de ELISA (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF, anti-IL-10 ou anti-IL-12p40, diluídos em tampão fosfato pH 6.5 segundo as normas do fabricante (BD OptEIA, CA, USA), e incubadas por 18h a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com PBS contendo 10% SFB, por 1 hora. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e as amostras de homogeneizados de pulmão, diluídas na razão de 1:5, foram adicionadas e incubadas por 18h a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas. Em seguida o complexo detector formado pelo anticorpo de detecção biotinilado mais o conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado e as placas incubadas por mais 1 hora à temperatura

ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo TMB e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura foi realizada em leitor de placas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão, obtidas pelas diferentes concentrações das citocinas recombinantes.

3.8 Detecção imunohistoquímica da proteína anti-apoptótica Bcl-2

Para investigar o envolvimento da proteína anti-apoptótica Bcl-2 na modulação da apoptose dos macrófagos alveolares, durante a infecção pelo *Mycobacterium bovis*, foi realizada detecção imunohistoquímica dessa proteína no pulmão dos animais infectados e controles. O lóbulo diafragmático do pulmão de cada animal foi fixado em solução de formol tamponado 10% por 24 horas. Após os procedimentos rotineiros para inclusão em parafina, foram obtidos cortes de 4µm de espessura, os quais foram capturados em lâminas silanizadas e submetidos ao procedimento imunohistoquímico pelo método estreptavidina-biotina-peroxidase conforme descrito nas etapas a seguir: (1) desparafinização e rehidratação dos cortes de pulmão; (2) recuperação antigênica em forno de microondas utilizando tampão citrato 10mM, pH 6,0 por 2 ciclos de 9 minutos (3) bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ 3% por 10 minutos; (4) bloqueio de reações inespecíficas pela incubação com PBS/BSA 2% (5) incubação com anticorpo primário policlonal coelho anti-Bcl-2/camundongo (BD Biosciences Pharmigen) na diluição 1:1000 por 18h a 4°C em câmara úmida; (6) incubação com anticorpo secundário biotilado cabra anti-coelho (BD Biosciences Pharmigen) na diluição 1:200 por 30 minutos; (7)

incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase por 30 minutos à temperatura ambiente; (8) revelação utilizando-se o substrato cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 2 a 5 minutos; (9) contracoloração com Hematoxilina de Harris e (10) desidratação e montagem das lâminas.

Para quantificação dos macrófagos alveolares expressando a proteína anti-apoptótica Bcl-2, foram analisados cinco campos aleatórios (aumento x400) do pulmão de cada animal. Considerou-se marcação positiva a coloração distinta em marrom (coloração com DAB) no citoplasma celular em contraposição ao azul/violeta da contracoloração (coloração com hematoxilina). Os macrófagos positivos para Bcl-2 (citoplasma fortemente corado de marrom) e negativos (citoplasma azul) foram contados manualmente e os dados expressos em porcentagem de macrófagos positivos para Bcl-2.

3.9 Análise estatística

Os resultados aqui apresentados representam pelo menos dois experimentos independentes e foram expressos como média \pm SEM. As variáveis numéricas foram avaliadas nos diferentes grupos pelo teste de normalidade de D'Agostino & Pearson para distribuição gaussiana dos dados. Foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney para determinação das diferenças significativas entre os grupos de camundongos, com nível de significância menor que 5% ($p < 0,05$). Para todas as análises foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.00.

4 RESULTADOS

4.1 Multiplicação e disseminação da micobactéria em macrófagos alveolares

Para avaliar a multiplicação e disseminação da micobactéria, as células pulmonares obtidas por digestão enzimática foram citocentrifugadas e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen, e a porcentagem de macrófagos infectados com diferentes números de micobactéria foram calculados no 3º e 7º dias após a infecção.

Na infecção com a cepa virulenta observou-se que no 3º dia a porcentagem de macrófagos infectados foi semelhante tanto na infecção com baixa carga como na infecção com alta carga (Tabela 1). Em ambas as condições de carga bacteriana, a maioria dos macrófagos infectados continham menos de 5 bacilos (Fig. 8A). Entretanto, a porcentagem de macrófagos infectados com mais de 5 ou mais de 10 bacilos foi 5 vezes maior na infecção com alta carga (Fig. 8A).

Tabela 1: Porcentagem de macrófagos infectados com a cepa virulenta de *M. bovis*

Tempo de infecção	Baixa carga	Alta carga
3 dias	32	34
7 dias	34	50

No 7º dia de infecção com baixa carga, a porcentagem de macrófagos infectados não alterou expressivamente, subindo de 32% para 34% (Tabela 1). Constatou-se ainda que a maioria (84%) dos macrófagos infectados continha de 5 a 10 bacilos (Fig. 8B), indicando que entre o 3º e o 7º dia de infecção com baixa carga da cepa virulenta houve multiplicação, mas não disseminação da micobactéria para macrófagos adjacentes. Já na infecção com alta carga, a porcentagem de

macrófagos infectados, aumentou de 34% para 50% entre o 3^o e o 7^o dias de infecção (Tabela 1). Além disso, foi observado que a maioria (67%) dos macrófagos infectados continham mais de 10 bacilos e que 29% dos macrófagos apresentavam menos de 5 bacilos (Fig. 8B), indicando que entre o 3^o e o 7^o dias de infecção com alta carga, além da multiplicação ocorreu disseminação da micobactéria para outros macrófagos.

Na infecção com a cepa atenuada a porcentagem de macrófagos infectados foi semelhante em ambas as condições de carga bacteriana, tanto no 3^o como no 7^o dias de infecção, ficando em torno de 20% (Tabela 2) e a maioria dos macrófagos infectados continham um único bacilo.

Tabela 2: Porcentagem de macrófagos infectados com a cepa atenuada de *M. bovis*

Tempo de infecção	Baixa carga	Alta carga
3 dias	19	20
7 dias	18	21

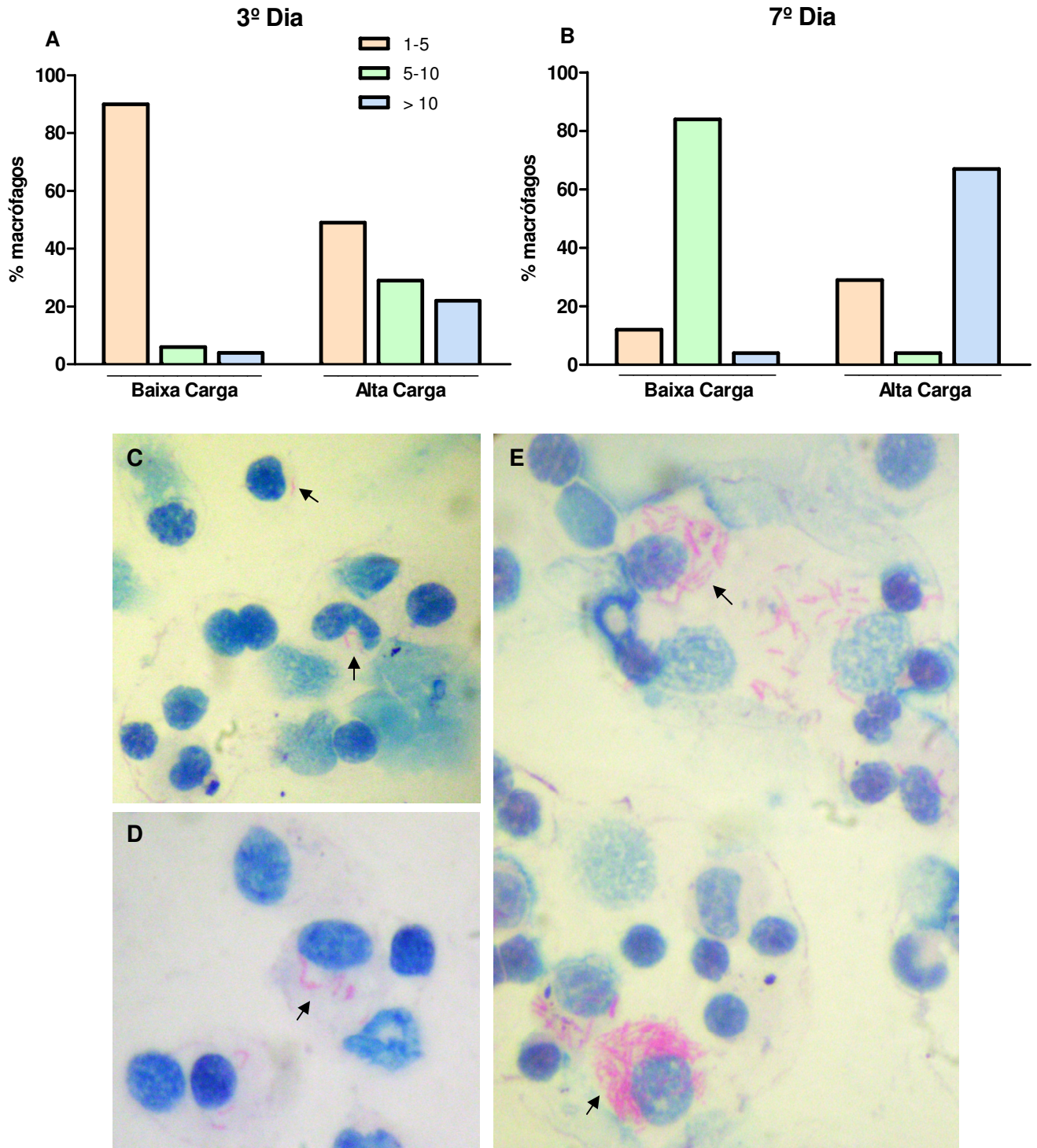


Figura 8: Número de bacilos em macrófagos infectados com baixa ou alta carga da cepa virulenta de *M. bovis* 3 (A) e 7 (B) dias após a infecção. Células pulmonares obtidas por digestão enzimática foram citocentrifugadas e coradas pelo método de Ziehl-Neelsen. Aproximadamente 100 macrófagos por amostra foram contados e o número de bacilos (setas) em cada macrófago infectado foi pontuado em 1 a 5 bacilos/macrófago (C), 5 a 10 bacilos/macrófago (D) e > 10 bacilos/macrófago (E). (C, D e E x1000)

4.2 Efeito da alta e baixa carga bacteriana na indução da apoptose de macrófagos pelas cepas virulenta e atenuada de *M. bovis*.

Para avaliar *in vivo* a influência da virulência e da carga bacteriana na frequência da apoptose dos macrófagos, camundongos foram infectados i.t. com a cepa virulenta ou com a cepa atenuada de *M. bovis*, em duas cargas bacterianas 1×10^5 (baixa carga) e 1×10^7 (alta carga). Após 3 e 7 dias de infecção, a porcentagem de macrófagos alveolares apoptóticos foi determinada por citometria de fluxo. Observou-se que nos grupos infectados com ambas as cepas de *M. bovis* ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) da apoptose dos macrófagos quando comparado aos controles não infectados, tanto no 3º dia como no 7º dia de infecção com baixa ou alta carga (Fig. 9).

Ao comparar os grupos infectados, constatou-se que em geral as taxas de macrófagos apoptóticos foram menores na infecção com a cepa virulenta quando comparado com a cepa atenuada, exceto no 3º dia de infecção com baixa carga, onde a cepa virulenta induziu mais apoptose do que a cepa atenuada, 52% e 37% respectivamente. Entretanto, no 7º dia, a taxa de macrófagos apoptóticos na infecção com a cepa virulenta reduziu para 25% enquanto que na infecção com a cepa atenuada aumentou para 56% (Fig. 9).

Analisando o efeito da carga bacilar sobre a apoptose dos macrófagos, observou-se que no 3º dia de infecção com a cepa virulenta, houve redução da apoptose na infecção com alta carga e inversamente no 7º dia uma maior inibição foi observada na infecção com baixa carga. Em conjunto esses resultados sugerem que a inibição da apoptose promovida pela cepa virulenta é carga-dependente e pode estar relacionada com seu ciclo de replicação.

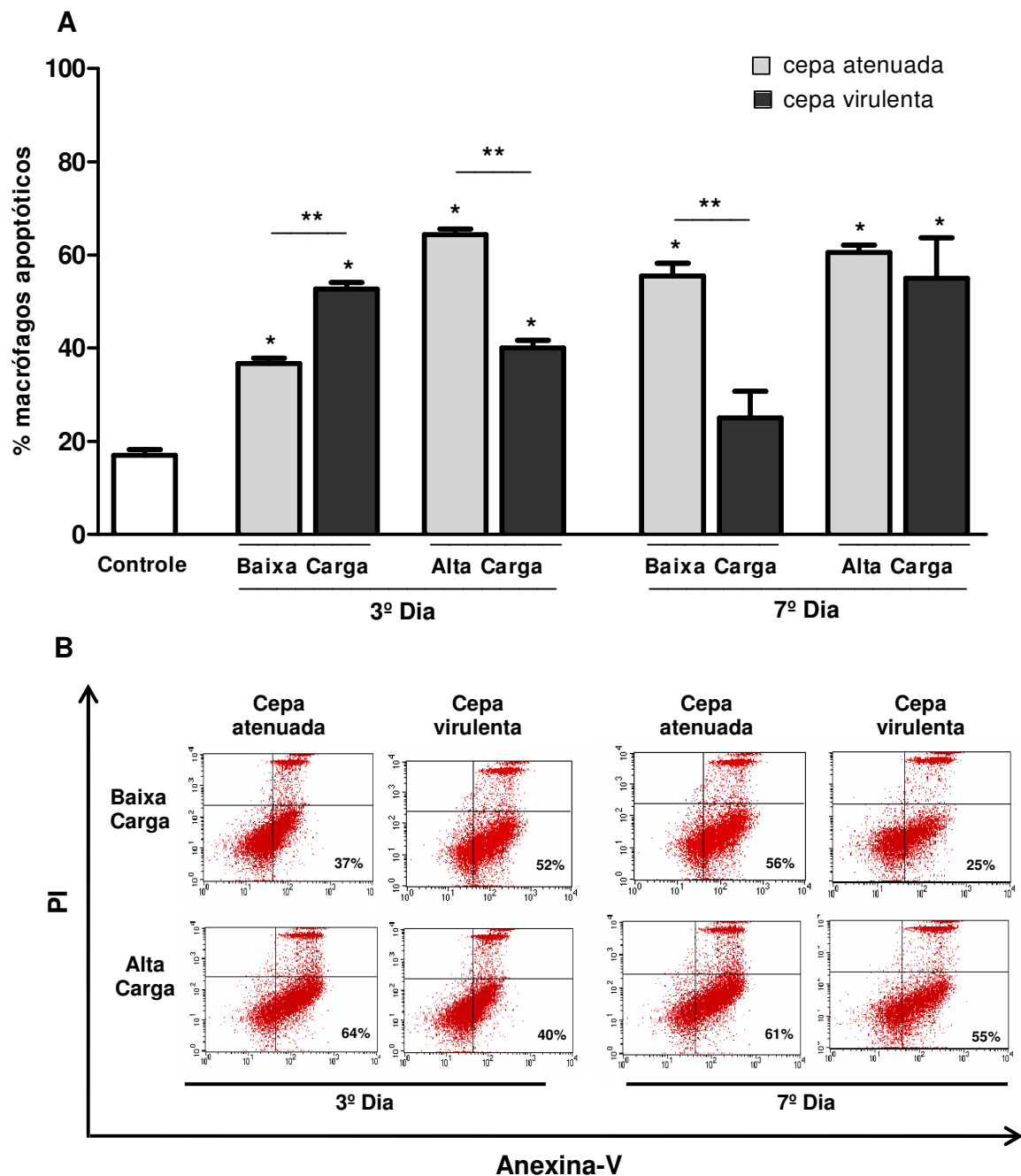


Figura 9: Apoptose de macrófagos alveolares induzida pelo *M. bovis* 3 e 7 dias após a infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*. Células pulmonares de camundongos BALB/c infectados com baixa (10^5) ou alta (10^7) carga de micobactéria atenuada (*M. bovis* BCG) e virulenta (*M. bovis* tipo selvagem) foram obtidas por digestão enzimática e marcadas com Anexina-V e iodeto de propídeo (PI) para análise através de citometria de fluxo. Macrófagos foram selecionados com base em suas características de tamanho e granulosidade. Dot plots Anexina V/PI destas populações de macrófagos foram gerados. Células plotadas no quadrante inferior esquerdo (Anexina V/PI⁻) são viáveis, no quadrante inferior direito (Anexina V⁺/PI⁻) são apoptóticas e células no quadrante superior direito (Anexina V⁺/PI⁺) são necróticas. (A) Cada barra representa a média aritmética \pm SEM de 6 camundongos e os resultados são representativos de dois diferentes experimentos. * infectado \times controle, ** cepa atenuada \times cepa virulenta, $p < 0,05$. (B) Dot plots de amostras representativas são mostrados.

4.3 Produção de TNF- α e IL-10 no pulmão, após infecção com cepas virulenta e atenuada de *M. bovis*

A fim de avaliar a participação das citocinas TNF- α e IL-10 na indução/inibição da apoptose durante a infecção pela micobactéria, foi realizada a dosagem dessas citocinas em homogeneizado do tecido pulmonar. Como mostra a figura 10A, a produção de TNF- α aumentou significativamente ($p < 0,05$) após a infecção com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*. No 3º dia de infecção com baixa carga a cepa virulenta induziu significativamente mais TNF- α do que a cepa atenuada. Inversamente, no 7º dia de infecção com baixa carga, a cepa virulenta induziu significativamente menos TNF- α do que a cepa atenuada.

Em relação a produção de IL-10, observou-se um aumento expressivo na produção dessa citocina somente na infecção com a cepa virulenta, enquanto que na infecção com a cepa atenuada o nível de IL-10 permaneceu próximo ao do controle não infectado (Fig. 10B).

Ao correlacionar a produção de TNF- α e IL-10 (Fig. 10) com as taxas de apoptose observadas no 3º e 7º dia de infecção (Fig. 9), foi constatado que, na infecção com a cepa atenuada, ocorreu aumento significativo de TNF- α mas não de IL-10 e altos índices apoptóticos foram observados. Já na infecção com a cepa virulenta, embora tenha ocorrido aumento significativo de ambas as citocinas, observou-se redução dos índices apoptóticos nos pontos onde foram registrados altos níveis de IL-10 e níveis menores de TNF- α .

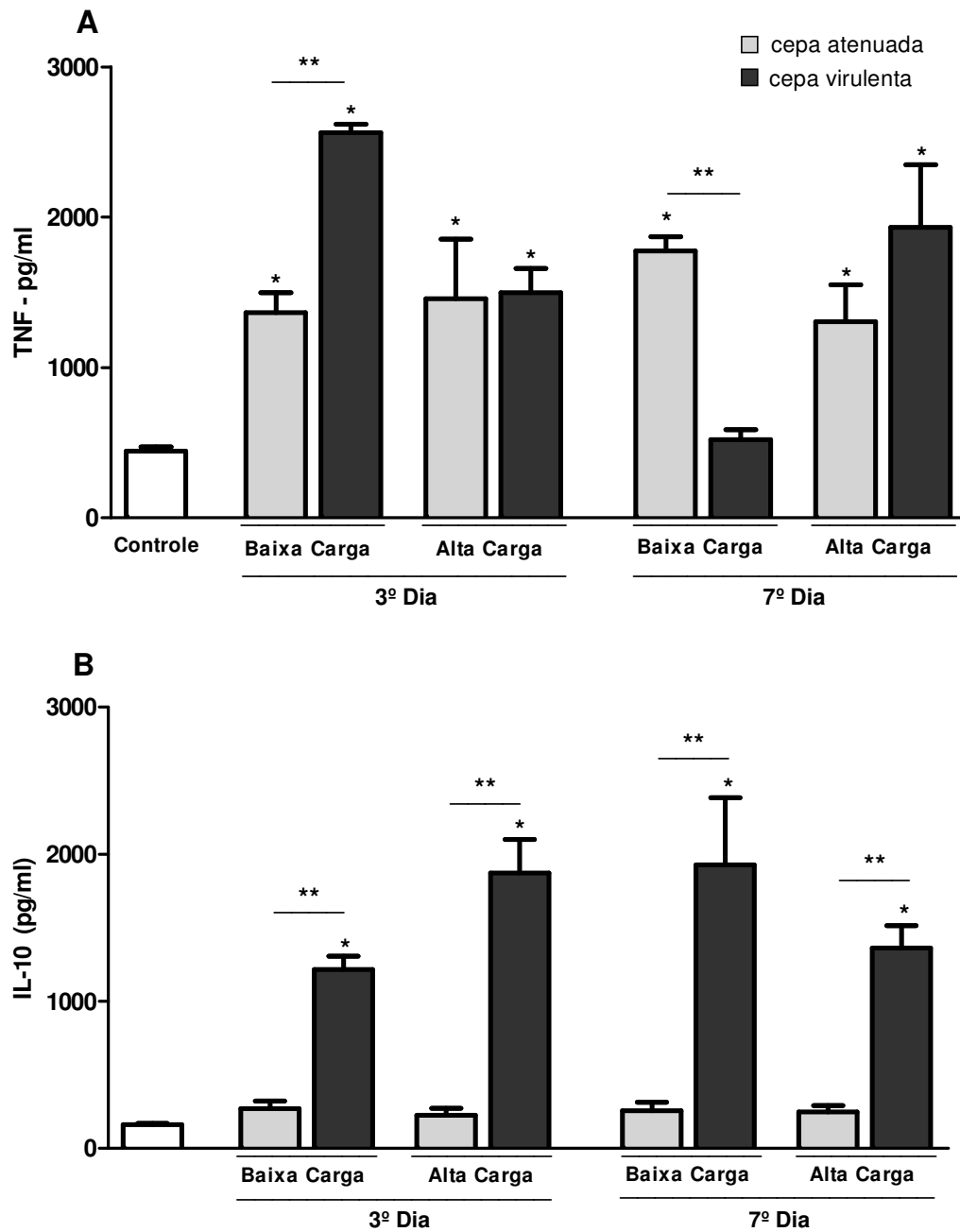


Figura 10: Produção de TNF- α (A) e IL-10 (B) após 3 e 7 dias de infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*. As citocinas TNF- α e IL-10 em homogeneizado do pulmão de camundongos infectados e controles foram mensuradas pelo método de ELISA. Cada barra representa a media aritmética \pm SEM de 6 camundongos e os resultados são representativos de dois diferentes experimentos. * infectado \times controle, ** cepa atenuada \times cepa virulenta, $p < 0,05$.

4.4 Aumento da expressão de Bcl-2 na infecção com a cepa virulenta de *M. bovis*

A expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 em macrófagos, foi avaliada no pulmão dos animais infectados e controles através de imunohistoquímica, a fim de investigar a participação dessa proteína na regulação da apoptose induzida pelo *M. bovis*. Observou-se que a expressão de Bcl-2 não foi alterada após a infecção com a cepa atenuada, mas aumentou significativamente na infecção com a cepa virulenta no 3º dia de infecção com alta carga e no 7º dia de infecção com baixa carga (Fig. 11). É interessante notar que, na infecção com a cepa virulenta, os níveis de Bcl-2 foram maiores nos pontos nos quais foram registrados níveis elevados de IL-10, sugerindo uma possível influência dessa citocina na expressão dessa proteína anti-apoptótica.

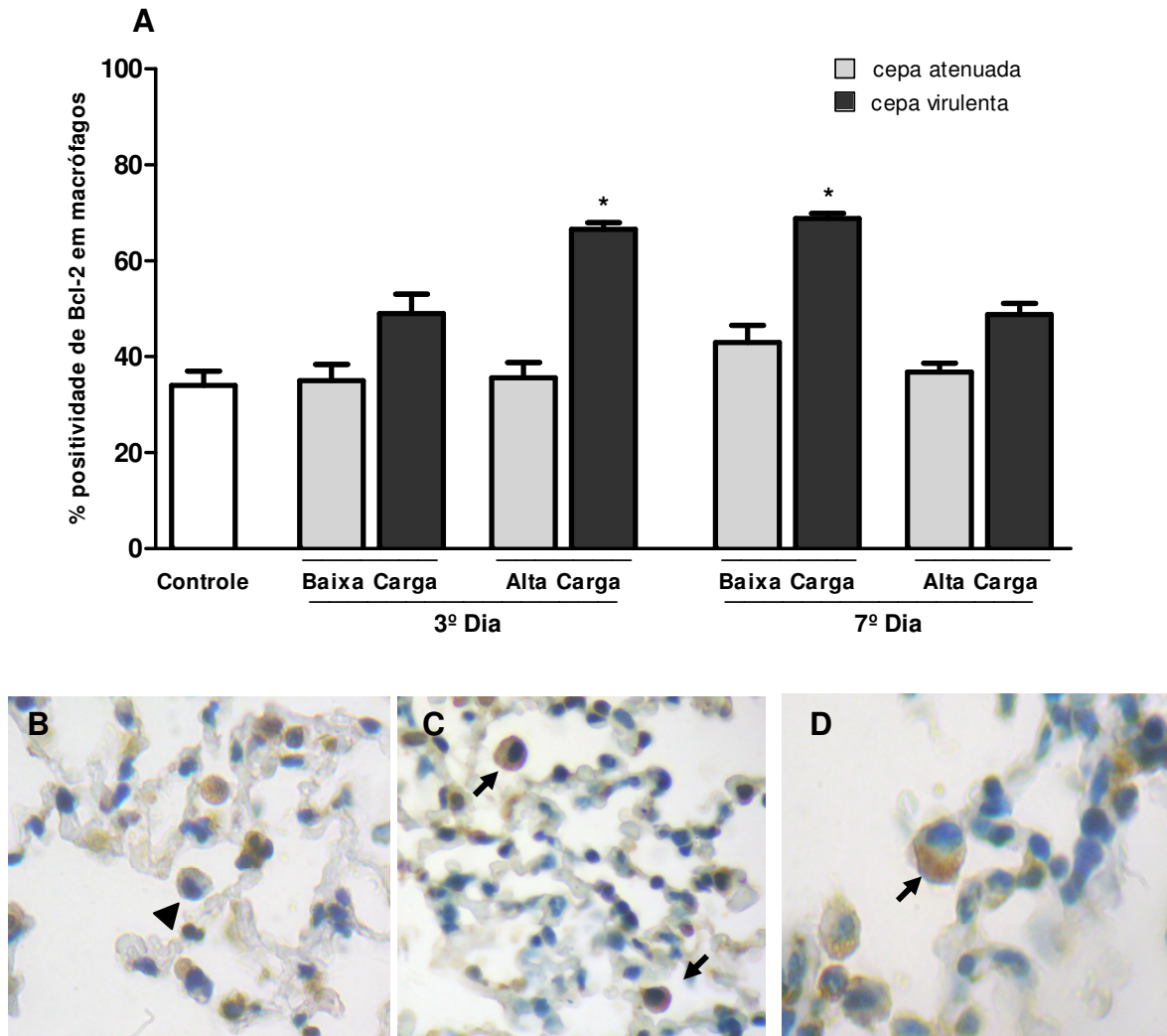


Figura 11: Expressão de Bcl-2 em macrófagos do pulmão de camundongos controles e infectados com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de *M. bovis* após 3 e 7 dias de infecção. A expressão de Bcl-2 em macrófagos alveolares foi avaliada através de imunohistoquímica. (A) Cada barra representa a média aritmética \pm SEM de 6 camundongos e os resultados são representativos de dois diferentes experimentos. * $p < 0,05$. Imunohistoquímica para Bcl-2 em seções representativas do pulmão de camundongos controles (B) e infectados (C e D). Macrófago negativo (ponta de seta) e macrófagos positivos (seta) para Bcl-2 são facilmente detectados no tecido pulmonar (X1000).

4.5 Produção de IL-12 após a infecção com a cepa virulenta e atenuada de *M. bovis*

Estudos prévios, *in vitro*, mostraram que vesículas apoptóticas de macrófagos infectados com a micobactéria estimulam a produção de IL-12 por células dendríticas (WINAU *et al.*, 2006). Portanto, a seguir foi realizada a dosagem de IL-12p40 no pulmão dos camundongos infectados e controles.

A infecção com a cepa atenuada não elevou significativamente os níveis de IL-12. Entretanto, na infecção com a cepa virulenta registrou-se aumento significativo na produção dessa citocina, exceto no 7º dia de infecção com baixa carga (Fig. 12). É interessante notar que na infecção com a cepa virulenta, a produção de IL-12 foi maior nos pontos onde foram registrados altos índices de apoptose de macrófagos e menor nos pontos onde os índices apoptóticos foram mais baixos.

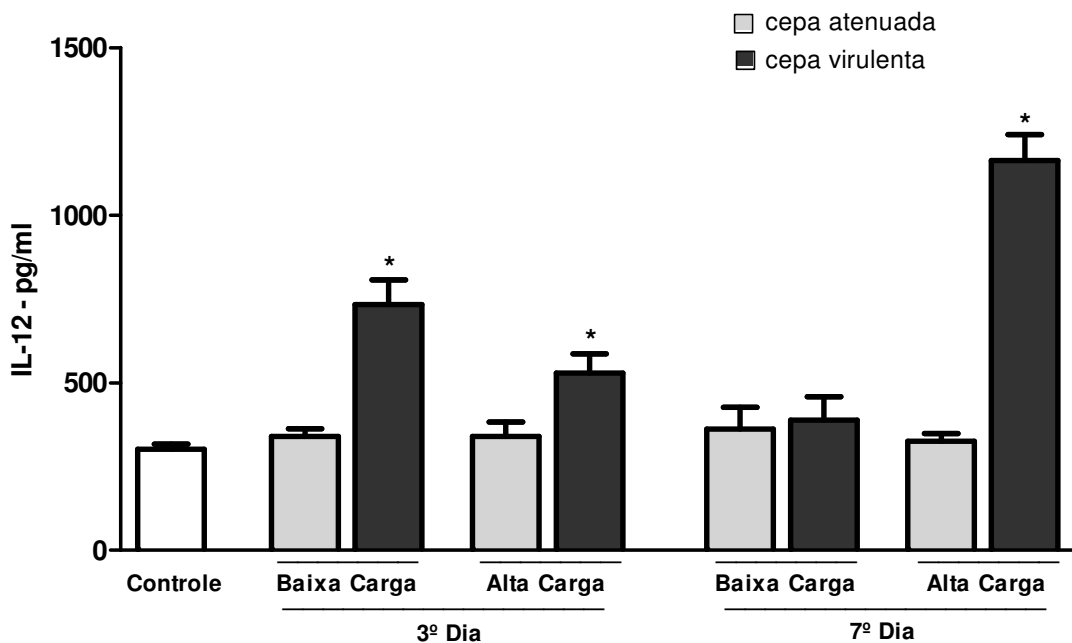


Figura 12: Produção de IL-12 após 3 e 7 dias de infecção com baixa ou alta carga das cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*. A citocina IL-12 em homogeneizado do pulmão de camundongos infectados e controles foi mensurada pelo método de ELISA. Cada barra representa a média aritmética \pm SEM de 6 camundongos e os resultados são representativos de dois diferentes experimentos. * $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi investigada, *in vivo*, a influência da virulência do *Mycobacterium bovis* e da carga bacteriana sobre a indução da apoptose de macrófagos do pulmão e sua correlação com os níveis *in situ* das citocinas TNF- α , IL-10 e IL-12 e da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Foi observado um aumento da apoptose de macrófagos no pulmão dos animais infectados em relação aos controles não infectados, indicando que a infecção com o *M. bovis* constitui um estímulo para indução da apoptose dos macrófagos. Recentes estudos sugerem que este mecanismo de morte celular pode contribuir na defesa do hospedeiro, uma vez que a apoptose do macrófago infectado significa a perda do ambiente de proteção e replicação da micobactéria (KEANE *et al.*, 2000; RIOS-BARRERA *et al.*, 2006). Foi constatado *in vitro* que a apoptose, mas não a necrose, de macrófagos infectados reduz a viabilidade da micobactéria e limita seu crescimento (MOLOY *et al.*, 1994; ZHANG *et al.*, 2005). Além disso, impede a disseminação da infecção por seqüestrar e reter o bacilo dentro dos corpos apoptóticos que são ingeridos por fagócitos não infectados e assim eliminados (FRATAZZI *et al.*, 1999).

Constatou-se *in vivo* que a cepa virulenta induziu menos apoptose de macrófagos do que a cepa atenuada, confirmando a capacidade de inibição da apoptose dos macrófagos infectados como fator de virulência associado ao *Mycobacterium* (KEANE *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi verificado pela primeira vez *in vivo* que essa modulação da apoptose promovida pela cepa virulenta foi carga-dependente, visto que, nos diferentes tempos de infecção

avaliados ocorreu uma variação das taxas apoptóticas em função da carga bacteriana.

Diferentes estudos *in vitro* forneceram evidências de que a carga bacteriana pode influenciar na apoptose de macrófagos induzida pela micobactéria. Primeiramente foi relatado que em baixo MOI (5-10 bacilos por macrófago) cepas virulentas induzem menos apoptose do que cepas atenuadas (KEANE *et al.*, 2000). Entretanto, posteriormente foi verificado que em alto MOI (≥ 25 bacilos por macrófago) a cepa virulenta apresenta igual ou maior citotoxicidade do que a cepa atenuada (LEE *et al.*, 2006). Foi constatado ainda que a apoptose em alto MOI, diferente da apoptose em baixo MOI, não reduz a viabilidade da micobactéria e progride rapidamente para necrose, permitindo a liberação e disseminação extracelular do *Mycobacterium* virulento no hospedeiro. Lee *et al.* (2006) sugeriram então, que uma vez que a infecção dos macrófagos foi estabelecida e o crescimento intracelular ótimo alcançado, a prioridade do *M. tuberculosis* virulento deve mudar para favorecer o crescimento extracelular.

Neste estudo, avaliou-se, *in vivo*, o efeito de duas cargas de bacilos em dois tempos de infecção diferentes, o que possibilitou a formulação de hipóteses sobre a relação entre quantidade de bacilos e a modulação da apoptose de macrófagos.

Os resultados obtidos sugerem que a inibição ou indução da apoptose do macrófago promovido pela cepa virulenta pode refletir suas necessidades de crescimento intracelular e saída da célula hospedeira durante a fase de replicação e disseminação inicial no hospedeiro, sendo essa inibição ou indução da apoptose estritamente dependente do número de bactérias no interior da célula. Assim, no 3º dia de infecção com baixa carga, constatou-se que a maioria dos macrófagos estavam infectados com menos de 5 bacilos e não foi observada inibição da

apoptose pela cepa virulenta, possivelmente, porque nesta condição, o número de bacilos no interior do macrófago ainda era insuficiente para promover o mecanismo de inibição. Entretanto, neste mesmo dia, na infecção com alta carga, onde a porcentagem de macrófagos infectados com mais bacilos foi maior, já se observa uma redução da apoptose dos macrófagos. No 7º dia de infecção com baixa carga foi observada maior inibição da apoptose e a predominância de macrófagos infectados com 5 a 10 bacilos, sugerindo que este seria um momento onde estaria ocorrendo grande replicação da bactéria e portanto a necessidade de prolongar a viabilidade da célula hospedeira. Em contraste, na infecção com alta carga, a maioria dos macrófagos infectados continham mais de 10 bacilos, número provavelmente suficiente para promover a disseminação da bactéria para outros macrófagos. Neste caso, é possível que os mecanismos de inibição da apoptose, atuantes quando a carga intracelular ainda é baixa, são cessados, o que explicaria o aumento das taxas apoptóticas, e conforme demonstrado por Lee *et al.* (2006) a ocorrência de necrose secundária favoreceria a saída da bactéria da célula hospedeira.

Portanto, é provável que durante a fase inicial da infecção pelo *M. bovis* virulento, quando a carga bacilar intracelular ainda é baixa, é fundamental para a micobactéria promover a inibição da apoptose dos macrófagos, pois ao manter a viabilidade dessas células o patógeno garante o ambiente intracelular para seu crescimento, que permitirá uma replicação intracelular mais prolongada. Entretanto, quando a carga bacilar intracelular torna-se suficientemente alta, o que pode ser atingido após um determinado período de replicação, a prioridade do bacilo passa a ser a disseminação extracelular. Neste momento, uma morte celular apoptótica com rápida progressão para necrose serve como um mecanismo de escape da

micobactéria, já que na necrose, diferente da apoptose, a integridade da membrana celular não é mantida.

A participação das citocinas TNF- α e IL-10 na modulação da apoptose induzida pela micobactéria tem sido demonstrada *in vitro* (ROJAS *et al.*, 1999; SPIRA *et al.*, 2003; ARCILA *et al.*, 2007). Neste estudo, observou-se *in vivo* que a indução da apoptose dos macrófagos foi associada a maior produção de TNF- α , enquanto a inibição foi dependente do aumento da produção de IL-10. Foi constatado que sempre que o aumento da produção de TNF- α foi maior do que o de IL-10, o que ocorreu principalmente nos grupos infectados com a cepa atenuada, houve uma maior indução de apoptose. Inversamente quando a produção de IL-10 aumentou e a de TNF- α reduziu, observou-se uma tendência de inibição da apoptose dos macrófagos. A maior inibição da apoptose, na infecção com a cepa virulenta, ocorreu justamente no ponto onde foi observado aumento significativo de IL-10, mas não de TNF- α . Em conjunto esses resultados reforçam a hipótese de que o balanço na produção de TNF- α e IL-10 influencia a indução ou inibição da apoptose de macrófagos durante a infecção pela micobactéria (ROJAS *et al.*, 1999), sendo que o aumento da produção de IL-10 promovido pela cepa virulenta, pode representar um mecanismo chave para promover a inibição da apoptose dos macrófagos.

Consistente com os resultados obtidos neste trabalho, Balcewicz-Sablinska *et al.* (1998) constataram, *in vitro*, que a cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv induziu maior produção de IL-10 do que a cepa atenuada H37Ra e que apesar de ambas as cepas induzirem níveis comparáveis de TNF- α , a bioatividade do TNF- α foi reduzida na infecção com H37Rv. Posteriormente, sugeriu que a IL-10 reduz a apoptose dos macrófagos através da inibição da produção de TNF- α e por induzir a

liberação de sTNFR2, o qual leva a inativação do TNF- α (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al.*, 1999). Esses autores verificaram ainda que inibição significativa da produção de TNF- α pela IL-10 produzida endogenamente começou 12 horas após a infecção dos macrófagos, possivelmente porque a produção de IL-10 inicia-se aproximadamente 8 horas mais tarde do que a produção de TNF- α .

O efeito anti-apoptótico da IL-10 pode ter sido exercido não só pela inibição e inativação de TNF- α , mas também pelo aumento da expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, pois, conforme observado, o nível de expressão dessa proteína aumentou na infecção com a cepa virulenta nos pontos onde foi observada maior produção de IL-10. Em contraste, na infecção com a cepa atenuada, a expressão de Bcl-2 permaneceu em nível basal semelhante ao observado em relação à produção de IL-10. O aumento da expressão de Bcl-2 após a infecção com a cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) também foi constatado por outros autores (MOGGA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2005; RIOS-BARRERA *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrada que a IL-10 é capaz de aumentar a expressão de Bcl-2, impedindo a apoptose espontânea de células T (COHEN *et al.*, 1997) e de células B dos centros germinativos. (LEVY e BROUET, 1994). Além disso, Rojas *et al.* (1999) relatou que o tratamento com anti-IL-10 reduziu a expressão de Bcl-2 em macrófagos resistentes (BR10) infectados com *M. tuberculosis* virulento.

Além de sua importância na imunidade inata, a apoptose de macrófagos infectados também parece contribuir para o desenvolvimento da imunidade específica contra a micobactéria, pois foi demonstrado que ao entrar em apoptose, macrófagos infectados liberam corpos apoptóticos contendo antígenos micobacterianos que são fagocitados por células dendríticas não infectadas, processados e subseqüentemente apresentados via MHC I, possibilitando através

de um mecanismo de apresentação cruzada, a ativação de células T CD8⁺ (SHAIBLE *et al.*, 2003; WINAU *et al.*, 2005).

No presente trabalho, para avaliar se a apoptose dos macrófagos infectados também pode contribuir para a ativação de linfócitos T CD4⁺, foi realizada a dosagem de IL-12p40 no pulmão. Esta citocina é produzida por APC's quando estão apresentando antígenos a células T, sendo essencial para a polarização da resposta de linfócitos T CD4⁺ para o perfil T_H1, protetor contra micobactérias (DEMANGEL *et al.*, 2001; HICKMAM *et al.*, 2002). Constatou-se que a produção de IL-12 aumentou significativamente somente na infecção com a cepa virulenta. Além disso, notou-se que a produção dessa citocina foi menor nos pontos onde os índices de macrófagos apoptóticos foram mais baixos e maior nos pontos de maior apoptose, sugerindo que a apoptose dos macrófagos infectados com *M. bovis* também pode contribuir para a produção de IL-12, favorecendo a ativação e desenvolvimento de células Th1.

Recentes estudos têm demonstrado que, em resposta a infecção com o *M. tuberculosis*, células dendríticas liberam grandes quantidades de IL-12, enquanto que em macrófagos a secreção dessa citocina é limitada, sendo sugerido que a IL-10 é responsável por essa falha na produção de IL-12 por macrófagos (HICKMAM *et al.*, 2002; POMPEI *et al.*, 2007). Além disso, foi demonstrado que células dendríticas são as principais APCs responsáveis pela apresentação cruzada de antígenos associados aos corpos apoptóticos de macrófagos infectados com a micobactéria (SHAIBLE *et al.*, 2003; WINAU *et al.*, 2004). Essas células produzem quantidades significativas de IL-12 quando em contato com essas vesículas apoptóticas, sendo essa produção diretamente proporcional à quantidade de vesículas disponíveis (WINAU *et al.*, 2006). Então, com base nos resultados aqui encontrados, pode-se especular que uma porção significativa da IL-12, detectada no pulmão dos animais

infectados com a cepa virulenta de *M. bovis*, foi produzida por células dendríticas durante a apresentação cruzada de antígenos derivados de vesículas apoptóticas, visto que a produção dessa citocina não foi anulada pela IL-10 e foi estimulada pela ocorrência da apoptose dos macrófagos. Portanto, é possível que a inibição da apoptose dos macrófagos promovida pela cepa virulenta de *M. bovis*, reduza a apresentação cruzada de antígenos e conseqüentemente a produção de IL-12, prejudicando a ativação e diferenciação de células T CD4⁺ para o perfil Th1.

Consistente com esses resultados, Shaible *et al.* (2003), ao demonstrar o papel da apoptose na ativação de células T CD8⁺, observaram *in vitro* que a inibição da apoptose dos macrófagos infectados após tratamento com o inibidor de caspases Zvad-fmk, reduzia a transferência de antígenos para as células apresentadoras, bem como a ativação de células T CD8⁺.

Na infecção com a cepa atenuada, não foi observado elevação significativa da produção de IL-12. Outros já haviam descrito que a capacidade para expressar IL-12 em resposta ao BCG é deficiente em camundongos BALB/c quando comparados com C57Bl/6, embora ambas as cepas exibam fenótipo de susceptibilidade ao BCG (YOSHIDA *et al.*, 1995).

6 CONCLUSÃO

1. A infecção pulmonar com *M. bovis* constitui um estímulo para a indução da apoptose de macrófagos alveolares;
2. A cepa virulenta parece dispor de estratégias para modular essa apoptose. Ao inibir a apoptose ela favorece sua replicação intracelular ao prolongar a sobrevivência da célula hospedeira. Após um período de replicação e crescimento intracelular suficiente, essa inibição parece ser cessada e neste cenário a ocorrência da apoptose pode favorecer a saída da bactéria da célula hospedeira e disseminação para células adjacentes;
3. O aumento da produção de IL-10 é fundamental para promover a inibição da apoptose do macrófago. A IL-10 parece atuar inibindo o fator pró-apoptótico TNF- α e estimulando o fator anti-apoptótico Bcl-2.
4. A redução da produção de IL-12 nos pontos de menor apoptose dos macrófagos reforça a hipótese de que a apoptose das células infectadas contribui para a apresentação de antígenos e desenvolvimento de resposta específica frente à micobactéria.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE-MENDES, G.P., GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32:1053-1061, 1999.

AMARANTE-MENDES, G.P. Apoptose: Programa molecular de morte celular. **Einstein**, 1:15-18, 2003.

ARCILA, M.L., SÁNCHEZ, M.D., ORTIZ, B., BARRERA, L.F., GARCIA, L.F., ROJAS, M. Activation of apoptosis but no necrosis during *Mycobacterium tuberculosis* infection correlated with decreased bacterial growth: role of TNF- α , IL-10, caspases and phospholipase A2. **Cell. Immunol.**, 249:80-93, 2007.

ARDJOMANDE-LUCKEN, S., MARTINOU, J. C. Regulation of Bcl-2 proteins and of the permeability of the outer mitochondrial membrane. **C. R. Biologies**, 328:616-631, 2005.

AXELROD, S., OSCHKINAT, H., ENDERS, J., SCHLEGEL, B., BRINKMANN, V., KAUFMANN, S.H.E., HAAS, A., SCHAIBLE, U. E. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. **Cell. Microbiol.**, 10:1530-1545, 2008.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M., KEANE, J., KORNEFELD, H., REMOLD, H. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . **J. Immunol.**, 161:2636-264, 1998.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K., GAN, H., REMOLD, H.G. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria induced apoptosis by reduction of TNF- α activity. **J. Infect. Dis.**, 180:1230-1237, 1999.

BEKKER, L.G., MOREIRA, A.L., BERGTOLD, A., FREEMAN, S., RYFFEL, B., KAPLAN, G. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. **Infect. Immun.**, 68:6954-6961, 2000.

BOCCHINO, M., GALATI, D., SANDUZZI, A., COLIZZI, V., BRUNETTI, E., MANCINO, G. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, 9:375-383, 2005.

BRENNAN, P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, 83:91-97, 2003.

CHAN, E.D., CHAN, J.S., SCHLUGER, N.M. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge. **Am J Respir. Cell. Mol. Biol.**, 25:606-612, 2001.

COHEN, S.B.A., CRAWLWY, J.B., KAHAN, M.C., FELDMANN, M., FOXWELL, M.J. Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2. **Immunology**, 92:1-5, 1997.

COLE, S.T., Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Microbiology**, 148:2919-2928, 2002.

CREE, I. A., NURBHAI, S., MILNE, G. BECK, J. S. Cell death in granulomata: the role of apoptosis. **J. Clin. Pathol.**, 40:1314-1319, 1987.

DANELISHVILI, L., MCGARVEY, J., LI, Y.J., BERMUDEZ, L.E. *Mycobacterium tuberculosis* infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. **Cell. Microbiol.**, 5:649-660, 2003.

DELAMARE, L., HOLCOMBE, H., MELLMAN, I. Presentation of exogenous antigens on major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II molecules is differentially regulated during dendritic cell maturation. **J. Exp. Med.**, 198:111-122, 2003.

DEMANGEL, C., PALENDIRA, U., FENG, C. G., HEATH, A. W., BEAN, A. G. D., BRITTON, W. J. Stimulation of Dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect. Immun.**, 69:2456-2461, 2001.

DLUGOSZ, P.J., BILLEN, L.P., ANNIS, M.G., ZHU, W., ZHANG, Z., LIN, J., LEBER, B., ANDREWS, D.W. Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. **EMBO J.**, 25:2287-2296, 2006.

DYE, C. Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination. **Int. J. Tubercu Lung Dis.**, 4:146-152, 2000.

FAIRBAIRN, I.P. Macrophages apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. **Biochem. Soc. Trans.**, 32:496-197, 2004.

FENTON, M.J., VERMEULEN, M.W. Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. **Infect. Immun.**, 64:683-691, 1996.

FLYNN, J. L., CHAN, J. Immunology of tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, 19:93-129, 2001.

FRATAZZI, C., ARBEIT, R.D., CARINI, C., REMOLD, H.G. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. **J. Immunol.**, 158:4320-4327, 1997.

FRATAZZI, C., ARBEIT, R.D., CARINI, C., BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K., KEANE, J., KORNFELD, H., REMOLD, H.G. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. **J. Leukoc. Biol.**, 66:763-764, 1999.

FULTON, A.S., MARTIN, T.D., REDLINE, R.W., BOOM, W.H. Pulmonary immune responses during primary *Mycobacterium bovis* - Calmette-Guerin bacillus infection in C57Bl/6 mice. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, 22:333-343, 2000.

GREEN, D.R., REED, J.C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, 281:1309-1312, 1998.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). **Inter. J. Oncol.**, 22:15-23, 2003.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407: 770-777, 2000.

HICKMAN, S.P., CHAN, J., SALGAME, P. *Mycobacterium tuberculosis* induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. **J. Immunol.**, 168:4636-4642, 2002.

KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular bacteria. **Annu. Rev. Immunol.**, 11:129-163, 1993.

KAUFMANN, S. H. E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat. Rev. Immunol.**, 1:20-30, 2001.

KAUFMANN, S.H.E. Tuberculosis: Deadly combination. **Nature**, 453:295-296, 2008.

KEANE, J., BALCEWICZ-SABLINSKA, M.K., REMOLD, H.G., CHUPP, G.L., MEEK, B.B., FENTON, M.J., KORNFELD, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect. Immun.**, 65:298-304, 1997.

KEANE, J., REMOLD, H.G., KORNFELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **J. Immunol.**, 164:2016-2020, 2000.

KLINGLER, K., TCHOU-WONG, K., BRANDLI, O., ASTON, O., KIM, R., CHI, C., ROM, W. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, 65:5272-5278, 1997.

LAVOR, A. Tuberculose: Ainda uma doença negligenciada. **RADIS**, 69: 18-20, 2008.

LEE, J., REMOLD, H.G., IEONG, M.H., KORNFELD, H. Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. **J. Immunol.**, 176:4267-4274, 2006.

LEVY, Y., BROUET, J.C. Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. **J. Clin. Invest.**, 93:424-428, 1994.

MACMICKING, J.D., NORTH, R.J., LACOURSE, R., MUDGETT, J.S., SHAH, S.K., NATHAN, C.F. Identification of nitric oxide synthase as a protected locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94:5243-5248, 1997.

MARTIN, S. J., REUTELINGSPERGER, C. P. M., McGAHON, A. J., RADER, J. A., SCHIE, R. C. A. A., LaFACE, D. M., GREEN, D. R. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **J. Exp. Med.**, 182:1545-1556, 1995.

MARTINO, A. Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. **J. Biosci.**, 33:137-144, 2008.

MCDONOUGH, K.A., KRESS, Y., BLOOM, B.R. Pathogenesis of Tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. **Infect. Immun.**, 61:2763-2773, 1993.

MOGGA, S.J., MUSTAFA, T., SVILAND, L., NILSEN, R. Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Scand. J. Immunol.**, 56:383-391, 2002.

MOLLOY, A., LAOCHUMROONVORAPONG, P., KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. **J. Exp. Med.**, 180:1499-1509, 1994.

PAROLIN, M.B., REASON, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arq. Gastroenterol.**, 38:138-144, 2001.

POMPEI, L., JANG, S., ZAMLYNNY, B., RAVIKUMAR, S., MCBRIDE, A., HICKMAN, S. P., 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.**, 178:5192-5199, 2007.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J. Med. Res.**, 120:213-232, 2004.

RAVIGLIONE, M.C. The TB epidemic from 1992 to 2002. **Tuberculosis**, 83:4-14, 2003.

RÍOS-BARRERA, A.V.R., CAMPOS, V.P., AGUILAR, D.L., LASCURAIN, R.L., MERAZ, M.A.R., MORENO, J., FIGUEROA, V.G., HERNANDEZ-PANDO, R. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. **Eur. J. Immunol.**, 36:345-353, 2006.

ROJAS, M., OLIVIER, M., GROS, P., BARRERA, L. F., GARCÍA, L.F. TNF- α and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. **J. Immunol.**, 162:6122-6131, 1999.

ROOK, G.A.W., HERNANDEZ-PANDO, R. The pathogenesis of tuberculosis. **Annu Rev Microbiol.**, 50:259-284, 1996.

RUSSELL D.G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nat. Rev. Molec. Cell. Biol.**, 2:1-9, 2001.

RUSSELL, D.G. Phagosomes, fatty acids and tuberculosis. **Nat. Cell Biol.**, 5:776-778, 2003.

SCHAIBLE, U.E., WINAU, F., SIELING, P.A., FISCHER, K., COLLINS, H.L., HAGENS, K., MODLIN, R.L., BRINKMANN, V., KAUFMANN, S.H.E. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. **Nat. Med.**, 9:1039-1046, 2003.

SELWIN, P.A., HARTEL, D., LEWIS, V. A., SCHOENBAUM, E.E., VERMUND, S.H., KLEIN, R.S., WALKER, A.T., FRIEDLAND, G.H. A prospective study of risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. **N. Engl. J. Med.**, 320:545-550, 1989.

SLY, L.M., HINGLEY-WILSON, S.M., REINER, N.E., MCMASTER, W.R. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **J. Immunol.**, 170:430-437, 2003.

SOARES, A.C., SOUZA, D.G., PINHO, V., VIEIRA, A.T. , BARSANTE, M.M., NICOLI, J. R., TEIXEIRA, M. Impaired host defense to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice treated with the PDE4 inhibitor rolipram. **Brit. J. Pharmacol.**, 140:855-862, 2003.

SPIRA, A., CARROL, J.D., LIU, G., AZIZ, Z., SHAH, V., KORNFELD, H., KEANE, J. Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. A pivotal role for Tumor Necrosis Factor. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 29:545-551, 2003.

WARNER, D.F. e MIZRAHI, V. The survival Kit of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature Medicine**, 13:282-284, 2007.

WINAU, F., KAUFMANN, S.H.E., SCHAIBLE, U.E. Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. **Cell. Microbiol.**, 6:599-607, 2004.

WINAU, F., HEGASY, G., KAUFMANN, S.H.E., SCHAIBLE, U.E. No life without death – apoptosis as prerequisite for T cell activation. **Apoptosis**, 10:707-715, 2005.

WINAU, F., WEBER, S., SAD, S., DIEGO, J., HOOPS, S.L., BREIDEN, B., SANDHOFF, K., BRINKMANN, V., KAUFMANN, S.H.E., SCHAIBLE, U.E. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, 24:105-117, 2006.

YRLID, U., WICK, M.J. Salmonella-induced apoptosis of infected macrophages results in presentation of a bacteria-encoded antigen after uptake by bystander dendritic cells. **J. Exp. Med.**, 191:613-624, 2000.

YOSHIDA, A., KOIDE, Y., UCHIJIMA, U., YOSHIDA, T. O. Dissection of strain difference protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guerin bacillus (BCG). Macrophages regulate the susceptibility through cytokine network and the induction of nitric oxide synthase. **J. Immunol.**, 155:2057-2066, 1995.

ZHANG, J., JIANG, R., TAKAYAMA, H., TANAKA Y. Survival of Virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. **Microbiol. Immunol.**, 49:845-852, 2005.

ZHANG, M., GONG, J., LIN, Y., BARNES, P.F. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. **Infect. Immun.**, 66:794-799, 1998.

ANEXO