

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE

MICHELE FERNANDES RODRIGUES

PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α)
E SEUS RECEPTORES NA MODULAÇÃO DA
APOPTOSE DE MACRÓFAGOS DURANTE A
INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis*.

JUIZ DE FORA

2013

MICHELE FERNANDES RODRIGUES

PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α)
E SEUS RECEPTORES NA MODULAÇÃO DA
APOPTOSE DE MACRÓFAGOS DURANTE A
INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis*.

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado 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, para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. Henrique Couto Teixeira

JUIZ DE FORA

2013

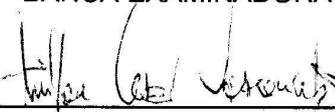
MICHELE FERNANDES RODRIGUES

**PAPEL DO FATOR DE NECROSE TUMORAL α (TNF- α) E SEUS
RECEPTORES NA MODULAÇÃO DA APOPTOSE DE MACRÓFAGOS
DURANTE A INFECÇÃO COM *Mycobacterium bovis***

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Doutorado 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, para obtenção do título de Doutor em Saúde.

Aprovada em 10 / 04 / 2013

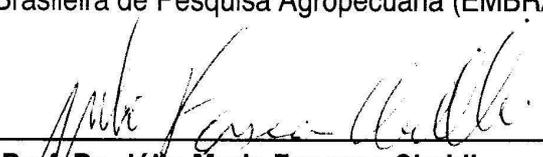
BANCA EXAMINADORA



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



Profª. Dra. Wanessa Araújo Carvalho
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)



Prof. Dr. Júlio Maria Fonseca Chebli
Universidade Federal de Juiz de Fora



Profª. Dra. Leticia Coutinho Lopes Moura
Universidade Federal de Juiz de Fora



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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que se faz presente em cada momento da minha vida, como exemplo de força, 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.

À minha irmã Gisele, meus irmãos Anderson e Egrison e a todos os meus familiares pelos momentos felizes e palavras de apoio.

Ao meu marido Tarcísio por todo amor, carinho, compreensão e incentivo. Aos nossos filhos João Pedro e Lucas, alegria de nossas vidas, que nos dão força a todo momento, com seu amor e carinho.

Ao professor e meu orientador Dr. Henrique Couto Teixeira, pelo apoio e confiança durante todos esses anos. Pelo incentivo, compreensão e otimismo que sempre proporcionaram mais leveza ao nosso trabalho.

A Dra. Sônia M. Neumann Cupolilo e a todos os professores do Departamento de Patologia, pelo incentivo e compreensão.

Ao meu amigo Luciano Mazzocoli pela amizade, pelas risadas e pela grande contribuição na realização deste trabalho.

Ao Caio e à Alice, pela amizade e pela colaboração fundamental para a concretização deste projeto.

A Estael e a Bárbara, alunas de iniciação científica, pela amizade e companheirismo e por estarem sempre dispostas a ajudar.

Ao Prof. Dr. João Santana da Silva, pelo fornecimento dos camundongos TNFR1^{-/-}, ao Dr. Marco Antonio Machado, Sabine e Daniele, pelo apoio na realização da PCR, à profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva, pelo apoio na coloração das lâminas.

Aos velhos e novos companheiros do Laboratório de Imunologia e a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

“Aqueles que passam por nós não vão sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.
Antoine de Saint-Exupéry

A cada etapa vencida, olhamos para trás aliviados e com a sensação de que pelo menos algumas perguntas foram respondidas. Mas, “na ciência nada é definitivo” e como “não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas”, olhamos também para frente pensando em outras questões e buscando novos desafios.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença de importância mundial. Os bacilos que causam a tuberculose entram no organismo principalmente pelas vias aéreas e a interação inicial nos pulmões é com os macrófagos alveolares, que servem como células hospedeiras. A morte dos macrófagos infectados por apoptose constitui uma alternativa de defesa do hospedeiro capaz de remover o ambiente de suporte para o crescimento bacteriano. No entanto, cepas virulentas de micobactérias parecem ser capazes de modular este processo. Alguns estudos tem destacado a importância do fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) na modulação da apoptose de macrófagos infectados. O TNF- α exerce suas atividades biológicas através de dois receptores de superfície celular, TNFR1 e TNFR2, cujos domínios extracelulares podem ser clivados por proteólise formando receptores solúveis (sTNFR-1 e sTNFR-2). A sinalização através do TNFR1 desencadeia a maioria das funções biológicas do TNF- α , resultando em sobrevivência ou morte celular, enquanto que o TNFR2 induz a sobrevivência da célula. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do TNF e seus receptores na modulação da apoptose de macrófagos alveolares durante a fase inicial de infecção por cepas atenuada e virulenta de *Mycobacterium bovis*, bem como, a possível interferência da micobactéria na sinalização TNF-TNFR. Para tal, camundongos C57BL/6 foram infectados, via intratraqueal, com as cepas atenuada (BCG Moreau) ou virulenta (ATCC19274) de *M. bovis*. Após 3 e 7 dias de infecção, os seguintes parâmetros foram avaliados: (1) expressão de receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) na superfície de macrófagos alveolares, (2) expressão gênica dos receptores *TNFR1* e *TNFR2*, (3) níveis dos receptores solúveis sTNFR1 e sTNFR2 no lavado broncoalveolar e níveis de TNF- α no pulmão (4) frequência da apoptose de macrófagos alveolares e (5) número de bacilos nos macrófagos alveolares. Além disso, o efeito do bloqueio da sinalização TNF-TNFR1 na modulação da apoptose de macrófagos foi avaliado em camundongos deficientes em TNFR1 infectados com *M. bovis* BCG. Um aumento significativo da apoptose e da expressão superficial de TNFR1 foram observadas em macrófagos alveolares 3 e 7 dias após a infecção com *M. bovis* atenuado, mas apenas no 7º dia de infecção com o *M. bovis* virulento. Baixa expressão superficial de TNFR1 e aumento dos níveis de sTNFR1 no 3º dia após a infecção pela cepa virulenta foram associados com reduzidas taxas de macrófagos apoptóticos. Além disso, uma redução significativa da apoptose de macrófagos alveolares foi observada em camundongos TNFR1^{-/-} no 3º dia após a infecção com BCG. Estes resultados sugerem um papel potencial do TNFR1 na apoptose de macrófagos durante a infecção pela micobactéria. Neste contexto, a clivagem do TNFR1 parece contribuir para a modulação da apoptose de macrófagos.

Palavras-chave: TNF- α ; TNFR1; TNFR2; macrófago; apoptose; *M. bovis*

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a disease of worldwide importance. The tubercle bacilli enter the organism mainly via respiratory tract and initial interaction in the lungs is with the alveolar macrophages, which serve as host cells. Apoptosis of the infected macrophages constitutes a host defense alternative capable of removing the environment supporting bacterial growth. However, virulent strains of mycobacteria appear to be capable of modulate this process. Some studies have highlighted the importance of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the modulation of apoptosis of infected macrophages. TNF- α exerts its biological activities via two distinct cell surface receptors, TNFR1 and TNFR2, whose extracellular domain can be released by proteolysis forming soluble TNF receptors (sTNFR-1 and sTNFR-2). The signaling through TNFR1 initiates the majority of the biological functions of TNF- α , leading to either survival or cell death, whereas TNFR2 induces survival. The aim of this study was to evaluate the influence of TNF-TNFR signaling in the modulation of apoptosis of alveolar macrophages during early stage of infection by virulent and attenuated strains of *Mycobacterium bovis*, as well as the possible interference of mycobacteria in this signaling. C57BL/6 mice were intratracheally infected with attenuated (BCG Moreau) or virulent (ATCC19274) strains of *M. bovis*. After 3 and 7 days of infection, the following parameters were assessed: (1) expression of TNF receptors (TNFR1 and TNFR2) on the surface of alveolar macrophages, (2) expression mRNA for TNF receptors, (3) levels of soluble receptors sTNFR1 e sTNFR2 in BAL and levels of TNF- α in lung (4) frequency of apoptosis alveolar macrophage and (5) number of bacilli in alveolar macrophages. Furthermore, the effect of abrogation of TNF-TNFR1 signaling in the modulation of macrophage apoptosis was assessed in TNFR1 deficient mice infected with *M. bovis* BCG. A significant increase of apoptosis and high expression of TNFR1 were observed in alveolar macrophages at 3 and 7 days after infection with attenuated *M. bovis* but only on day 7 in infection with the virulent *M. bovis*. Low surface expression of TNFR1 and increased levels of sTNFR1 on day 3 after infection by the virulent strain were associated with reduced rates of apoptotic macrophages. In addition, a significant reduction in apoptosis of alveolar macrophages was observed in TNFR1^{-/-} mice at day 3 after BCG infection. These results suggest a potential role of TNFR1 in macrophage apoptosis during infection by mycobacteria. In this context, the shedding of TNFR1 appears to contribute to the modulation of macrophage apoptosis.

KEY WORDS: TNF- α ; TNFR1; TNFR2; macrophage; apoptosis; *M. bovis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Evolução da infecção pelo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15
Figura 2	Estimativa da incidência de tuberculose no mundo em 2011	16
Figura 3	Parede celular de micobactérias do complexo <i>M. tuberculosis</i>	18
Figura 4	Inibição da fusão fagossomo-lisossomo	20
Figura 5	Resposta imunológica à micobactéria.....	22
Figura 6	Alterações celulares nos processos de morte por apoptose e necrose.....	23
Figura 7	Vias de indução da apoptose.....	24
Figura 8	Formação dos corpos apoptóticos e sua remoção pelos fagócitos.	25
Figura 9	Sinalização pelo TNFR1.....	35
Figura 10	Sinalização pelo TNFR2.....	37
Figura 11	Cross-talk TNFR1 e TNFR2.....	39
Figura 12	Expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 em macrófagos J774A.1.....	69
Figura 13	Expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 em macrófagos alveolares após infecção com <i>M. bovis</i>	71
Figura 14	Quantificação relativa de mRNA de TNFR1 e TNFR2 após infecção com <i>M. bovis</i>	73
Figura 15	Quantificação de sTNFR1 e sTNFR2	75
Figura 16	Quantificação de TNF- α	77
Figura 17	Apoptose de macrófagos alveolares após infecção com <i>M. bovis</i> ...	79
Figura 18	Apoptose de macrófagos alveolares em camundongos TNFR1 ^{-/-}	81
Figura 19	Número de bacilos em macrófagos alveolares de camundongos infectados com a cepa atenuada ou virulenta de <i>M. bovis</i>	83

LISTA DE ABREVIATURAS

APAF-1	Fator de ativação da apoptose (do inglês “Apoptotic protease activating factor 1”)
APC	Célula apresentadora de antígenos (do inglês “Antigen presenting cell”)
ATCC	Coleção de Cultura de Tipos Americana (do inglês “American Type Culture Collection”)
BAAR	Bacilo Álcool Ácido Resistente
BAL	Lavado Broncoalveolar (do inglês “Bronchoalveolar lavage”)
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
BR10R	Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (B10A/Bcg ^R)-resistentes a infecção pela micobactéria
BR10S	Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos (B10A/Bcg ^S)-susceptíveis infecção pela micobactéria
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês “Bovine serum albumin”)
C57BL/6	Linhagem de camundongos susceptível à infecção pela micobactéria
DD	Domínio de Morte (do inglês “Death Domain”)
DISC	Complexo de sinalização de indução de morte (do inglês “Death Inducing Signaling Complex”)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês “Ethylenediamine tetraacetic acid”)
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Ligado a Enzima (do inglês “Enzyme-linked immunosorbent assay”)
EPM	Erro Padrão da Média
FADD	Domínio de morte associado ao Fas (do inglês “Fas-associated death domain protein”)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês “Fluorescein isothiocyanate”)
FSC	Volume celular (do inglês “Forward Scatter”)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (do inglês “Human immunodeficiency vírus”)
IAP's	Proteínas inibidoras da apoptose (do inglês “Inhibitors of Apoptosis”)
<i>Ipr1</i>	Gene de resistência a patógeno intracelular (do inglês “Intracellular Pathogen Resistance 1”)
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
JNK	c-Jun N-terminal cinase (do inglês “c-Jun N-terminal kinase”)
J774A.1	Linhagem de macrófagos
LAM	Lipoarabinomanana (do inglês “Lipoarabinomannan”)
MFI	Intensidade Média de Fluorescência (do inglês “median fluorescence intensities”)
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal (do inglês “Major histocompatibility complex”)
MOI	Multiplicidade de infecção (do inglês “multiplicity of infection”)

NF-κB	Fator nuclear κ B (do inglês “Nuclear factor kappa B”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês “Phosphate Buffered Saline”)
PBST	Tampão fosfato-salino + Tween 20
PE	Ficoeritrina (do inglês “Phycoerythrin”)
PI	Iodeto de Propídeo (do inglês “Propidium iodide”)
PMSF	Metil Sulfonil Fluoride (do inglês “phenylmethylsulfonyl fluoride”)
RIP	Proteína de interação com o receptor (do inglês “Receptor-interacting protein”)
RNI	Intermediários reativos de nitrogênio (do inglês “reactive nitrogen intermediates”)
RPMI	Meio líquido para cultura de células (do inglês “Roswell Park Memorial Institute”)
SSC	Complexidade celular (do inglês “Side Scatter”)
TACE	Enzima conversora do TNF- α (do inglês “TNF- α Converting Enzyme”)
TLR	Receptor tipo Toll (do inglês “Toll-like receptors”)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α (do inglês: “Tumor Necrosis Factor alpha”)
TNFR	Receptor para o Fator de Necrose Tumoral (do inglês “tumor necrosis factor receptor”)
TMB	Tetrametilbenzidina (do inglês “Tetramethylbenzidine”)
TRADD	Domínio de morte associado ao receptor TNFR1 (do inglês “TNF receptor type 1-associated death domain”)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Epidemiologia da tuberculose	14
1.2	O complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
1.3	Infecção e resposta imunológica à micobactéria.....	19
1.4	Morte celular por apoptose	23
1.5	Apoptose durante a infecção pela micobactéria	26
1.6.	TNF- α : produção, formas e sinalização.....	30
1.7	Sinalização pelo TNFR1.....	33
1.8	Sinalização pelo TNFR2.....	36
1.9	Comunicação cruzada “cross-talk” entre TNFR1 e TNFR2.....	38
1.10	Receptores solúveis de TNF (sTNFR).....	40
1.11	Importância do TNF- α e dos receptores de TNF durante a infecção pela micobactéria.....	41
1.12	Modulação da sinalização TNF-TNFR por patógenos	44
1.13	Relação entre o TNF- α e seus receptores e a apoptose de macrófagos durante a infecção pela micobactéria.....	47
2.	OBJETIVOS	49
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3.	MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1	Animais e grupos experimentais	52
3.2	Bactérias	52
3.3	Infecção por via intratraqueal.....	53
3.4	Lavado broncoalveolar (BAL).....	54
3.5	Desenho experimental dos estudos “ <i>in vivo</i> ”.....	55
3.6	Análise da expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na superfície de macrófagos alveolares por citometria de fluxo.....	55
3.7	Análise da apoptose de macrófagos	56
3.8	Determinação da concentração de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) no lavado broncoalveolar	58
3.9	Determinação da concentração da citocina TNF- α no pulmão.....	59
3.10	Avaliação da expressão gênica de TNFR1 e TNFR2 por PCR em Tempo Real	60
3.10.1	Extração de RNA total e reação de transcriptase reversa para obtenção de DNA complementar	60
3.10.2	Quantificação relativa de cDNA por PCR em Tempo-Real	61
3.10.3	Análise dos resultados da PCR em Tempo-Real.....	63
3.11	Contagem de bacilos em macrófagos alveolares	64
3.12	Análise da expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 “ <i>in vitro</i> ”.....	65
3.13	Análise estatística	66

4.	RESULTADOS	67
4.1	Infecção com a micobactéria altera a expressão superficial dos receptores de TNF- α em macrófagos J774.....	68
4.2	Expressão de TNFR1 e TNFR2 em macrófagos alveolares após a infecção com <i>M. bovis</i> atenuado e virulento.....	70
4.3	Expressão gênica de TNFR1 e TNFR2 após a infecção com <i>M. bovis</i> atenuado e virulento.....	72
4.4	Alteração da expressão superficial dos receptores de TNF pode ser devido à clivagem “shedding” dos receptores da superfície celular.....	74
4.5	Aumento da produção de TNF- α após infecção com as cepas atenuada e virulenta de <i>M. bovis</i>	76
4.6	Apoptose de macrófagos alveolares induzida pelo <i>M. bovis</i>	78
4.7	Participação do TNFR1 na modulação da apoptose induzida pela micobactéria.....	80
4.8	Contagem de bacilos em macrófagos alveolares.....	82
5.	DISCUSSÃO	84
6.	CONCLUSÕES	94
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
8.	ANEXO	113
	ANEXO A - Comprovante de aceite do artigo para publicação.....	114

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia da tuberculose

A tuberculose (TB) é uma das mais antigas doenças infecciosas que afeta a humanidade e, apesar de ser alvo de combate a mais de 100 anos, continua representando um grave problema de saúde mundial (JORDÃO; VIEIRA, 2011). Há alguns anos, em muitos países, a TB 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 (DHEDA et al., 2010; DYE, 2000; RUSSEL, 2001). Embora existam medicamentos disponíveis, os esquemas terapêuticos são longos e envolvem múltiplas drogas que podem apresentar efeitos colaterais, o que muitas vezes contribui para o insucesso do tratamento e para o surgimento de cepas multidroga-resistentes (ALGOOD et al., 2003; TEIXEIRA et al., 2007).

Desde 1993, a tuberculose é reconhecida, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), como uma emergência de saúde pública global, por ser a segunda principal causa de morte de adultos por doença infecciosa, depois do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (LAVOR, 2008). As últimas estimativas incluídas no relatório global da tuberculose da OMS são de que havia quase 9 milhões de novos casos em 2011 e 1,4 milhões de mortes por tuberculose, sendo 990.000 entre pessoas HIV negativo e 430.000 mortes por TB associada ao HIV (WHO, 2011).

Estima-se que um terço da população mundial esteja infectada com o *Mycobacterium tuberculosis*. Aproximadamente, 5-10% dessas pessoas infectadas desenvolvem a doença ativa durante os primeiros anos após a exposição ao bacilo de Koch. A maioria das pessoas infectadas controla a infecção inicial, mas não elimina a micobactéria, e são caracterizadas como tendo tuberculose latente, ou seja, infectados porém sem sinais clínicos da doença. Pessoas com TB latente não

disseminam a micobactéria, mas a infecção pode reativar anos mais tarde, resultando em tuberculose ativa (**Figura 1**). O risco de reativação é aumentado em pessoas imunocomprometidas, incluindo indivíduos HIV positivos, pessoas em tratamento imunossupressor e desnutridas (ALGOOD et al., 2003; HARDING; BOOM, 2010; KAUFMANN, 2008; RAJA, 2004; ROOK; HERNANDEZ, 1996).

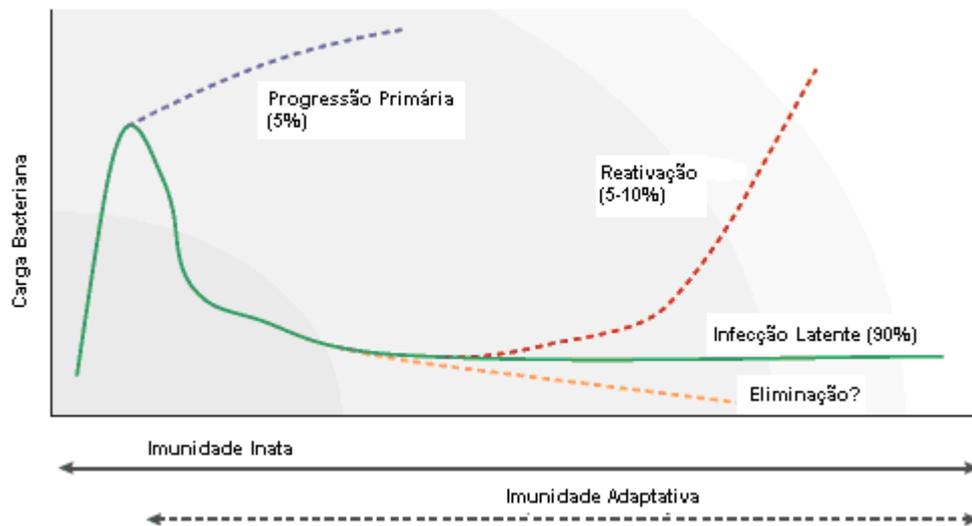


Figura 1: Evolução da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*. A resposta imune inata e adaptativa permite à maioria das pessoas (linha verde) controlarem o crescimento do *M. tuberculosis*, embora possam conter a infecção latente, pois não se sabe se a resposta imune é capaz de eliminar completamente a infecção (pontilhado laranja). Alguns indivíduos, especialmente aqueles com disfunção na resposta mediada por células T, desenvolvem a tuberculose ativa, tanto por progressão primária (pontilhado azul) como por reativação (pontilhado vermelho). Fonte: Harding e Boom (2010).

O Brasil ocupa o 17º lugar entre os 22 países responsáveis por 82% do total de casos de tuberculose no mundo (WHO, 2011). Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN/MS), são registrados cerca de 111 mil novos casos e 6 mil óbitos no país anualmente. O Rio de Janeiro é um dos estados que concentra o maior número de casos, com média de 12 mil por ano e incidência de 85 doentes para cada 100 mil habitantes, o que representa mais que o dobro da média nacional que é de 40,8 casos por 100 mil habitantes (**Figura 2**) (LAVOR, 2008).

Estimativa de Incidência TB, 2011

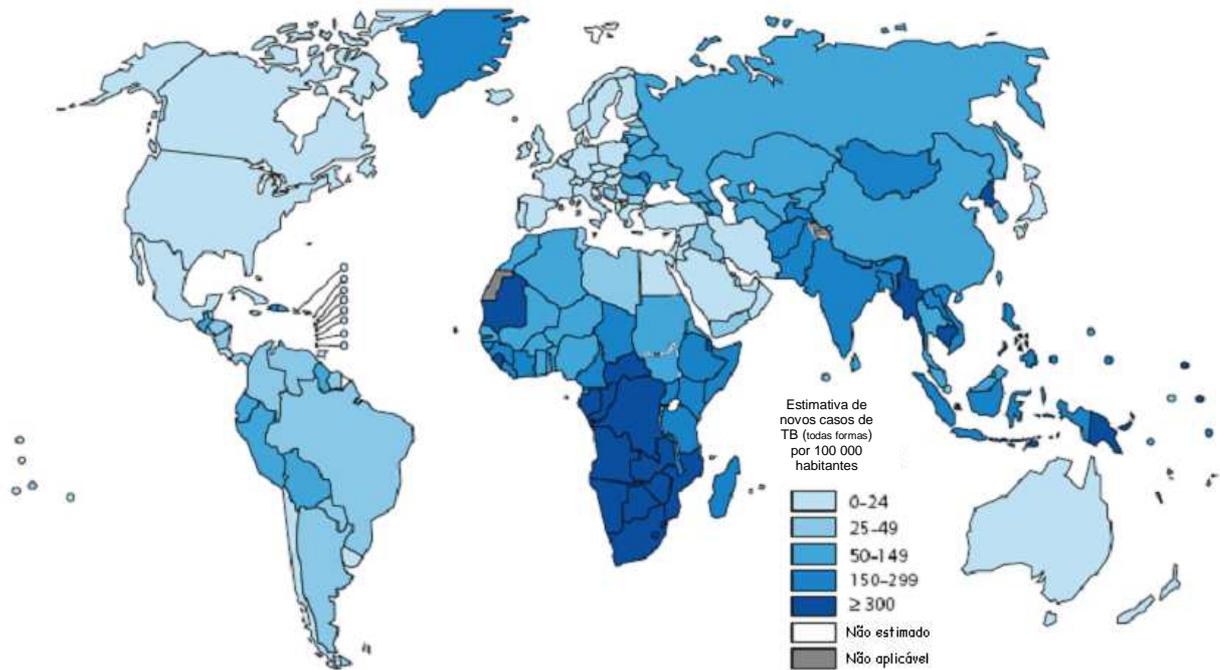


Figura 2: Estimativa da incidência de tuberculose no mundo em 2011.

Fonte: WHO – Global Tuberculosis Report - 2012

1.2 O complexo *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é composto bacilos, álcool-ácido resistentes, não esporulantes e imóveis. A maioria das espécies do gênero são bactérias ambientais não patogênicas. No entanto, algumas espécies são altamente patogênicas e capazes de produzir doenças em vários tipos de hospedeiros (COSMA et al., 2003). Dentro do gênero, os bacilos que causam tuberculose (**Figura 3A**) estão agrupados no complexo *Mycobacterium tuberculosis*, composto por espécies altamente relacionadas que apresentam 99% de similaridade em nível de nucleotídeo. Este complexo inclui: *M. tuberculosis*, principal agente etiológico da tuberculose humana; *M. africanum*, causador de tuberculose em humanos na região da África sub-Saara; *M. canetti*, descendente rara do *M. tuberculosis*, que também causa tuberculose em

humanos; *M. microti*, causadora de tuberculose em roedores; *M. bovis*, que causa tuberculose em bovinos, mas também infecta e causa doença em várias espécies de mamíferos incluindo o homem; *M. bovis BCG*, uma variante atenuada do *M. bovis* (COLE, 2002), e duas espécies recentemente incluídas, *M. caprae*, agente da tuberculose em caprinos (ARANAZ et al., 2003) e *M. pinnipedii*, causador da tuberculose em leões marinhos (COUSINS et al., 2003).

Inicialmente acreditava-se que *M. tuberculosis* havia evoluído a partir do *M. bovis*, como uma conseqüência não intencional da domesticação do gado (KAPUR et al., 1994). No entanto, estudos mapeado a distribuição de uma série de deleções do DNA (regiões de diferença, RD) entre micobactérias intimamente relacionadas, sugeriram que o *M. tuberculosis*, com o menor número de regiões deletadas, é o mais ancestral de todos os membros do complexo, enquanto que o *M. bovis*, com maior número de regiões excluídas, evoluiu mais recentemente (BROSCH et al., 2002; COSMA et al., 2003).

A patologia e o curso da doença causada por *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum* é muito semelhante em humanos (COSMA et al., 2003). Entretanto, estudos recentes têm sugerido que em camundongos *M. bovis* é consideravelmente mais virulento do que o *M. tuberculosis*, de acordo com sua habilidade de causar progressiva patologia nos pulmões e o tempo necessário para matar seu hospedeiro (DUNN; NORTH, 1995; MEDINA et al., 2006). Esta maior virulência do *M. bovis*, caracterizada pelo aumento da sobrevivência e crescimento intracelular, pode estar relacionada com a capacidade de modulação da resposta do macrófago (ANDRADE et al., 2012).

Todos os membros do complexo *Mycobacterium tuberculosis* apresentam crescimento lento com um tempo de duplicação de aproximadamente 16 a 20 horas. A lentidão do crescimento parece estar relacionada à absorção mais demorada de nutrientes, provavelmente devido à complexidade de sua parede celular (**Figura 3B**) que apresenta grande quantidade de lipídeos (BRENNAN, 2003) e está relacionada com muitas das características desse gênero, como a álcool-ácido resistência, a antigenicidade e a resistência a antibióticos comuns (MURRAY et al., 2006).

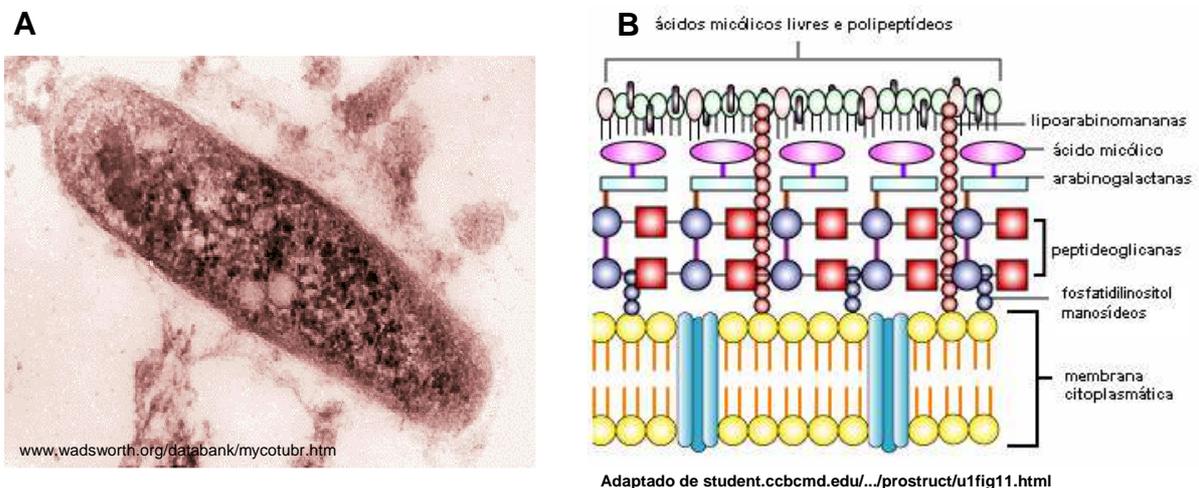


Figura 3: Parede celular de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*: (A) Micrografia eletrônica de transmissão do bacilo da tuberculose. (B) Esquema representativo da parede celular de micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*. A parede celular desses bacilos é composta principalmente por três diferentes estruturas covalentemente ligadas: peptideoglicanos, arabinogalactanas e ácidos micólicos. A camada de peptideoglicano confere forma e integridade estrutural à bactéria e está ligada a arabinogalactanas (polissacarídeos ramificados) as quais estão ligadas a ácidos micólicos que são ácidos graxos de alto peso molecular. Esta camada arabinogalactanas/ácido micólico é ainda coberta com uma camada de ácidos micólicos e polipeptídeos livres. Outros lipídeos e glicolipídeos associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria incluem fosfatidilinositol manosídeos (PIM), o lipoarabinomanana (LAM) e sua forma manosilada (Man-LAM). A maioria destes lípidos são específicos para micobactérias e podem atuar como moduladores das funções imunológicas.

1.3 Infecção e resposta imunológica a micobactéria

O *M. tuberculosis*, bem como, o *M. bovis*, são bacilos intracelulares facultativos estritamente aeróbicos, que apresentam uma predileção pelo tecido pulmonar o qual é ricamente suprido de oxigênio. O bacilo entra no organismo principalmente pela via respiratória e os macrófagos alveolares são as primeiras células a fagocitar a micobactéria (KAUFMANN, 1993; PIETERS, 2008; RAJA, 2004;). A fagocitose dos bacilos é mediada por diferentes receptores sendo que, receptores do complemento participam principalmente na fagocitose de micobactérias opsonizadas, enquanto que receptores de manose e receptores scavenger contribuem para a fagocitose de micobactérias não opsonizadas, através da interação com componentes específicos da parede celular da micobactéria (van CREVEL et al., 2002). Além da fagocitose, o reconhecimento da micobactéria é uma etapa essencial para o desenvolvimento de uma resposta imune efetiva. Esse reconhecimento é mediado principalmente através dos receptores tipo Toll (TLRs), dentre eles TLR2 que reconhece lipoproteínas e glicolipídeos da micobactéria, tal como lipoarabidomanas (LAM); TLR9 que parece ser ativado por DNA genômico da micobactéria e possivelmente TLR4. A ligação dos TLRs leva a ativação das células e secreção de citocinas pró-inflamatórias (CARVALHO et al., 2011; HARDING; BOOM, 2010; van CREVEL et al., 2002)

Após a fagocitose, a micobactéria é retida dentro do vacúolo fagocítico e pode escapar da destruição neste compartimento inibindo a maturação do fagossomo e evitando sua fusão com o lisossomo (**Figura 4**) (AXELROD et al., 2008; KAUFMANN, 2001; RUSSEL, 2001; WARNER; MIZRAHI, 2007). Dessa forma, a micobactéria sobrevive no interior do fagossomo do macrófago e começa a multiplicar-se, pois este

ambiente endossomal protege o bacilo dos mecanismos efetores do hospedeiro e permite sua replicação (MCDONOUGH et al., 1993; van CREVEL et al., 2002).

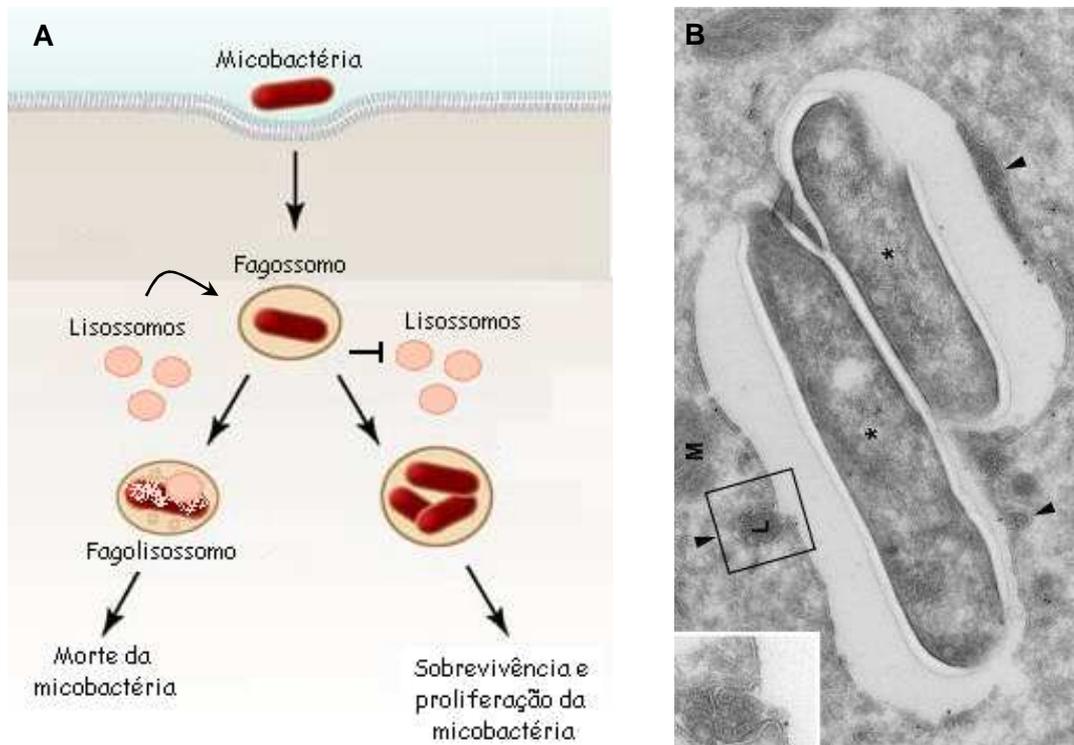


Figura 4: Inibição da fusão fagossomo-lisossomo. (A) Esquema ilustrativo mostrando a fusão fagossomo-lisossomo com destruição da micobactéria, e a inibição desse processo pela micobactéria, que sobrevive e replica-se no interior do fagossomo do macrófago. Fonte: Adaptado de Philips e Ernst, 2012 (B) Micrografia eletrônica mostrando o processo de fusão do fagossomo, contendo a micobactéria, com os lisossomos (cabeça de seta e detalhe canto inferior esquerdo). 0,2 µm. Fonte: van der WEL, 2007.

A interação inicial da micobactéria nos pulmões é com os macrófagos alveolares. No entanto, o bacilo não permanece apenas nas vias aéreas, mas passa a residir também no parênquima pulmonar, infectando e replicando-se em macrófagos teciduais residentes, bem como, em macrófagos que se diferenciam a partir de monócitos sanguíneos recrutados para o local da infecção. Células dendríticas residentes reconhecem a micobactéria e podem também ser infectadas, e presume-se que essas células migrem para os linfonodos regionais para ativar células T naives. A infecção inicial desencadeia uma cascata de moléculas inflamatórias, incluindo a

liberação de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos alveolares e outras células infectadas, as quais fornecem sinais que conduzem os linfócitos T antígenos-específicos para o local da infecção, onde essas células ativam os macrófagos para eliminação da micobactéria e formam o granuloma (ALGOOD et al., 2003; HARDING; BOOM, 2010; van CREVEL et al., 2002). Diferentes tipos de linfócitos participam da resposta imune contra a micobactéria (**Figura 5**).

Linfócitos T CD4⁺ se diferenciam em efetores Th1 sob a influência das citocinas IL-12 e IL-18 (DEMANGEL et al., 2001; SCHNEIDER et al., 2010) e promovem a ativação dos macrófagos principalmente através da secreção de IFN- γ . 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; CHAN, 2001; PHILIPS; ERNST, 2012). Outros tipos de células T CD4⁺ têm sido recentemente reconhecidas por sua contribuição na imunidade a micobactérias, embora seus papéis ainda não estejam totalmente definidos. Células Th17 secretam IL-17 e quimiocinas que participam do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção e células T regulatórias (Tregs), cujo desenvolvimento depende de TGF- β , parecem atuar como importantes reguladoras da imunidade na TB (PHILIPS; ERNST, 2012) (**Figura 5**).

As células T CD8⁺ contribuem na defesa contra as micobactérias, principalmente através da produção de IFN- γ e da lise das células infectadas (CANADAY et al., 2001; KAUFMANN et al., 2010). Estudos recentes indicam que as células T CD8⁺ podem ser ativadas através de um mecanismo de apresentação cruzada, onde vesículas, contendo antígenos micobacterianos, oriundas de macrófagos apoptóticos são fagocitadas pelas células dendríticas, processadas e os peptídeos antigênicos apresentados na superfície via molécula de classe I do MHC (WINAU et al., 2004).

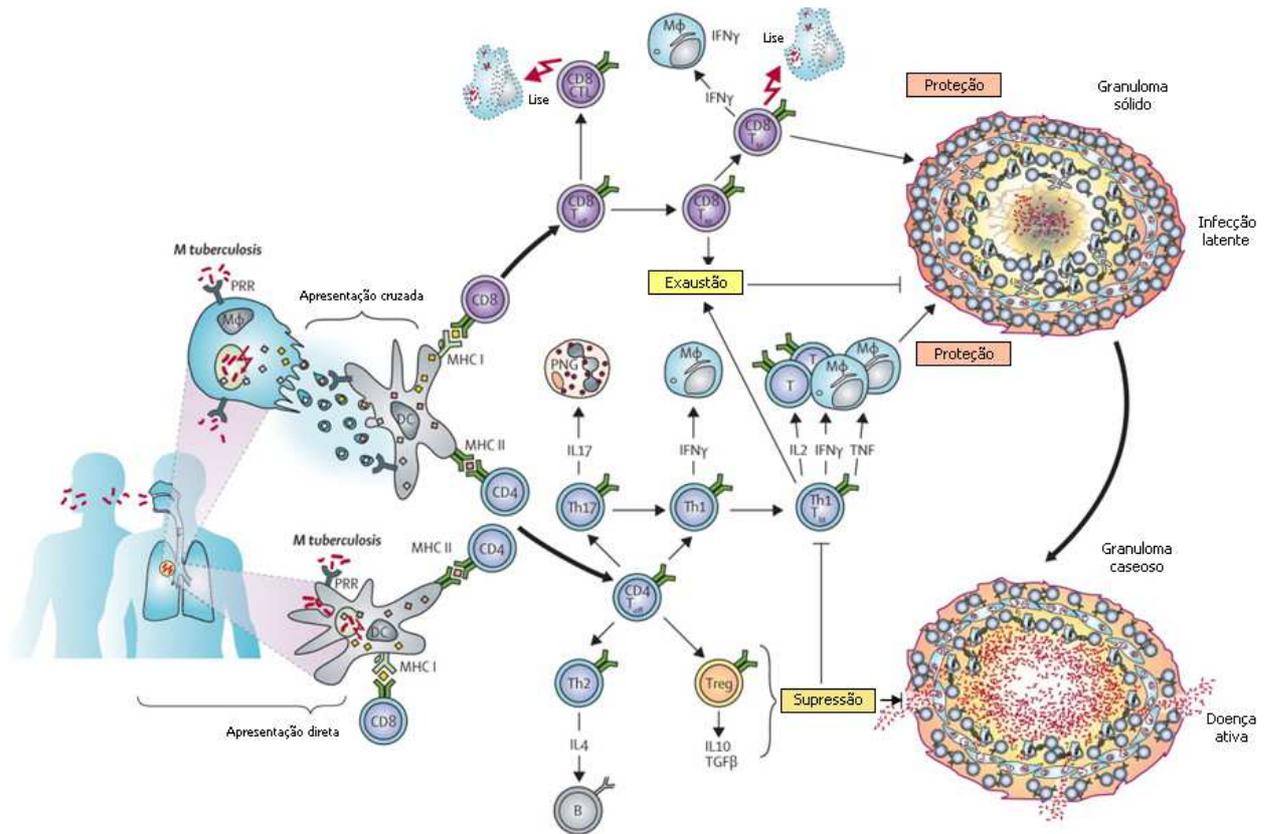


Figura 5: Resposta imunológica a micobactéria.

Fonte: KAUFMANN et al. (2010).

A resposta imunidade inata ao *M. tuberculosis* instrui o desenvolvimento da imunidade adquirida na fase inicial e executa mecanismos efetores na fase tardia da infecção (SCHNEIDER et al., 2010). Entretanto, o estabelecimento da imunidade específica mediada por células T ocorre aproximadamente 2 a 6 semanas após a infecção (RAJA, 2004). Neste contexto, a resposta do macrófago é muito importante, pois a micobactéria persiste no interior dessa célula (RUSSEL, 2003) e durante os estágios iniciais da infecção, quando a imunidade específica ainda não foi estabelecida, o controle da proliferação da micobactéria depende principalmente da resistência natural mediada pelos macrófagos (FENTON; 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, uma vez que a morte desse macrófago infectado significa a perda do ambiente de proteção e replicação da micobactéria (BOCCHINO et al., 2005; KEANE et al., 2000; LEE et al., 2006; MOLLOY et al., 1994; RÍOS-BARRERA et al., 2006; RODRIGUES et al., 2009).

1.4 Morte celular por apoptose

A apoptose é processo de morte celular 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 (KROEMER et al., 2009) (**Figura 6**).

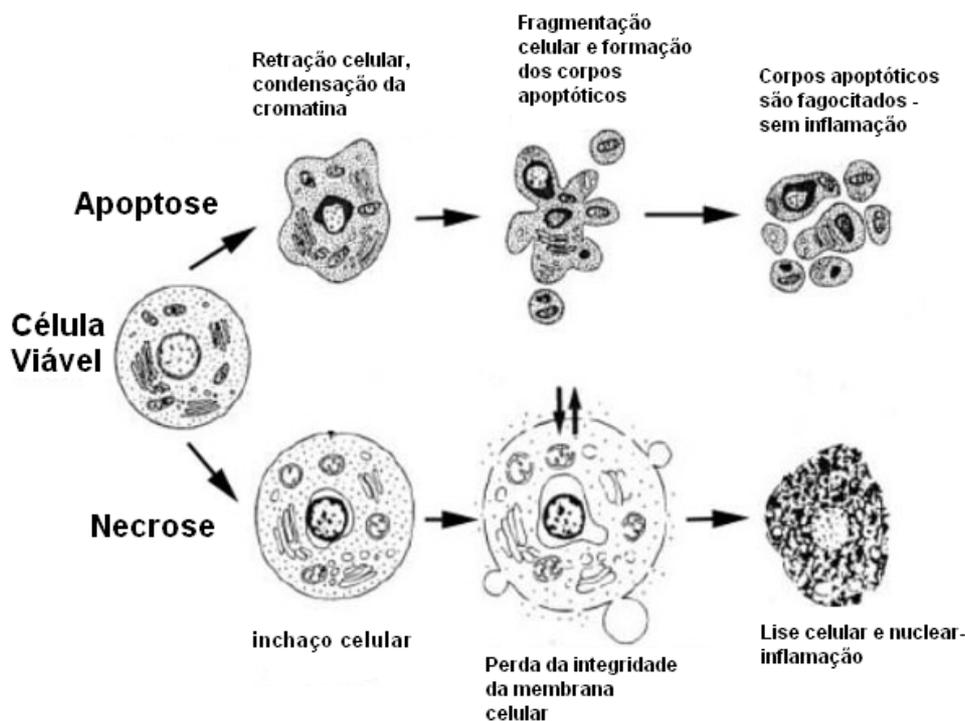


Figura 6: Alterações celulares nos processos de morte celular por apoptose e necrose. Na apoptose ocorre a preservação da membrana plasmática com formação dos corpos apoptóticos, não havendo liberação dos constituintes celulares. Na necrose há perda da integridade da membrana e lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas. Fonte: van CRUCHTEN e van DEN BROECK (2002).

A apoptose pode ser iniciada por estímulos externos, através de receptores específicos localizados na superfície celular, denominados receptores de morte (via extrínseca), ou por estímulos internos de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial (via intrínseca) (AMARANTE-MENDES, 2003; GREEN; REED, 1998). Essas diferentes vias culminam na ativação de cisteíno-proteases, conhecidas como 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 (HENGARTNER, 2000) (**Figura 7**).

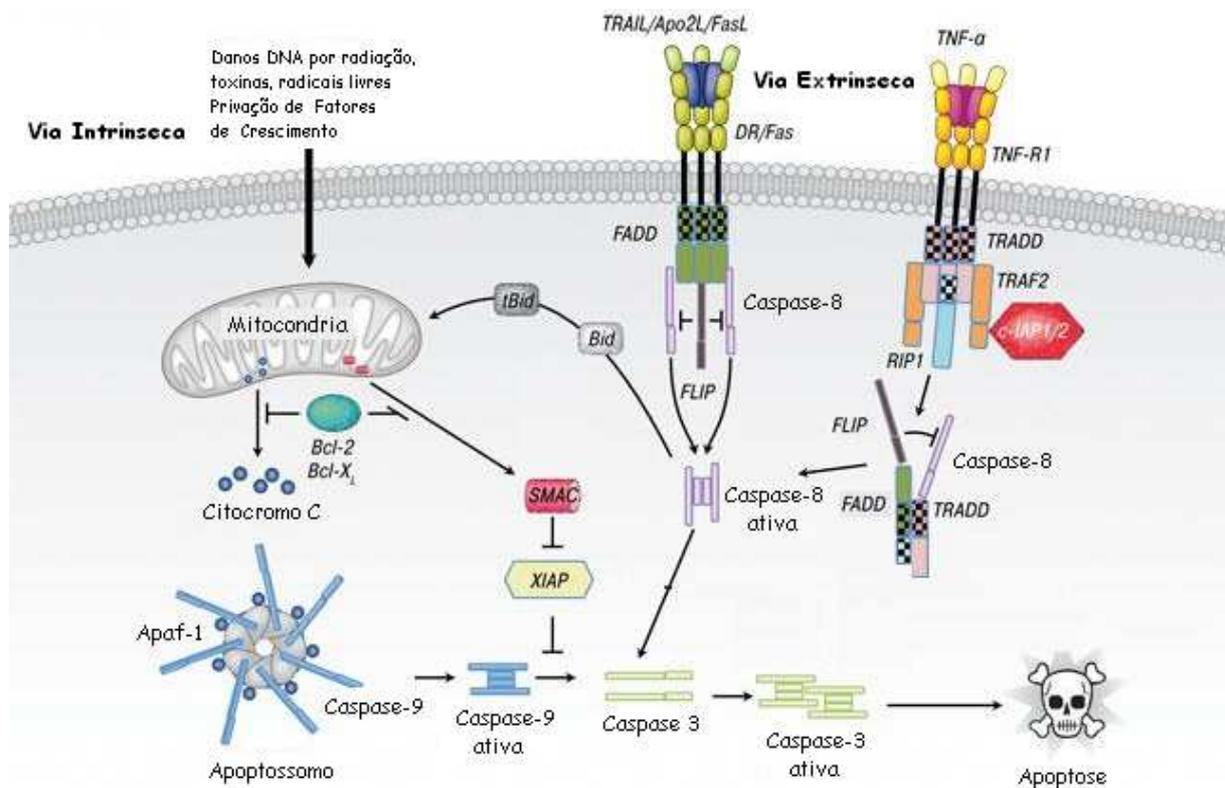


Figura 7: Vias de indução da apoptose. A via extrínseca é desencadeada por membros da super-família dos receptores de morte celular (tal como TNFR1 e Fas). Quando os ligantes específicos (TNF- α e FasL) se acoplam aos seus receptores, as moléculas individuais do receptor se trimerizam e recrutam TRADD (domínio de morte associado ao receptor de TNF) ou FADD (domínio de morte associado ao Fas) e outras proteínas adaptadoras presentes no citosol, formando um complexo que ativa a pró-caspase 8. A caspase-8 pode então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativar a caspase-3 (efetora). A **via intrínseca** é ativada por sinais de estresse intracelular que resultem em disfunção mitocondrial. Ocorre a ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 que permitem a liberação do citocromo c da mitocôndria para o citosol. No citosol, o citocromo c associa-se com Apaf-1 (Fator ativador de apoptose 1) e a pró-caspase-9, formando o apoptossomo que por sua vez ativará a caspase 3. Ambas as vias culminam na clivagem de substratos específicos que levam a morte celular por apoptose. Fonte: ALMAGRO e VUCIC (2012).

Um dos resultados da ativação das caspases 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, tal como a fosfatidilserina, é alterado. Este novo posicionamento serve como sinalizador para que células fagocíticas das proximidades englobem os fragmentos celulares e completem 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 (**Figura 8**) (PAROLIN; REASON, 2001).

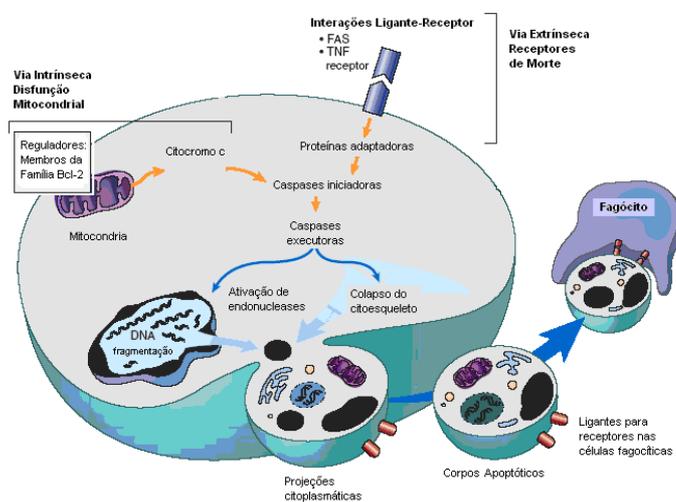


Figura 8: Formação dos corpos apoptóticos e sua remoção pelos fagócitos. A ativação da cascata de caspases culmina na formação de corpos apoptóticos que expressam ligantes para que sejam reconhecidos e englobados por células fagocíticas.

Fonte: Pathologic Basis of Disease de Kumar, Abbas e Fausto.

A eliminação das células e corpos apoptóticos por fagócitos é o resultado padrão no curso típico da apoptose. No entanto, quando os fagócitos não realizam esta retirada “clearance”, a apoptose pode proceder para um resultado necrótico autolítico. Neste processo chamado de necrose secundária, ocorre ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo intracelular (SILVA, 2010).

1.5 Apoptose durante a infecção pela micobactéria

A importância da apoptose de macrófagos durante a infecção pela micobactéria, tem sido recentemente destacada através de diversos estudos que sugerem que a indução da apoptose dos macrófagos pode constituir um mecanismo de defesa alternativo do hospedeiro e indicam que a modulação da morte do macrófago é uma das estratégias utilizadas pela micobactéria para estabelecer a infecção (FAIRBAIRN, 2004; PHILIPS; ERNEST, 2012; RAMAKRISHNAN, 2012).

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 impediria a propagação da micobactéria por seqüestrar e reter o patógeno dentro dos corpos apoptóticos (FRATAZZI et al., 1999), os quais seriam fagocitados por macrófagos não infectados que, por sua vez, conseguiriam eliminar a micobactéria, uma vez que a ingestão dos bacilos contidos nos corpos apoptóticos resultaria 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 respectivas 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 infectados pode contribuir para a imunidade na tuberculose.

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, ao contrário da apoptose, a necrose dos macrófagos infectados não elimina a micobactéria e ainda possibilita sua liberação para o meio extracelular. A descoberta de um gene da imunidade inata denominado *lpr1* (do inglês *Intracellular Pathogen Resistance 1*) enfatiza a importância do mecanismo de morte celular na resposta do hospedeiro a infecção. Foi verificado que a expressão do *lpr1* em macrófagos limita a multiplicação do *M. tuberculosis* e altera a modo de morte celular dos macrófagos infectados de necrose para apoptose (PAN et al., 2005).

Além de seu papel na imunidade inata, a apoptose dos 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, foi demonstrado 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⁺. Foi constatado 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; WINAU et al., 2006).

A capacidade das cepas virulentas de inibir a apoptose dos macrófagos pode ser relacionada à necessidade de preservação de um ambiente intracelular de suporte para o crescimento da bactéria. Além disso, inibindo a apoptose do macrófago infectado, a micobactéria também evita seu aprisionamento nos corpos apoptóticos e ainda impede a apresentação cruzada de seus antígenos que facilita o desenvolvimento da imunidade específica (FRATAZZI et al., 1997; KEANE et al., 2000; WINAU et al., 2005).

Um importante 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, foi constatado 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.

Recentemente, em estudos realizados em nosso laboratório, foi confirmado, *in vivo*, que a cepa virulenta da micobactéria tem a capacidade de modular a apoptose dos macrófagos, e que esta inibição ou indução da apoptose parece depender do número de bactérias no interior da célula, refletindo suas necessidades de crescimento intracelular e saída da célula hospedeira durante a fase de replicação e disseminação inicial no hospedeiro. Foi verificado ainda que esta modulação da apoptose parece estar estreitamente relacionada com a citocina TNF- α , uma vez que observamos uma relação direta entre os níveis de TNF- α e apoptose dos macrófagos pulmonares (RODRIGUES et al., 2009).

Alguns estudos têm destacado o papel da citocina TNF- α na modulação da apoptose durante a infecção pela micobactéria (ARCILA et al., 2007; KLINGLER et al., 1997; ROJAS et al., 1999; SLY et al., 2003), onde o TNF- α atuaria como promotor da apoptose, sendo que a sua produção parece ser necessária para a indução da apoptose dos macrófagos infectados com a micobactéria (KEANE et al., 1997; RODRIGUES et al., 2009; SPIRA et al., 2003). De fato, como anteriormente destacado, a transdução de sinais do TNF- α 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 (CHAN et al., 2001; MACMICKING et al., 1997).

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 do que os macrófagos susceptíveis. 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 da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Essas observações sugerem que a citocina TNF- α , além de influenciar as funções efectoras e acessórias dos macrófagos, pode também exercer um importante papel na modulação da apoptose induzida pela micobactéria, influenciando conseqüentemente a susceptibilidade do hospedeiro à infecção.

1.6 TNF- α : produção, formas e sinalização

O fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) foi identificado há aproximadamente 30 anos e é atualmente reconhecido como uma citocina altamente pleiotrópica que provoca diversas respostas celulares, que vão desde a proliferação e ativação celular até a indução da apoptose, desempenhando, portanto, um importante papel na inflamação e imunidade (HEHLGANS; PFEFFER, 2005; SCHÜTZE et al., 2008).

O TNF- α é produzido principalmente por macrófagos e monócitos ativados em resposta a infecções e condições inflamatórias, mas também por outros tipos de células, tais como linfócitos T estimulados por antígenos, células NK, mastócitos, entre outras (ABBAS; LICHTMAN, 2005; GUICCIARDI; GORES, 2009). Nos fagócitos mononucleares, o TNF é sintetizado, inicialmente, como uma proteína de membrana com uma extremidade aminoterminal intracelular e uma grande extremidade

carboxiterminal extracelular, que posteriormente sofre clivagem proteolítica (ABBAS; LICHTMAN, 2005; HEHLGANS e PFEFFER, 2005; SAUNDERS et al., 2005). Portanto, o TNF apresenta-se sob duas formas: uma forma associada à membrana e uma forma solúvel gerada a partir da clivagem proteolítica da proteína ligada à membrana, o que ocorre pela ação da enzima conversora de TNF- α (TACE). TACE é um metaloproteinase associada à membrana que está presente na superfície de macrófagos, as principais células produtoras de TNF- α (ERMERT et al., 2003; GOTO et al., 2004). O TNF produzido em resposta a vários estímulos é transportado pela rede trans-Golgi, expresso na superfície da membrana e, transitoriamente apresenta-se como TNF de membrana (mTNF). Cerca de uma hora depois, o TNF de membrana é processado pela TACE e se converte para TNF solúvel, que é incorporado em tecidos e plasma sob a forma tipicamente chamada de TNF- α (BLACK et al., 1997; GOTO et al., 2004). Ambas as formas de TNF- α , solúvel e de membrana, são biologicamente ativas e, enquanto a forma solúvel atua como uma molécula efetora a distância da célula produtora, a forma ligada a membrana provavelmente tem um papel específico na resposta localizada do TNF- α (GUICCIARDI; GORES, 2009).

As atividades biológicas do TNF- α são mediadas por dois distintos receptores de superfície celular, de pesos moleculares 55 kD chamado receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) e 75 kD chamado receptor de TNF tipo 2 (TNFR2). A ligação da citocina a esses receptores inicia vias de sinalização que podem levar tanto a sobrevivência como a morte da célula (SCHLUTER; DECKERT, 2000).

TNFR1 e TNFR2 são estruturalmente relacionados e expressos na superfície de muitos tipos de células. Em camundongos, TNFR1 e TNFR2 apresentam 28% de identidade em seus domínios extracelulares que são caracterizados por quatro seqüências ricas em cisteína. Entretanto, TNFR1 e TNFR2 não compartilham

significante homologia em seus domínios intracitoplasmáticos. As caudas citoplasmáticas dos membros da família TNFR não contêm atividades enzimáticas intrínsecas, mas contêm motivos estruturais que se ligam a moléculas de sinalização citoplasmáticas e promovem a montagem de complexos de sinalização. Um desses motivos estruturais é chamado domínio de morte (DD do inglês "death domain"), cuja sinalização pode ativar a cascata de caspases levando a morte celular por apoptose (GUPTA, 2003; SCHLUTER; DECKERT, 2000). TNFR1 contém o domínio de morte, entretanto o TNFR2 não possui este domínio. Portanto, TNFR1 pode induzir tanto sinais de sobrevivência como sinais de morte celular, enquanto que o TNFR2 medeia primariamente sinais de sobrevivência (IHNATKO; KUBES, 2007).

Ambos sinais de sobrevivência e morte celular mediados pelo TNF- α requerem a participação de diferentes proteínas adaptadoras e outras moléculas de sinalização intracelular, dentre as quais destacam-se TRADD (domínio de morte associado ao receptor de TNF), FADD (domínio de morte associado ao Fas) e RIP (proteína de interação com o receptor). Além dessas, outro grupo de moléculas que desempenha um papel essencial na sinalização pelos TNFRs, constitui uma família de proteínas chamadas de TRAFs (fatores associados ao receptor de TNF) (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O TNFR1 interage e é ativado por ambas as formas de TNF- α , solúvel e de membrana, enquanto que o TNFR2 é preferencialmente ativado pelo TNF de membrana, embora interaja com o TNF solúvel, o qual não consegue ativar adequadamente a sinalização pelo TNFR2 (NAUDÉ et al., 2011).

1.7 Sinalização pelo TNFR1

O TNFR1 é expresso a níveis constitutivamente baixos em muitos tipos de células. Ele pertence a um subgrupo da superfamília de TNFR que inclui os chamados “receptores de morte”, do qual fazem parte TNFR1, CD95 (Fas) e receptores TRAIL (ligantes indutores de apoptose relacionado ao TNF). Estes receptores compartilham o, já mencionado, domínio de morte, que é necessário para a ativação direta do programa apoptótico por alguns desses receptores (SCHÜTZE et al., 2008). Ao contrário de outros receptores de morte, como o Fas e os receptores TRAIL(1/2), o TNFR1 é primariamente envolvido na mediação da inflamação e não na morte celular (GUICCIARDI; GORES, 2009).

Após a ligação do TNF- α , o TNFR1 recruta a proteína adaptadora TRADD diretamente para seu domínio de morte citoplasmático (HSU et al., 1996a). TRADD, por sua vez, serve como uma plataforma de montagem para divergir a sinalização do TNFR1, sendo que a interação de TRADD com RIP-1 e TRAF-2 leva a ativação das vias NF- κ B e JNK e conseqüentemente a sobrevivência da célula (HSU et al., 1996b). Alternativamente, TRADD pode recrutar FADD e procaspase-8, que é posteriormente ativada para iniciar a apoptose (BOLDIN et al., 1996; HSU et al., 1996b; MUZIO et al., 1996; SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004).

Embora, os elementos chave das vias de sinalização de sobrevivência (TNFR1, TRADD, RIP1 e TRAFs) e de apoptose (TNFR1, TRADD, FADD e caspase-8) estejam bem definidos, a compreensão dos mecanismos que regulam a formação desses complexos de sinalização, a partir da ativação do TNFR1, ainda está em construção (SCHÜTZE et al., 2008).

Inicialmente acreditava-se que a ligação do TNF- α ao receptor TNFR1 resultava na formação de um único complexo ligado a membrana, contendo todas as importantes proteínas adaptadoras (TRADD, RIP, TRAF e FADD), que por sua vez recrutavam adicionais enzimas, as quais iniciavam uma cascata de eventos levando a ativação das vias NF- κ B ou JNK bem como a apoptose (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; BAUD; KARIN, 2001; CHEN; GOEDDEL, 2002).

Posteriormente, Micheau e Tschopp (2003), propuseram um novo modelo, no qual a sinalização pelo TNFR1 envolve a montagem de dois complexos de sinalização molecularmente e espacialmente distintos, que seqüencialmente ativam NF- κ B e caspases. De acordo com este modelo, dentro de poucos minutos após ligação do TNF- α , o receptor TNFR1 recruta TRADD, RIP1 e TRAF2 para formar um complexo de sinalização ligado a membrana celular, conhecido como complexo I, que leva a ativação do fator de transcrição NF- κ B (SCHÜTZE et al., 2008). Entretanto, a formação desse complexo I é transitória, uma vez que grande parte de TRADD, RIP1 e TRAF2 dissociam-se do TNFR1 dentro de uma hora, momento em que este receptor começa a sofrer endocitose. Após a dissociação do TNFR1, o domínio de morte do TRADD liga-se a FADD, o que resulta no recrutamento da caspase-8 para um complexo de sinalização secundário dentro do citosol, conhecido como complexo II. O recém-formado complexo citosólico, contendo TRADD, FADD e caspase 8, promoveria a ativação da cascata apoptótica resultando na morte da célula. Este complexo secundário (complexo II) iniciaria a apoptose, quando a ativação do NF- κ B, desencadeada pelo complexo I, não fosse bem sucedida e conseqüentemente não induzisse a expressão de proteínas anti-apoptóticas. Caso o fator NF- κ B fosse ativado com sucesso pelo complexo I, a ação das proteínas anti-apoptóticas impediria a

apoptose da célula (GUICCIARDI; GORES, 2009; MICHEAU; TSCHOPP, 2003)
(Figura 9).

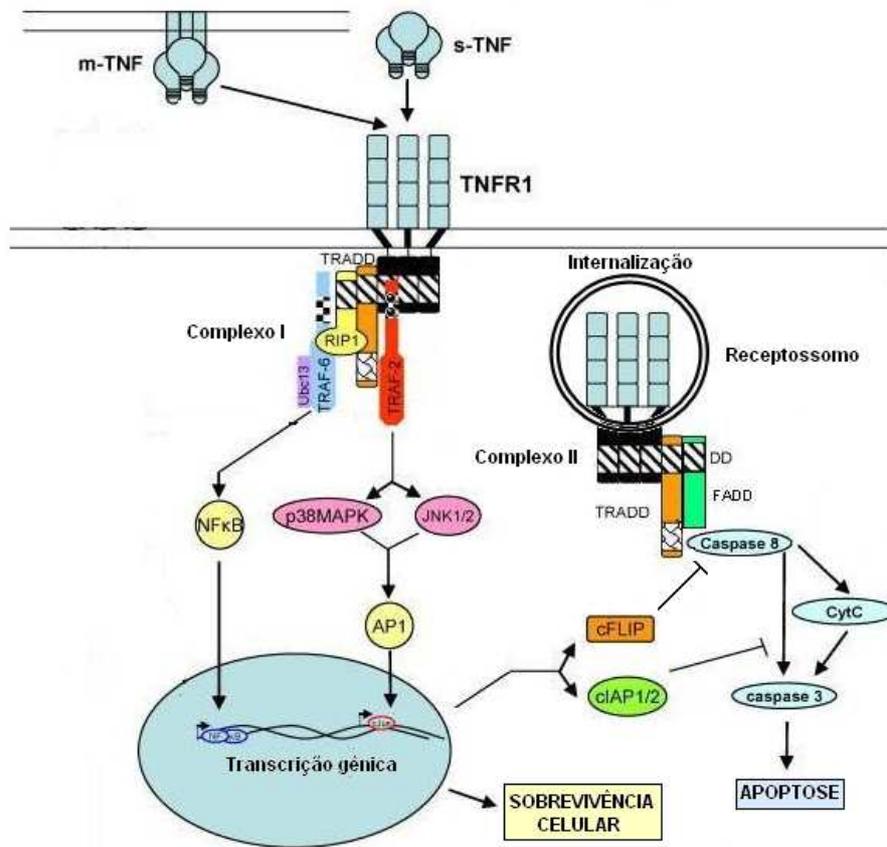


Figura 9: Sinalização pelo TNFR1.
Fonte: Adaptado de KRUGLOV et al. (2008).

Adicionalmente, estudos realizados pelo grupo de Schneider-Brachert et al. (2004) confirmaram a existência de complexos de sinalização espacialmente distintos na superfície celular e no citoplasma, e sugeriram que a agregação de TRADD, FADD e caspase 8 para formar o complexo de sinalização de indução de morte é criticamente dependente da internalização do TNFR1. Este complexo contendo TRADD, FADD e caspase 8 associados ao TNFR1 internalizado em compartimento endossomal foi chamado de Receptossomo TNF, o qual corresponderia ao complexo II citosólico proposto por Micheau e Tschopp (SCHNEIDER-BRACHERT et al., 2004) (Figura 9).

1.8 Sinalização pelo TNFR2

Enquanto TNFR1 é constitutivamente expresso na maioria dos tecidos, TNFR2 é tipicamente encontrado em células do sistema imunológico. TNFR2 contém o domínio extracelular semelhante ao do TNFR1, entretanto, a principal diferença desses dois receptores encontra-se em seus domínios citoplasmáticos, o que resulta em diferentes modos de transdução de sinais (IHNATKO; KUBES, 2007). Receptores da superfamília TNFR que contém o domínio de morte citoplasmático, tal como TNFR1 e Fas, sinalizam principalmente através do recrutamento de moléculas de sinalização que também possuem domínio de morte como TRADD, FADD e RIP. Por outro lado, receptores dessa família que não apresentam o domínio de morte, tal como TNFR2, sinalizam através da ligação direta a membros de uma família de moléculas chamadas fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), os quais se ligam a moléculas de TNFR e a algumas outras proteínas celulares através de seu domínio TRAF-C (ASHKENAZI; DIXIT, 1998; GRECH et al., 2005). Até o momento, seis TRAFs foram identificadas e são chamadas TRAF1 a TRAF6. Especificamente, TNFR2 interage com TRAF1 e TRAF2, e possivelmente com TRAF3. (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

O TNFR2 é preferencialmente ativado pelo TNF de membrana. A ligação do TNF ao TNFR2 causa a trimerização do receptor e resulta no direto recrutamento de TRAF2 para o sítio de ligação TRAF localizado na porção citoplasmática do TNFR2. Isso então leva ao recrutamento de TRAF1 que interage com TNFR2 indiretamente através da formação de um complexo heterodimérico com TRAF2. O heterocomplexo TRAF2-TRAF1 recruta então as proteínas inibidoras celulares de apoptose cIAP-1 e cIAP-2. Este complexo de sinalização formado por TRAF2, TRAF1, cIAP1/2 induz a ativação dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1 através das vias IKK e JNK respectivamente,

gerando um sinal de sobrevivência mediado pelo TNFR2 (**Figura 10**) (CABALHIERRO; LAZO, 2012; ROTHE et al., 1994; ROTHE et al., 1995).

Devido a suas funções, TRAF2 atua como um mediador chave na sinalização do TNFR2. Sob certas condições, o TNFR2 pode desencadear a degradação de TRAF2, que conseqüentemente finaliza a sinalização que conduz a ativação dos fatores de transcrição. Assim, o receptor funciona como um regulador da sua própria atividade biológica através da modulação da concentração intracelular de TRAF2 (CABALHIERRO; LAZO, 2012).

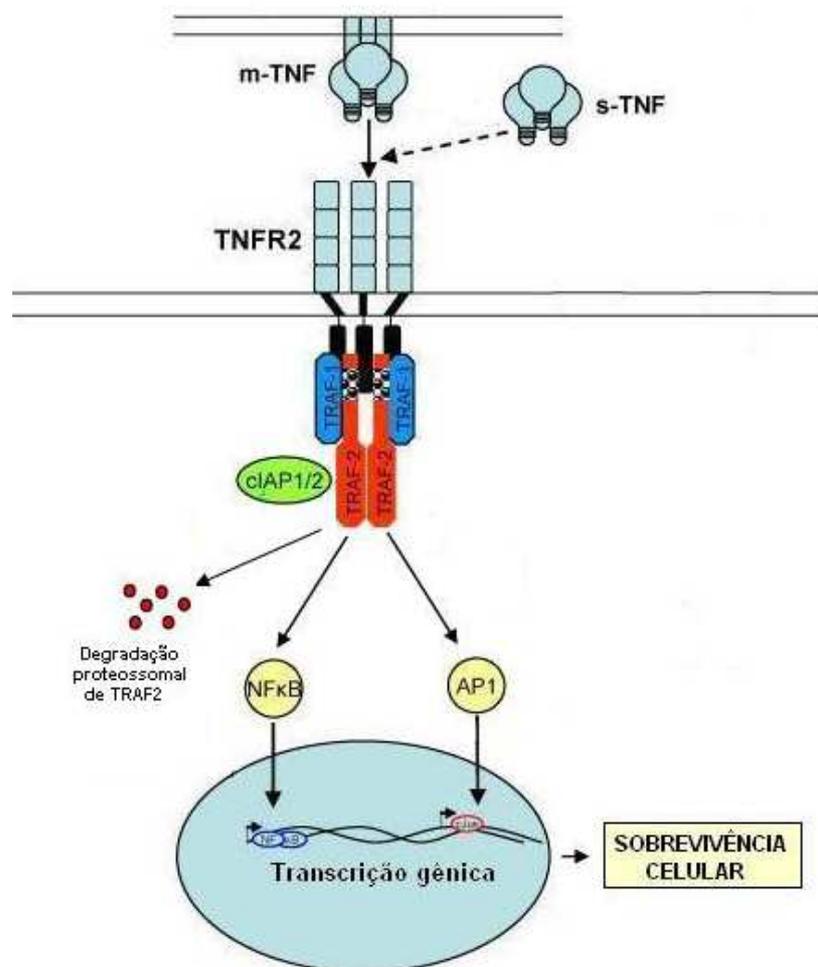


Figura 10. Sinalização pelo TNFR2.
Fonte: Adaptado de KRUGLOV et al. (2008).

1.9 Comunicação cruzada “Cross-talk” entre TNFR1 e TNFR2

A sinalização iniciada pelo TNFR2 induz primariamente sinais de sobrevivência celular. Entretanto, tem sido sugerido que o TNFR2 pode também desempenhar um importante papel na regulação da apoptose. Alguns pesquisadores têm relatado que a estimulação do TNFR2 não dispara diretamente o programa de apoptose, mas pode potencializar a apoptose induzida pelo TNFR1, o que sugere que alguma forma de comunicação cruzada “cross-talk” pode ocorrer entre TNFR1 e TNFR2 (GUPTA, 2002). Vários mecanismos têm sido propostos para explicar esta observação.

Tartaglia et al. (1993), sugeriram que o TNFR2 poderia atuar regulando a taxa de associação do TNF- α com TNFR1, possivelmente através do aumento da concentração de TNF- α na superfície celular, o que ocorreria por meio do recrutamento de moléculas de TNF- α e sua transferência para o TNFR1, num modelo de passagem-do-ligante, e desta forma aumentaria a ligação e a sinalização através do TNFR1 (TARTAGLIA et al., 1993; DRI et al., 1999).

Grell et al. (1999), mostraram que a estimulação do TNFR2 leva a um aumento da produção endógena de TNF ligado a membrana, o qual posteriormente ativaria TNFR1 de uma forma autotrópica e paratrópica, resultando em aumento de apoptose induzida por este receptor.

Weiss et al. (1998), demonstraram que, em células HeLa, o TNFR2 aumenta a apoptose induzida pelo TNFR1 através de um mecanismo baseado na anulação da sinalização anti-apoptótica dependente de TRAF2, molécula que participa da sinalização de ambos TNFR1 e TNFR2, desempenhando um papel crucial na ativação das vias NF- κ B e JNK, as quais são essenciais para a sobrevivência celular. De acordo com estas observações, Chan e Lenardo (2000) constataram que a estimulação do

TNFR2 por si só não causa apoptose em células T Jurkat, no entanto, este sinal potencializa a indução de apoptose pelo TNFR1. Esse efeito causado pela estimulação do TNFR2 foi associado ao esgotamento de TRAF2 e a conseqüente redução dos fatores anti-apoptóticos associados ao TRAF2 (GUPTA, 2002; WAJANT et al., 2003).

Enfim, esses estudos demonstram que, em algumas condições, o TNFR2 pode interferir na sinalização apoptótica mediada pelo TNFR1 e sugerem que o “cross-talk” entre TNFR1 e TNFR2 (**Figura 11**) pode desempenhar um importante papel no resultado final da sinalização iniciada pelo TNF- α .

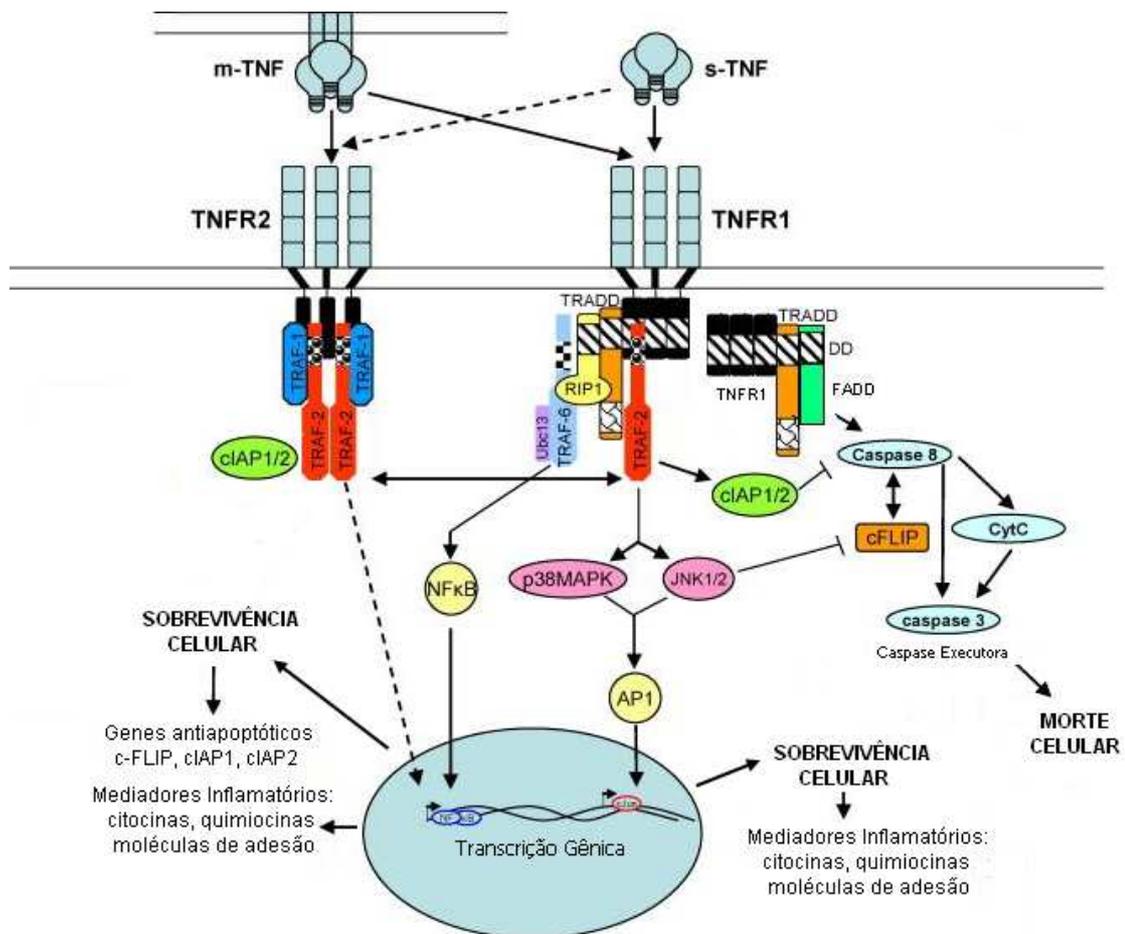


Figura 11: Cross-talk TNFR1 e TNFR2.

Fonte: Adaptado de KRUGLOV et al.(2008).

1.10 Receptores solúveis de TNF (sTNFR)

Para aumentar a complexidade do sistema de sinalização TNF-TNFR, tanto TNFR1 como TNFR2, que são inicialmente sintetizados como proteínas ligadas a membrana, podem liberar seus domínios extracelulares por clivagem proteolítica, num processo chamado de “shedding ectodomain”, formando moléculas solúveis dos receptores, denominadas sTNFR1 e sTNFR2, as quais são capazes de se ligar ao TNF- α (BROCKHAUS, 1997; XANTHOULEA et al., 2004).

O processo de “shedding” resulta na redução do número de moléculas dos receptores de TNF na superfície celular, o que pode transitoriamente insensibilizar as células a ação do TNF- α . Além disso, essas formas solúveis liberadas podem competir pelo TNF- α com os receptores de superfície celular e assim bloquear a atividade dessa citocina (ADERKA, 1996; XANTHOULEA et al., 2004). Considerando tais ações, foi sugerido que os receptores solúveis de TNF (sTNFR) funcionariam como antagonistas naturais do TNF- α . Entretanto, foi proposto que quando as concentrações de sTNFR são menores, eles podem aumentar a atividade do TNF- α por estabilizar e preservar as moléculas bioativas de TNF solúvel, prolongando a disponibilidade do TNF- α para ligação com os receptores na superfície celular, funcionando assim como agonistas do TNF- α (ADERKA et al., 1992; DAI et al., 2005).

Percebe-se assim, que as interações entre os receptores solúveis de TNF (sTNFR) e seu ligante são muito mais complexas do que se pensava inicialmente, pois os sTNFR podem funcionar tanto como antagonistas como agonistas do TNF- α . Esses receptores solúveis são constitutivamente liberados para a circulação (PINCKARD et al., 1997; XANTHOULEA et al., 2004) e seus níveis aumentam durante o curso de varias doenças (DIEZ-RUIZ et al., 1995; XANTHOULEA et al., 2004). Neste contexto, o

mecanismo ativo de “shedding” do receptor pode tanto aumentar como limitar a ação da citocina, e conseqüentemente influenciar o balanço entre resistência e susceptibilidade a doenças (XANTHOULEA et al., 2004; PALAND et al., 2008). Portanto, verifica-se que a função dos receptores de TNF não são limitadas apenas a transdução de sinais, mas incluem, em suas formas solúveis, funções regulatórias extracelulares que afetam a biodisponibilidade sistêmica ou local de TNF- α .

1.11 Importância do TNF- α e dos receptores de TNF durante a infecção pela micobactéria

A citocina próinflamatória TNF- α é essencial para a resposta imune na infecção com *M. tuberculosis* e não pode ser substituída por outra citocina. A superprodução de TNF pode causar imunopatologia, entretanto a produção deficiente resulta em infecção descontrolada (BEKKER et al., 2000; QUESNIAUX et al., 2010). O TNF- α é uma das primeiras citocinas produzidas pelos macrófagos alveolares após o reconhecimento da micobactéria através dos TLRs (GARCIA et al., 2011).

O papel crítico do TNF- α no controle da tuberculose tem sido ilustrado recentemente, pelo aumento do risco de infecção primária ou reativação de infecção latente em pacientes que recebem terapia farmacológica anti-TNF, para tratamento de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide ou doença de Crohn (ALGOOD et al., 2004; QUESNIAUX et al., 2010; RAY et al., 2009). A importância do TNF na geração e manutenção de uma resposta imune protetora contra o *M. tuberculosis*, também tem sido demonstrada em modelos murinos. Estudos realizados em camundongos com deleção gênica de TNF, infectados com espécies de micobactérias de diferentes virulências, demonstraram que, embora o TNF- α não seja

necessário para a geração de uma resposta de células T antígeno específica, ele é essencial para controlar o recrutamento de células inflamatórias para os sítios de infecção e para o desenvolvimento de uma resposta granulomatosa protetora, com a contenção do crescimento de bacilos e a sobrevivência dos animais infectados (BEAN et al., 1999; SAUNDERS et al., 2005).

O TNF- α está envolvido em quase todas as fases de resposta inflamatória, desde a resposta inicial dos macrófagos a presença da micobactéria, até a migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos e sua retenção no local da infecção (GARCIA et al., 2011; SAUNDERS et al., 2005). Dentre as múltiplas funções imunológicas do TNF- α durante a infecção com a micobactéria, pode-se destacar: (1) Recrutamento de células imunes para o local da infecção, através do aumento de moléculas de adesão e regulação da produção de quimiocinas por macrófagos (ALGOOD et al., 2004; ROACH et al., 2002); (2) Ativação dos macrófagos, em conjunto com a citocina IFN- γ , os quais aumentam a capacidade dessas células de eliminar a micobactéria intracelular (FLESCHE; KAUFMANN, 1990; HEHLGANS; PFEFFER, 2005; RAY et al., 2009); (3) Regulação da atividade de outras citocinas pró-inflamatórias (ALGOOD et al., 2004; HODGE-DUFOUR et al., 1998); (4) Influência na sinalização secundária de macrófagos para a produção de NO (GORDON, 2003) e (5) Indução de apoptose de macrófagos infectados (BALCEWICZ-SABLINSKA et al., 1998; HEHLGANS; PFEFFER, 2005; RODRIGUES et al., 2009; ROJAS et al., 1999). A maioria das atividades do TNF durante a infecção pela micobactéria tem sido atribuídas a sua forma solúvel, entretanto, na ausência desta, a forma do TNF ligada a membrana parece desempenhar também um importante papel no controle da infecção aguda na tuberculose (SAUNDERS et al., 2005).

Assim como a citocina TNF- α , a sinalização através do TNFR1 parece ser igualmente essencial para a resistência do hospedeiro à infecção pela micobactéria. Flynn et al. (1995), verificaram que camundongos com deficiência TNFR1 (TNFR1^{-/-}), infectados com *M. tuberculosis* rapidamente sucumbem à infecção e apresentam maior número de bacilos quando comparado a camundongos selvagens. Nos camundongos TNFR1^{-/-}, granulomas foram formados em igual número aos animais controles, entretanto apresentavam-se fracamente organizados e com muitas áreas necróticas. Além disso, nos camundongos TNFR1^{-/-}, a produção de espécies reativas de nitrogênio (RNI) por macrófagos foi prejudicada durante o início da infecção. Esses resultados sugerem que a sinalização através do TNFR1 desempenha um papel protetor na resposta imune contra a micobactéria, sendo que este papel parece estar relacionado com a ativação dos macrófagos e a subsequente destruição do bacilo intracelular, por RNI, ou por um mecanismo alternativo, como por exemplo a indução da apoptose da célula infectada.

A importância da sinalização pelo TNFR1 na formação e manutenção do granuloma também foi comprovada por Ehlers et al. (2000), os quais constataram que, em camundongos TNFR1^{-/-} infectados com *M. avium* ocorre desintegração dos granulomas com aumento da presença de células T nas lesões desintegradas. A ausência da apoptose mediada pelo TNFR1 pode estar relacionada com o acúmulo dessas células T, que por sua vez induziriam a apoptose de outras células inflamatórias levando a desintegração dos granulomas. Portanto, a sinalização mediada pelo TNFR1 pode ser uma parte integrante do “feedback” entre macrófagos e células T que normalmente ocorre para controlar e regular a resposta inflamatória potencialmente prejudicial durante a infecção por micobactérias.

Embora alguns estudos tenham demonstrado a importância do TNFR1 na resistência do hospedeiro a infecção por micobactérias, o papel do TNFR2 na imunidade antimicobacteriana ainda não é conhecido. Jacobs et al., (2000) comparando camundongos deficientes em TNFR1 ou TNFR2 infectados com *Mycobacterium bovis* BCG, observaram que camundongos TNFR1 deficientes foram altamente susceptíveis a infecção e sucumbiram, entre 4 e 5 semanas, confirmando os resultados de outros grupos. Neste estudo, a incapacidade dos animais TNFR1 deficientes de eliminar a infecção foi associada com uma redução da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH) ao derivado protéico purificado (PPD), e ao grave comprometimento na formação de granulomas com redução no recrutamento e ativação de macrófagos e menor expressão de moléculas de adesão. Em contraste, os camundongos TNFR2-deficientes desenvolveram resposta DTH normal e granulomas micobactericidas maduros, assim como os camundongos selvagens. Sugeriram então, que a imunidade anti-micobacteriana é amplamente dependente da via de sinalização do TNF-TNFR1, enquanto que a ativação do TNFR2 desempenha um menor papel.

1.12 Modulação da sinalização TNF-TNFR por patógenos

A sinalização através do TNFR1 parece desempenhar importante papel não só na infecção por micobactérias. Camundongos TNFR1 deficientes são incapazes de controlar a replicação de *Listeria monocytogenes* em fagócitos, embora o sistema de defesa antimicrobiano que gera intermediários reativos de oxigênio e nitrogênio não seja prejudicado nestes camundongos (ENDRES et al., 1997).

Da mesma forma, camundongos TNFR1 deficientes infectados com os parasitas intracelulares *Leishmania major* ou *Trypanosoma cruzi* apresentam maior parasitemia e mortalidade quando comparado aos animais selvagens (CASTANOS-VELEZ et al., 1998; NASHLEANAS et al., 1998). Adicionalmente foi demonstrado um papel crucial do TNFR1, mas não para TNFR2, na Toxoplasmose murina (DECKERT-SCHLUTER, 1998). Em contraste, na infecção por *Histoplasma capsulatum* ambos os receptores demonstraram uma influência fundamental no controle da infecção primária, embora camundongos TNFR1 deficientes tenham apresentado maior susceptibilidade do que os camundongos TNFR2 deficientes (ALLEENDOERFER; DEEPE, 2000).

Portanto, muitas evidências indicam que o TNF- α e seus receptores, em especial o TNFR1 que parece ser o principal responsável pela maioria das funções biológicas do TNF, desempenham um papel chave na resistência *in vivo* a uma variedade de microorganismos, uma vez que medeiam a atividade microbicida de macrófagos e, em nível tecidual, a inflamação aguda e crônica.

Considerando a importância da sinalização TNF-TNFR na resposta imune a diversas infecções, não é difícil imaginar que alguns patógenos tenham desenvolvido a capacidade de regular a interação do TNF- α com seus receptores e assim inibir as funções antimicrobianas dessa citocina.

Foi demonstrado que *Shigella sp.* reduz a expressão dos receptores de diversas citocinas, incluindo o TNFR1, o que pode estar relacionado ao shedding do receptor ou a internalização induzida pela citocina (RAQIB et al., 1995). O vírus Epstein-Barr também reduz a expressão do TNFR1, através da inibição de seu promotor, prevenindo a apoptose mediada pelo TNF- α e contornando assim os efeitos antivirais dessa citocina (MORRISON et al., 2004).

Outro exemplo é o citomegalovírus humano, que também impede as atividades do TNF- α reduzindo a expressão do TNFR1 na superfície celular durante o curso da infecção (BAILLIE et al., 2003). Adicionalmente foi visto que o citomegalovírus murino, reduz não só a expressão do TNFR1, mas também do TNFR2, sendo que a redução da expressão do TNFR2 ocorreu através da inibição do RNA mensageiro do receptor, enquanto que a redução da expressão do TNFR1 provavelmente envolveu um mecanismo pós-transcricional (POPKIN; VIRGIN, 2003).

Em relação ao adenovírus, resultados conflitantes e/ou complementares são encontrados na literatura. Chin e Horwitz (2006), demonstraram que o adenovírus apresenta um complexo chamado de receptor de internalização e degradação (RID), o qual reduz a expressão de TNFR1 na superfície celular, inibindo portanto a ativação do fator NF- κ B. Essa redução seria causada pelo aumento da degradação do TNFR1 internalizado que se associa com RID na membrana plasmática. Já o grupo de Scheneider-Brachert et al. (2006), constataram que uma determinada proteína do adenovirus, denominada E3-14.7K (14.7K), impede a internalização do TNFR1, resultando na inibição da formação do DISC e consequentemente da apoptose induzida pelo TNF- α .

Vale ainda destacar os recentes estudos de Paland et al. (2008), realizados com a bactéria intracelular obrigatória *Chlamydia trachomatis*. Esses pesquisadores demonstraram que durante a infecção com essa bactéria, ocorre redução seletiva da expressão de TNFR1 na superfície das células infectadas. Essa redução foi atribuída ao shedding do receptor e ao recrutamento do TNFR1 para vacúolos endossomais contendo a bactéria intracelular, os quais são conhecidos como inclusões clamidiais.

1.13 Relação entre o TNF- α e seus receptores e a apoptose de macrófagos durante a infecção pela micobactéria

O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno extraordinariamente bem sucedido que consegue infectar latentemente quase um terço da humanidade e é responsável por cerca de dois milhões de mortes por ano. O sucesso deste patógeno está intrinsecamente ligado à sua capacidade de manipular o meio intracelular das células hospedeiras, principalmente os macrófagos, que são o local preferido para a persistência intracelular e crescimento da micobactéria (PORCELLI; JACOBS, 2008).

A manipulação de processos ligados à morte da célula hospedeira é uma estratégia bem conhecida de muitos vírus e também de algumas bactérias intracelulares. Coerente com sua capacidade de evadir da resposta imune, tem sido demonstrado que cepas virulentas da micobactéria também teriam a capacidade de modular a apoptose dos macrófagos infectados. Entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo de modulação ainda precisam ser elucidados e devem ser investigados, pois podem constituir possíveis alvos no desenvolvimento de uma nova vacina e novos medicamentos contra a tuberculose. Além disso, são importantes na compreensão dos fatores que levam a infecção inicial ou reativação da doença em algumas pessoas e ao controle da infecção em outras.

Muitas evidências indicam que a sinalização através dos receptores de TNF exerce importante papel protetor na infecção contra micobactérias. Este papel, possivelmente está relacionado com as inúmeras funções que o TNF- α desempenha na resposta imune ao *Mycobacterium*, incluindo a indução da apoptose da célula hospedeira, a qual tem sido identificada como um mecanismo de defesa alternativo durante a fase inicial da infecção.

Em estudo prévio realizado por nosso grupo (RODRIGUES et al., 2009), foi observado que a cepa virulenta de *Mycobacterium bovis* possui a capacidade de modular a apoptose dos macrófagos infectados, o que parece estar estreitamente relacionado com a citocina TNF- α , uma vez que constatamos uma relação direta entre os níveis de TNF- α e apoptose dos macrófagos pulmonares. Neste contexto, é possível que a micobactéria virulenta manipule a sinalização do TNF- α para promover a sobrevivência ou a morte celular, pois conforme explanado, a sinalização do TNF- α através dos seus receptores, principalmente o TNFR1, leva a ativação de complexos de sinalização que podem tanto ativar a cascata apoptótica como as vias anti-apoptóticas do NF- κ B e JNK.

Enfim, dada à importância do sistema TNF-TNFR na resistência a uma variedade de microorganismos e considerando que alguns patógenos desenvolveram mecanismos para subverter esta sinalização anulando assim as ações do TNF- α , é possível hipotetizar que a cepa virulenta de *M. bovis* possa modular a apoptose dos macrófagos alveolares por interferir na sinalização entre o TNF- α e seus receptores. Essa interferência pode ser mediada em vários níveis, incluindo, a regulação da expressão do ligante e do receptor na superfície celular, tanto a nível transcricional como pós-transcricional, inativação da ação do ligante através do shedding do receptor, entre outros.

Portanto, o estudo da expressão dos receptores de TNF após a infecção com a micobactéria e sua relação com a apoptose de macrófagos torna-se importante para o aprofundamento dos conhecimentos relacionados à modulação da apoptose durante a infecção pela micobactéria.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar, em modelo murino, a influência da sinalização TNF-TNFR na modulação da apoptose de macrófagos alveolares, durante a fase inicial da infecção pelas cepas virulenta e atenuada de *Mycobacterium bovis*, bem como, a possível interferência da micobactéria nesse sistema de sinalização.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão dos receptores de TNF na superfície de macrófagos alveolares após a infecção com as cepas virulenta e atenuada de *Mycobacterium bovis* e correlacionar a expressão desses receptores com a ocorrência da apoptose dos macrófagos.
- Avaliar os níveis de receptores solúveis de TNF e da citocina TNF- α em fluidos pulmonares após a infecção com as cepas virulenta e atenuada de *M. bovis*.
- Avaliar a expressão de RNA mensageiro dos receptores de TNF, após a infecção com as cepas virulenta e atenuada de *M. bovis*.
- Avaliar o efeito do bloqueio da sinalização TNF-TNFR1 sob a modulação da apoptose de macrófagos, durante a infecção com *M. bovis*, em camundongos deficientes em TNFR1 (TNFR1^{-/-}).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e grupos experimentais

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, machos, de 8-10 semanas de idade, provenientes do Biotério CEBIO do ICB da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Nos experimentos onde avaliou-se os efeitos do bloqueio da sinalização TNF-TNFR1, foram utilizados animais deficientes para o receptor TNFR1 (TNFR1^{-/-}) machos, de 8-10 semanas de idade doados pelo Dr. João Santana da Silva, da USP / Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia do ICB-UFJF, sob condições livres de patógenos, 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 em Experimentação Animal da UFJF, através do protocolo nº 007/2009-CEEA.

Para cada experimento os camundongos foram divididos em três grupos de 12 animais, sendo: (1) infectados com cepa atenuada de *M. bovis* (BCG – subcepa Moreau); (2) infectados com cepa virulenta de *M. bovis* (ATCC19274) e (3) controles não infectados. Os animais foram sacrificados para análises após 3 e 7 dias de infecção.

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 Atauilho 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 (Phosphate-Buffered Saline) estéril. A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para 1×10^6 bactérias em 50 μ l de PBS usando a escala padrão de McFarland. A viabilidade do inóculo, bem como a confirmação da sua concentração, foram determinadas através de diluição seriada da suspensão e plaqueamento em meio Lowenstein-Jensen.

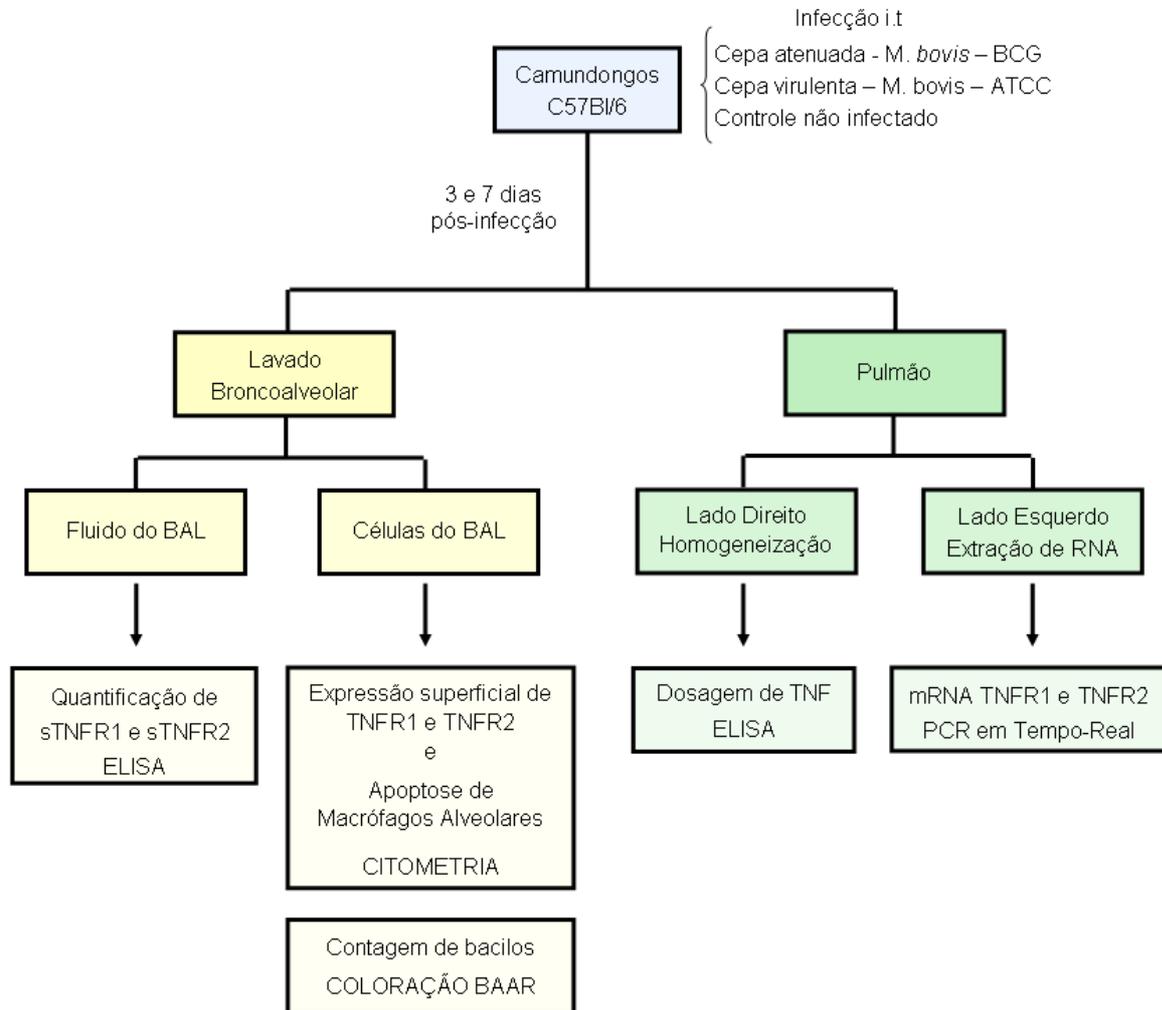
3.3 Infecção por via intratraqueal

Para estabelecimento da infecção pulmonar, a micobactéria foi injetada por via intratraqueal (i.t) 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 1×10^6 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 levemente vertical até o término do efeito da anestesia. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas de biossegurança e os 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 Lavado Broncoalveolar (BAL)

Neste trabalho foi utilizada a técnica do Lavado Broncoalveolar (BAL) para obtenção das células pulmonares (CROWELL et al., 1992; GARN, 2006). Para tal, os animais foram sacrificados no 3º e no 7º dia após a infecção por superdose de anestesia (0.9% NaCl, 2% xilazina, 5% ketamina). A traquéia dos camundongos foi exposta com o auxílio de material cirúrgico (pinça e tesoura pequenas) e em seguida foi delicadamente canulada com um cateter intravenoso (20G), o qual foi fixado com uma linha, a fim de que se mantivesse uma posição adequada, evitando assim que a cânula provocasse ferimento no pulmão ou saísse da traquéia. Com auxílio de uma seringa foi injetado vagarosamente 1 ml de PBS gelado, o qual foi aspirado e injetado novamente até que se completasse 6 lavagens broncoalveolares. A suspensão celular obtida através do BAL foi então acondicionada em tubo plástico cônico e mantida no gelo. Logo após, foi centrifugada a 1400 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e estocado a -80°C, para posterior dosagem dos receptores solúveis de TNF. As células sedimentadas foram ressuspensas em meio RPMI-1640 (Sigma) com 10% Soro Fetal Bovino (RPMI/SFB 10%) contadas em câmara de Neubauer (método Trypan) e utilizadas para confecção de lâminas em citocentrífuga e para análises por citometria de fluxo.

3.5 Desenho experimental dos estudos “*in vivo*”



3.6 Análise da expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na superfície de macrófagos alveolares por citometria de fluxo

Para avaliar a expressão dos receptores de TNF na superfície dos macrófagos alveolares, após 3 e 7 dias de infecção, as células pulmonares obtidas através do lavado broncoalveolar, como anteriormente descrito, foram lavadas e ressuspensas em 100 µl de tampão de marcação (PBS / 0,1% NaN₃ / 2% SFB) contendo os

anticorpos específicos para TNFR1 (3H3104 - Santa Cruz Biotechnology) ou TNFR2 (TR75-89 - Santa Cruz Biotechnology), CD11b (BD-Pharmingen) e CD11c (BD-Pharmingen), conjugados com diferentes fluorocromos (FITC, PE, APC), nas concentrações indicadas pelos fabricantes. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas em tampão de marcação, centrifugadas a 1400 rpm por 10 min a 4°C, ressuspendidas em 300 µl de tampão de marcação e analisadas em citômetro de fluxo (FACScalibur – BD), por meio de software específico (CellQuest – BD). As amostras foram mantidas no gelo e as leituras foram realizadas em um intervalo máximo de 3 horas.

A população de macrófagos alveolares foi selecionada segundo suas características de tamanho (FSC = Forward Scatter) e granulosidade (SSC = Side Scatter) e de acordo com a expressão de CD11b e CD11c conforme descrito por Gonzalez-Juarrero et al. (2003). A expressão dos TNFRs nesta população foi avaliada de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI).

3.7 Análise da apoptose de macrófagos alveolares

Para avaliar a frequência da apoptose dos macrófagos alveolares nos 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 aminofosfolípideo 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 iodeto de propídeo 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 então avaliar simultaneamente as diferentes populações de células marcadas ou não com Anexina V e coradas ou não com iodeto de propídeo (PI). 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⁺). Alternativamente pode ser usado o corante 7-AAD para substituir o iodeto de propídeo.

Após 3 e 7 dias de infecção, as células pulmonares obtidas através do BAL, como anteriormente descrito, foram lavadas com 500 µl de solução tampão de Anexina (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,8 mM CaCl₂) e posteriormente ressuspendidas em 100 µl de tampão Anexina contendo Anexina-V a uma concentração final de 1:500. A solução foi agitada suavemente e incubada por 20 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após este período, foram adicionados em cada tubo, 400µl de solução tampão Anexina e 40 µl (100µg/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 e células marcadas somente com PI.

A população de macrófagos alveolares foi selecionada segundo suas características de tamanho (FSC = Forward Scatter) e granulosidade (SSC = Side Scatter) e de acordo com a expressão de CD11b e CD11c, conforme já mencionado. Gráficos tipo “Dot plot” (Anexina-V x PI) desta população foram gerados e a porcentagem de macrófagos apoptóticos (Anexina V⁺/ PI⁺) foi determinada.

3.8 Determinação da concentração de receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) no lavado broncoalveolar

A concentração dos receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) foi mensurada no sobrenadante do BAL dos animais infectados e controles, através do método de ELISA, utilizando-se o kit DuoSet ELISA Development (R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, placas de ELISA (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-sTNFR1 ou anti-sTNFR2, diluídos em PBS, e incubadas por 18h a temperatura ambiente. 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 1% BSA (PBS/BSA 1%), por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e as amostras de sobrenadante do BAL, bem como os padrões da curva, foram adicionadas e incubadas por 18h a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas. Em seguida foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado, diluído em PBS/BSA 1% e as placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas e o complexo detector formado pelo conjugado estreptavidina-peroxidase foi adicionado e as placas incubadas por mais 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da

solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) mais peróxido de hidrogênio e incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura foi imediatamente realizada em leitor de placas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As concentrações dos receptores solúveis foram calculadas a partir da curva-padrão, obtida pelas diferentes concentrações dos padrões.

3.9 Determinação da concentração de TNF- α no pulmão

A concentração da citocina TNF- α foi avaliada no homogeneizado do pulmão dos animais infectados e controles. O homogeneizado do pulmão foi obtido conforme a técnica descrita em Soares et al. (2003). Brevemente, amostras de pulmão coletadas no 3º e 7º dia de infecção e armazenadas a -20°C, foram descongeladas e 100 mg do tecido pulmonar de cada animal foram homogeneizados, com auxílio de um pistilo, em 1 ml de solução de extração de citocinas contendo, PBS-Tween 20 (0,05%), 0,1 mM PMSF (Metil Sulfonil Fluoride), 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C. Posteriormente, essas amostras de homogeneizado foram utilizadas para detecção da citocina através da técnica de ELISA de captura, descrita a seguir.

Placas de ELISA (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF diluído 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, bem como os padrões da curva foram adicionados e incubados 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. 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. A quantidade da citocina foi calculada a partir da curva-padrão, obtida pelas diferentes concentrações da citocina recombinante.

3.10 Avaliação da expressão gênica de TNFR1 e TNFR2 por PCR em Tempo-Real

A quantificação relativa de RNA mensageiro (mRNA) dos receptores TNFR1 e TNFR2 foi avaliada nos pulmões dos animais infectados e controles através de PCR em Tempo-Real. Todas as etapas da reação foram realizadas com a colaboração do Dr. Marco Antonio Machado na EMBRAPA-CNPGL, Juiz de Fora, MG, conforme descrito a seguir.

3.10.1 Extração de RNA total e reação de transcrição reversa para obtenção de DNA complementar

Após 3 e 7 dias de infecção, amostras de pulmão dos camundongos infectados e controles foram coletadas e armazenadas em RNA later a -80°C. Posteriormente, as amostras foram removidas, pesadas e aproximadamente 5 mg do tecido pulmonar foi

rompido e homogeneizado utilizando o aparelho TissueRuptor (Qiagen, Alemanha) na presença de tampão de lise, durante 45 a 90 segundos. A extração do RNA total dos pulmões foi realizada utilizando-se o Kit RNeasy Mini (Quiagen), segundo especificações do fabricante, permitindo a obtenção de material com grau de pureza satisfatório. As amostras de RNA total foram quantificadas por nanoespectrofotometria através do NanoDrop ND1000 (NanoDrop, EUA) e qualificadas através do 2100 Bioanalyzer (Agilent, EUA) para verificar a integridade do RNA.

A seguir, as amostras de RNA total foram submetidas à reação de transcrição reversa (RT) para obtenção de DNA complementar (cDNA). Para esta reação foi utilizado o kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, EUA) conforme as instruções do fabricante. O cDNA produzido foi armazenado a -20°C até o momento da realização da PCR em Tempo-Real.

3.10.2 Quantificação relativa do cDNA por PCR em Tempo-Real

As quantificações relativas do cDNA das amostras de pulmão foram realizadas utilizando a metodologia de PCR em Tempo-Real. As reações foram feitas utilizando-se o kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantidade de cDNA e a concentração de primer utilizados foram os que demonstraram maior eficiência no processo de padronização das reações. Os seguintes *primers* foram utilizados: (TNFR1) 5'-GCCTCC CGCGATAAAGCCAACC e 5'-CTTTGCCCACTTTTCACCCACAGG (ZHANG et al., 2008) e (TNFR2) 5'-GAAAACCCATTCTGGCAG CTGTCTG e 5'-CAGGATG CTACAGATGCGGTGG (RANDALL et al., 2008). O gene HPRT foi utilizado como controle endógeno. As temperaturas de ligação dos primers foram de 60°C para TNFR1 e TNFR2 e de 53°C para HPRT.

Brevemente, a reação contendo cDNA, par de primers, Master Mix (dNTPs, referência passiva, SYBR® Green, etc) e 0,1 U Taq DNA Polimerase, em um volume final de 25 µL, foi incubada a 95°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, ligação na temperatura específica para cada primer por 30 segundos e extensão a 60°C por 30 segundos. Controles negativos nos quais o cDNA foi omitido durante a reação de PCR em Tempo-Real foram preparados. As amostras foram então incubadas no aparelho ABI PRISM® 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Cada amostra foi avaliada em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços (Applied Biosystems), seladas com filme adesivo óptico (Applied Biosystems) e amplificadas no aparelho ABI PRISM® 7300 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Ao final dos ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas à análise da curva de dissociação, no intuito de verificar a presença ou ausência de produtos não específicos e/ou dímeros de primer.

A quantificação foi realizada usando-se o método do Ct (cycle threshold) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo controle. O Ct corresponde ao ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar de detecção (threshold), servindo como base para comparação entre as amostras. O threshold pode ser automático, ou seja, determinado pelo próprio aparelho, ou estabelecido pelo usuário, sendo posicionado na região de amplificação exponencial ou geométrica das curvas de amplificação onde a eficiência da PCR é maior, e serve como uma referência do ponto no qual todas as amostras possuem uma mesma intensidade de fluorescência, ou seja uma mesma quantidade de produto da PCR.

3.10.3 Análise dos resultados da PCR em Tempo-Real

A análise para quantificação relativa da expressão dos genes TNFR1 e TNFR2 foi realizada de acordo com o método descrito por Pfaffl et al. (2002) que utiliza o seguinte modelo matemático:

$$\text{Expressão Relativa} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{alvo}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta C_{\text{t}}_{\text{Ref}} (\text{Ct do controle} - \text{Ct da amostra})}}$$

Onde:

E_{alvo} = Eficiência da PCR dos genes alvo.

Ct do Controle = Cycle threshold do grupo controle.

Ct da Amostra = Cycle threshold do grupo teste.

E_{Ref} = Eficiência da PCR do gene controle endógeno.

A partir deste método foi desenvolvido o software REST® (PFAFFL et al., 2002), que foi utilizado neste trabalho. O modelo estatístico Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST® presente no software REST® foi utilizado para comparar as expressões diferenciais. Este modelo foi desenvolvido com base em testes de permutação, que são uma alternativa a ser utilizada quando os testes paramétricos não podem ser usados. Estes testes obtêm resultados a partir de permutações aleatórias dos dados do experimento. Os dados de Ct são permutados (ou rearranjados) repetidamente e a estatística de teste é calculada para cada uma das permutações resultantes.

3.11 Contagem de bacilos em macrófagos alveolares

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 está relacionada à parede celular dessas bactérias que é constituída de grande quantidade de lipídeos (60 a 70 %), o que a torna extremamente difícil a penetração de corantes aquosos, visto que essas paredes são hidrofóbicas. Assim, é necessário utilizar um corante mais concentrado e medidas especiais, tal como o aquecimento, para forçar a passagem do corante através da parede bacteriana. Entretanto, após a penetração do corante nas células é muito difícil a sua remoção, mesmo que para isso se use uma mistura agressiva de álcool-ácido como agente descorante.

Um dos métodos mais utilizados para se verificar se uma bactéria é álcool-ácido resistente é a coloração de Ziehl-Neelsen. Este método consiste em se cobrir o esfregaço com fucsina fenicada, que deve ser aquecida durante o período de incubação e, em seguida tratá-lo com uma mistura de álcool (97%) e ácido clorídrico (3%) até que o esfregaço esteja totalmente descorado. Depois de lavado com água, o esfregaço é corado com azul de metileno que é o corante de contraste. Os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) que retêm a fucsina adquirem a cor deste corante (vermelho), e as demais estruturas celulares se coram pelo azul de metileno.

Portanto, como alternativa para mensurar o crescimento da micobactéria, foi utilizado a coloração de Ziehl-Neelsen em lâminas preparadas por citocentrifugação das células pulmonares obtidas no lavado broncoalveolar. 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 10

bacilos/macrófago ou mais de 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 dia de infecção foi verificada com base na alteração da porcentagem de macrófagos infectados entre os dois pontos (ZHANG et al., 1998).

3.12 Análise da expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 “*in vitro*”.

Foi realizado um estudo preliminar *in vitro* antes dos experimentos *in vivo* descritos acima. Para tal, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774A.1. Os macrófagos foram colocados em placas de 24 poços na concentração de 5×10^4 células por poço, em meio RPMI 1640 suplementado com L-glutamina (2 mM), penicilina (100 U mL^{-1}), estreptomicina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), aminoácidos não essenciais (1% v/v x 100) e 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor. Essas células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% CO₂ por 2 dias para aderência e até atingir 80% da confluência. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com *M. bovis* BCG, cuja suspensão foi preparada conforme descrito no item 3.2. Para a infecção, removeu-se o meio de cultura de cada poço e adicionou-se 100 µl da suspensão bacteriana contendo aproximadamente 3×10^7 bactérias, a fim de se obter uma multiplicidade de infecção (MOI) de aproximadamente 10 bactérias para cada célula (10:1). As células foram incubadas por 2 horas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Logo após o inóculo foi removido e as placas foram lavadas três vezes com PBS

pré-aquecido em banho-maria, a fim de se remover as bactérias não fagocitadas. Meio de cultura fresco e livre de antibiótico foi então adicionado.

Após 24, 48 e 72 horas de infecção, os macrófagos J774 foram desprendidos dos poços com “cell scrapper” e lavados três vezes com PBS. As células foram então ressuspensas em tampão de marcação (PBS / 0,1% NaN₃ / 2% SFB) contendo anticorpos monoclonais específicos para TNFR1 (3H3104) e TNFR2 (TR75-89) (Santa Cruz Biotechnology) ou os isótipos controles correspondentes e incubadas por 30 min a 4°C no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de marcação e analisadas por citometria de fluxo usando FACSCalibur (BD).

3.13 Análise estatística

Os resultados foram obtidos através de dois ou mais experimentos independentes e foram expressos como média \pm erro padrão (EP). Primeiramente os dados foram avaliados pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk para verificar se assumiam uma distribuição normal. Como os dados não seguiam a distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, indicado na comparação de dois grupos independentes, a fim de se verificar diferenças significativas entre os grupos estudados. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00.

4. RESULTADOS

4.1 Infecção com a micobactéria altera a expressão superficial dos receptores de TNF- α em macrófagos J774.

As interações entre o TNF- α e seus receptores inicia múltiplas vias de sinalização que podem resultar na sobrevivência ou morte das células. Esse resultado depende de vários fatores, dentre eles o nível de expressão de moléculas dos receptores de TNF (TNFRs) (HEHLGANS; PFEFFER 2005; SUM; FINK, 2007). Portanto, inicialmente foi realizado um estudo *in vitro* a fim de avaliar se a infecção com a micobactéria altera a expressão dos receptores TNFR1 e TNFR2 na superfície de macrófagos. Para tal, macrófagos J774A.1 foram infectados com *M. bovis* BCG (MOI 10:1) e a expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 foi avaliada por citometria de fluxo. A infecção com *M. bovis* BCG induziu um aumento significativo e gradual da expressão de TNFR1 na superfície dos macrófagos (**Figura 12A**). Em contraste, uma redução significativa da expressão superficial de TNFR2 foi observada nas células infectadas (**Figura 12B**).

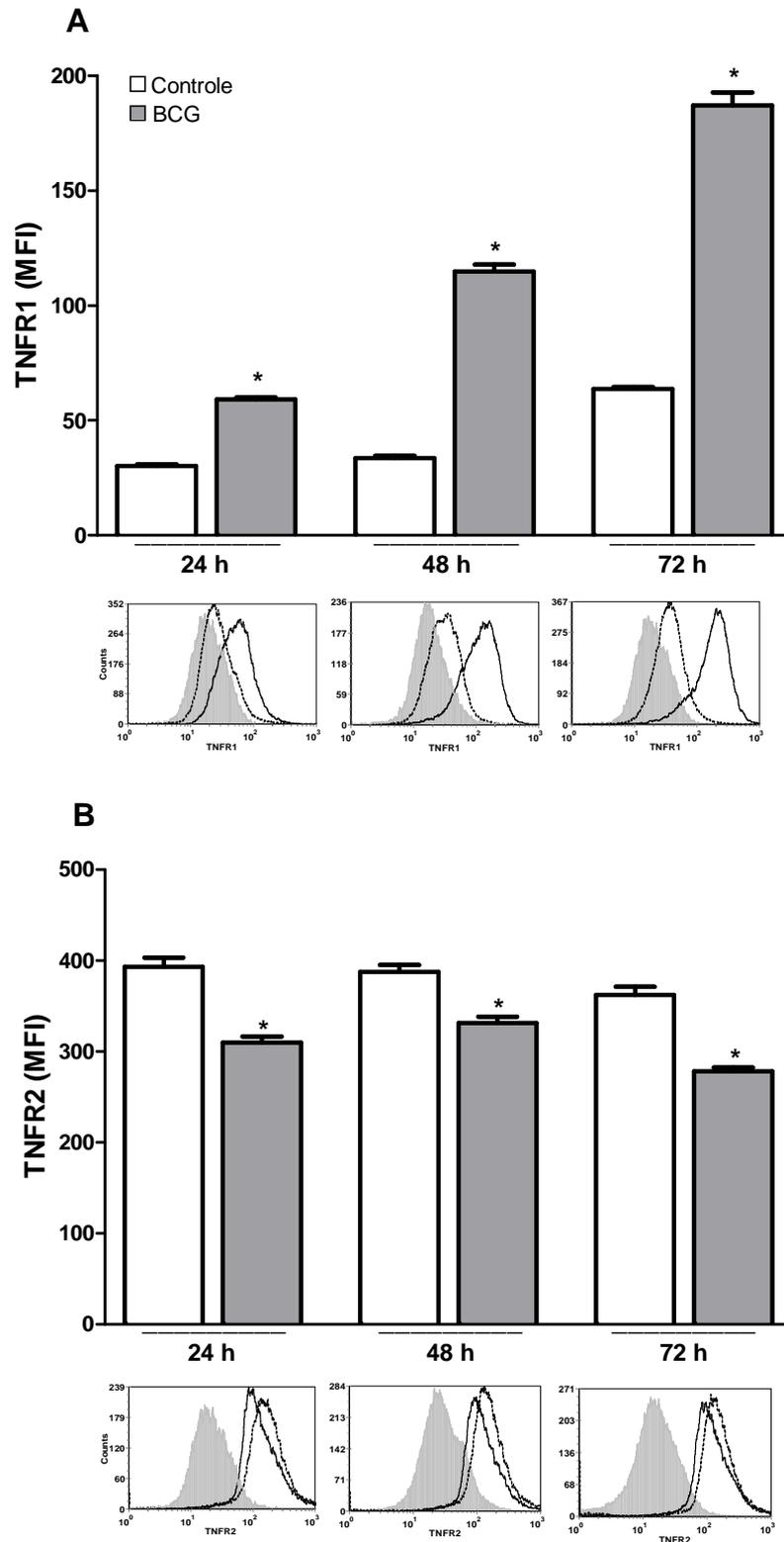


Figura 12. Expressão superficial de TNFR1 (A) e TNFR2 (B) em macrófagos J774A.1. Macrófagos J774A.1 foram infectados com *M. bovis* BCG (MOI 10:1). Após 24, 48 e 72 horas de infecção, as células foram marcadas com anti-TNFR1 e anti-TNFR2 e analisadas por citometria de fluxo. A expressão dos receptores foi avaliada de acordo com a intensidade média de fluorescência (MFI) de pelo menos 10.000 células por amostra. Cada barra representa a Média \pm EPM. * $P < 0.05$. Histogramas representativos mostram a expressão superficial de TNFR1 ou TNFR2 em células não infectadas (linha pontilhada); células infectadas com *M. bovis* BCG (linha preta) ou células marcadas com isótipo controle (área cinza claro).

4.2 Expressão de TNFR1 e TNFR2 em macrófagos alveolares após a infecção com *M. bovis* atenuado e virulento.

A seguir, para determinar *in vivo* se as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis* induzem o mesmo perfil de expressão dos TNFRs em macrófagos alveolares, camundongos C57Bl/6 foram intratraquealmente infectados com *M. bovis* atenuado (BCG) ou com *M. bovis* virulento (ATCC 19274). Após 3 e 7 dias de infecção, macrófagos alveolares obtidos através do BAL foram identificados como células CD11b⁻/CD11c^{+/high} (**Figura 13A**) e a expressão de TNFR1 e TNFR2 na superfície dessas células foi avaliada por citometria de fluxo (**Figura 13B**).

Foi observado um aumento significativo na expressão de TNFR1 em macrófagos alveolares após a infecção com a cepa atenuada tanto no 3^o como no 7^o dia de infecção. Em contraste, na infecção com a cepa virulenta, o aumento da expressão de TNFR1 ocorreu somente no 7^o dia de infecção (**Figura 13C**). No 3^o dia, a expressão de TNFR1 induzida pela cepa virulenta foi similar àquela detectada para o controle não infectado e significativamente menor do que a expressão induzida pela cepa atenuada. Enquanto que no 7^o dia, a expressão superficial de TNFR1 não diferiu significativamente entre as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis* (**Figura 13C**).

Em relação ao TNFR2, foi observado uma redução significativa na expressão deste receptor na superfície de macrófagos alveolares no 3^o e 7^o dia após a infecção com ambas as cepas de *M. bovis* (**Figura 13D**).

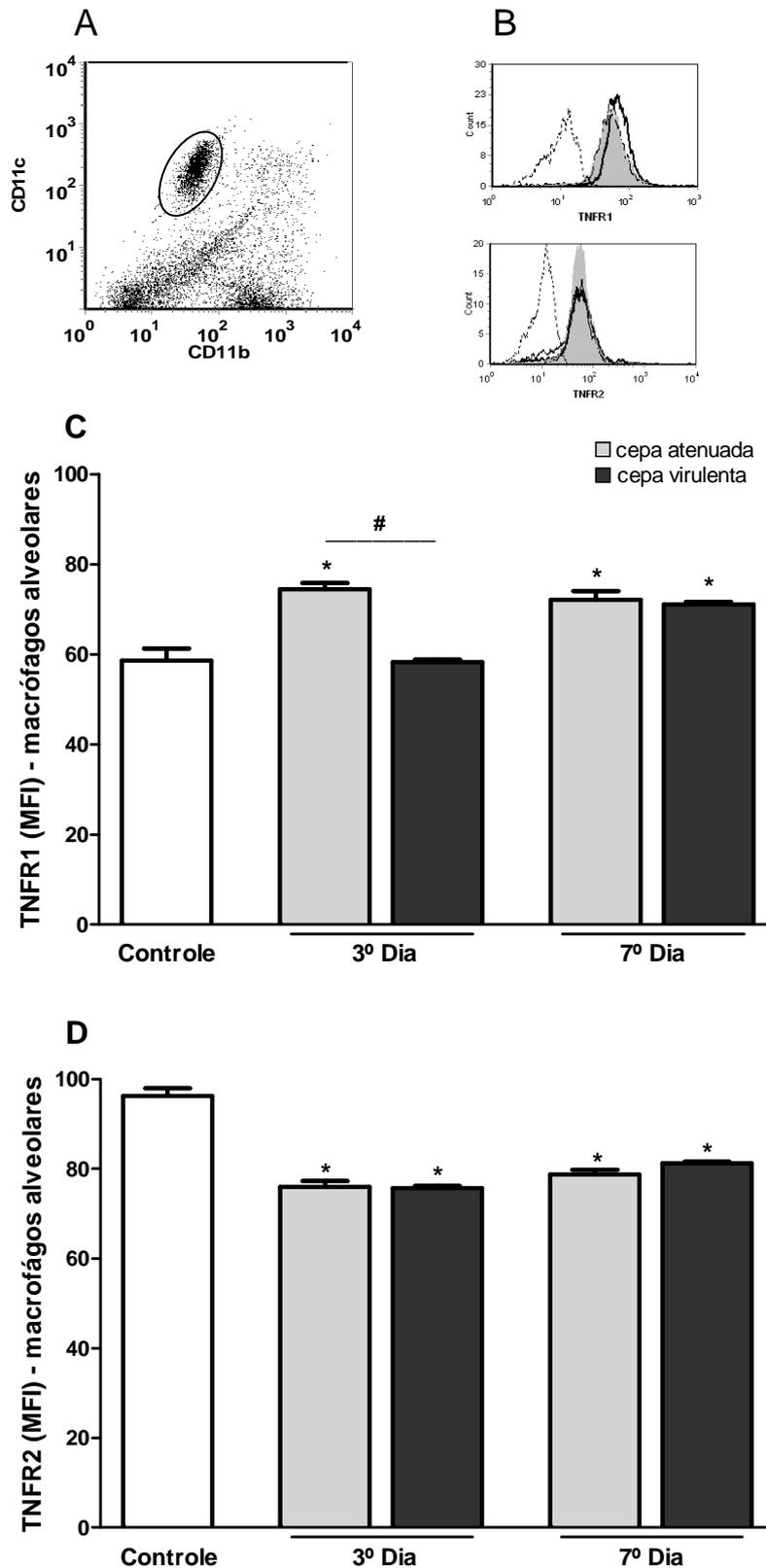


Figura 13. Expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 em macrófagos alveolares após infecção com *M. bovis*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com as cepas atenuada ou virulenta de *M. bovis*. Controles foram inoculados com PBS. Após 3 e 7 dias de infecção, as células pulmonares foram obtidas através do BAL. Macrófagos alveolares foram identificados como CD11b⁺/CD11c⁺ (A) e a expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 nesta população foi avaliada por citometria (B). Resultados da marcação para TNFR1 (C) e TNFR2 (D) foram expressos como a intensidade média de fluorescência (MFI) de pelo menos 10.000 células por amostra. Cada barra representa Média ± EPM de um experimento representativo de três com resultados similares. * $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$.

4.3 Expressão gênica de TNFR1 e TNFR2 após a infecção com *M. bovis* atenuado e virulento.

A redução da expressão de TNFR2 na superfície dos macrófagos alveolares observada após a infecção com ambas as cepas de *M. bovis*, bem como a menor expressão superficial de TNFR1 no 3º dia de infecção com a cepa virulenta, podem ter ocorrido em resposta à alteração da expressão gênica destes receptores. Portanto, foi avaliado a quantidade de RNA mensageiro (mRNA) de *TNFR1* e *TNFR2* por PCR em Tempo-Real. Foi verificado que a expressão de mRNA de *TNFR2* não foi reduzida após a infecção com ambas as cepas de *M. bovis* (**Figura 14B**). Da mesma forma, a baixa expressão de TNFR1 no 3º dia de infecção com a cepa virulenta, não foi causada pela redução da expressão gênica, ao contrário, a expressão de mRNA de *TNFR1* foi 3 vezes maior neste ponto (**Figura 14A**), sugerindo que a regulação da expressão superficial de TNFR1 e TNFR2 nos macrófagos alveolares ocorre a nível pós-transcricional.

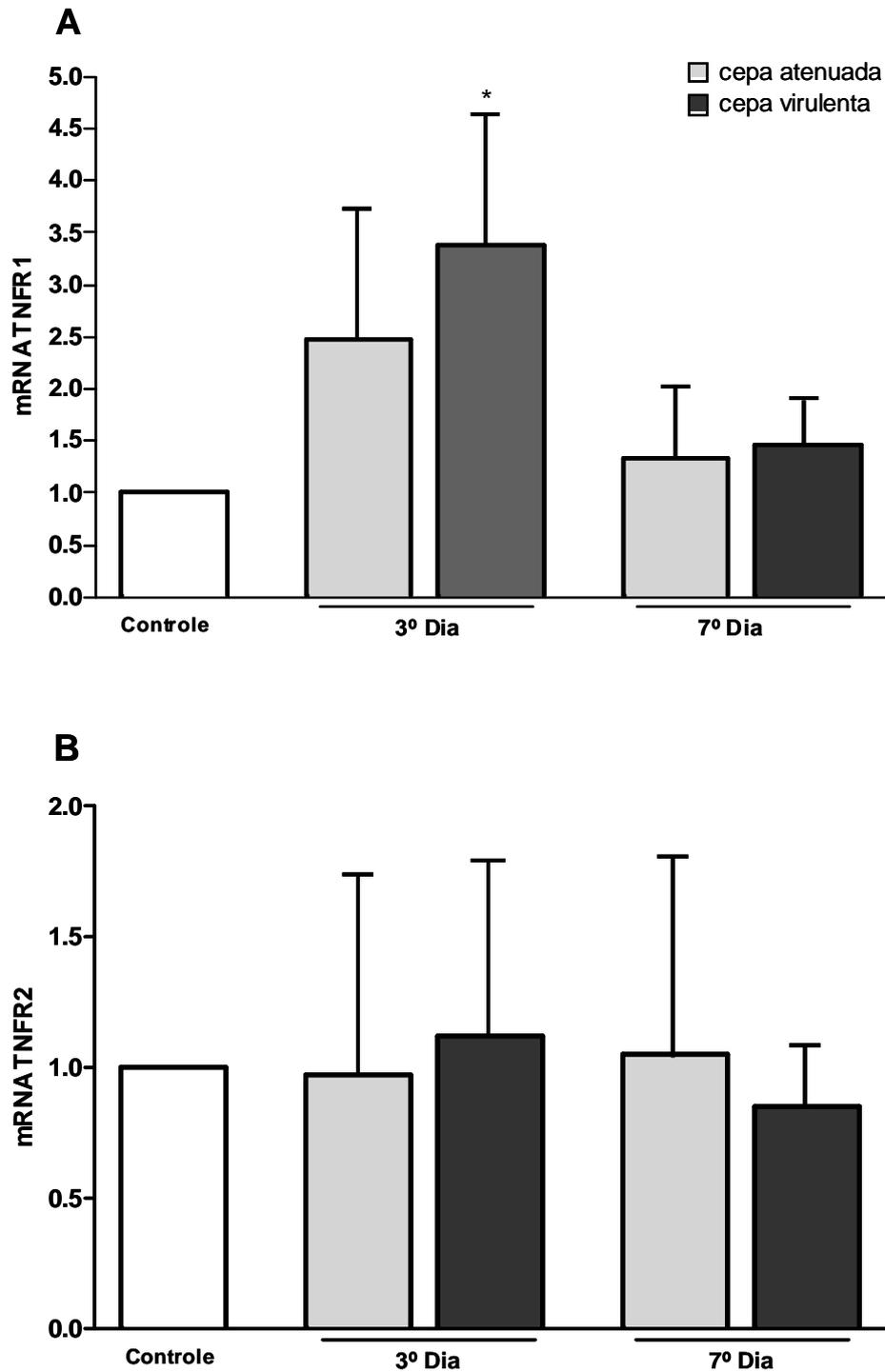


Figura 14: Quantificação relativa de mRNA de TNFR1 e TNFR2 após infecção com *M. bovis*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com as cepas atenuada ou virulenta de *M. bovis*. Controles foram inoculados com PBS. Após 3 e 7 dias de infecção amostras de pulmão foram coletadas, processadas e utilizadas para quantificação relativa de mRNA de TNFR1 e TNFR2 por PCR em Tempo-Real conforme descrito em material e métodos. Cada barra representa a Média \pm EPM.

4.4 Alteração da expressão superficial dos receptores de TNF pode ser devido à clivagem “shedding” dos receptores da superfície celular.

Tanto TNFR1 como TNFR2 podem ser liberados da superfície das células por clivagem proteolítica, formando as moléculas solúveis sTNFR1 e sTNFR2. Este processo desempenha importante papel na regulação da expressão superficial dos receptores (ADERKA, 1996; XANTHOULEA et al., 2004). Sendo assim, os níveis de sTNFR1 e sTNFR2 no fluido do BAL foram mensurados por ELISA a fim de avaliar se a clivagem “shedding” do ectodomínio de TNFR1 e TNFR2 poderia explicar a redução na expressão destes receptores na superfície dos macrófagos alveolares.

A quantidade de sTNFR1 aumentou significativamente apenas no 3º dia de infecção com a cepa virulenta (**Figura 15A**), o que sugere que o “shedding” de TNFR1 pode estar envolvido na baixa expressão superficial deste receptor detectada neste ponto da infecção com a cepa virulenta. Da mesma forma, a redução da expressão superficial de TNFR2 em macrófagos alveolares pode estar relacionada com a clivagem deste receptor da superfície celular, uma vez que um aumento significativo do sTNFR2 no BAL foi detectado no 3º e 7º dia após a infecção com ambas as cepas de *M. bovis* (**Figura 15B**).

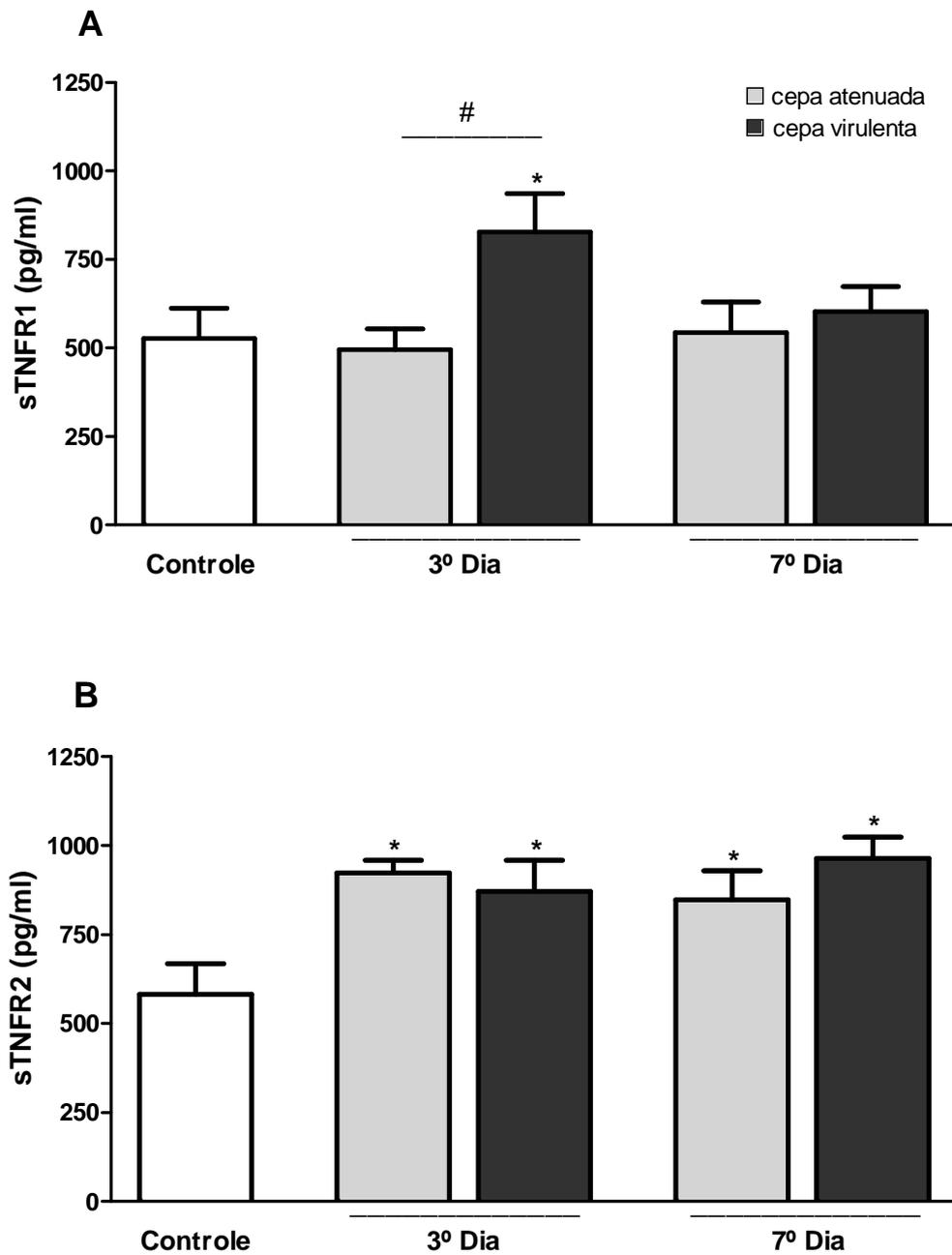


Figura 15: Quantificação de sTNFR1 e sTNFR2. Os níveis dos receptores solúveis sTNFR1 (A) e sTNFR2 (B) no fluido do lavado broncoalveolar (BAL), de camundongos infectados com as cepas atenuada ou virulenta de *M. bovis* e controles não infectados, foram mensurados por ELISA. Cada barra representa a Média \pm EPM de um experimento representativo de três com resultados similares. * $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$

4.5 Aumento da produção de TNF- α após infecção com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*.

A sinalização iniciada pelo TNF- α pode ser afetada em vários níveis, incluindo a regulação da expressão de seus receptores e liberação de suas formas solúveis, e também a regulação da expressão do ligante (HEHLGANS; PFEFFER, 2005). Adicionalmente, alguns estudos sugerem que a micobacteria apresenta mecanismos específicos para modular a produção de TNF- α por macrófagos (PHILIPS; ERNST, 2012). Portanto, os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA no 3º e 7º dia de infecção com as duas cepas de *M. bovis*. Foi observado que os níveis de TNF- α no pulmão dos animais aumentaram significativamente após a infecção com ambas as cepas, quando comparado ao controle não infectado. Ao comparar os grupos infectados, foi verificado que no 3º dia, os níveis de TNF- α não diferiram significativamente entre as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*, embora tenha sido detectado um menor nível desta citocina na infecção com a cepa virulenta. No entanto, no 7º dia de infecção, a cepa virulenta induziu significativamente mais TNF- α do que a cepa atenuada (**Figura 16**).

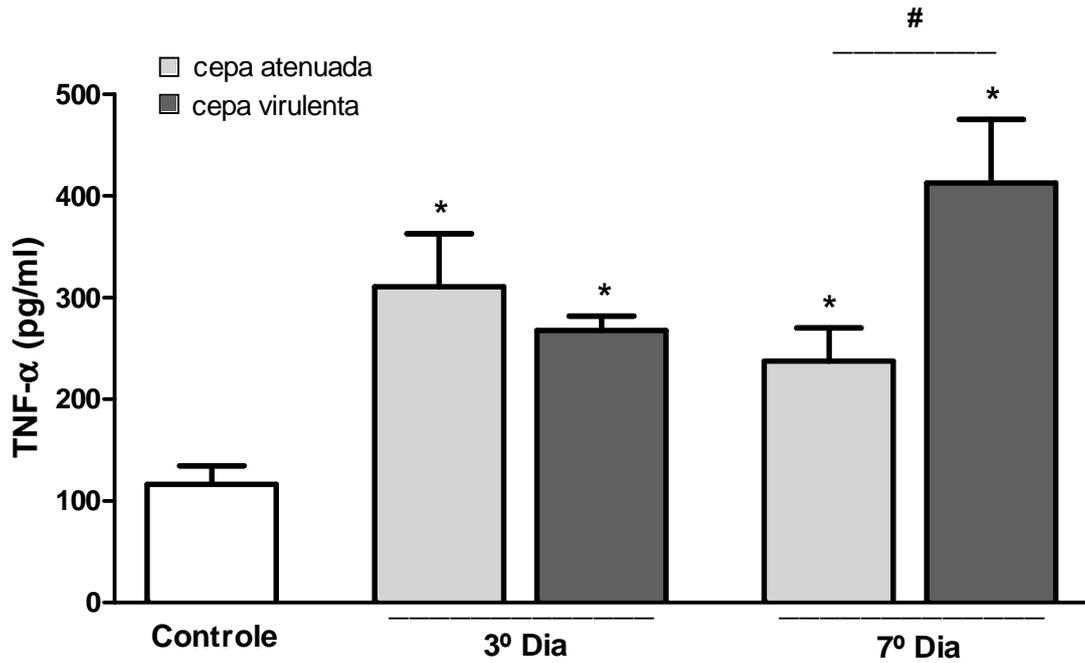


Figura 16: Quantificação de TNF- α . Os níveis de TNF- α no pulmão de camundongos infectados com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis* e controles não infectados foram mensurados por ELISA. Cada barra representa a Média \pm EPM. Resultados de um experimento representativo de três com resultados similares são mostrados. * $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$

4.6 Apoptose de macrófagos alveolares induzida pelo *M. bovis*

Conforme já mencionado, a sinalização do TNF- α através do TNFR1 é capaz de induzir tanto a sobrevivência como a apoptose das células. Já a sinalização pelo TNFR2 induz preferencialmente sinais de sobrevivência, mas pode também potencializar o sinal de morte mediado pelo TNFR1 (CABAL-HIERRO; LAZO, 2012). Portanto, foi avaliado a frequência de macrófagos alveolares apoptóticos após a infecção com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*, a fim de se verificar uma possível relação entre a expressão dos receptores de TNF e apoptose induzida pela micobactéria.

Foi observado um aumento significativo da apoptose de macrófagos alveolares no 3^o e 7^o dia de infecção com a cepa atenuada e no 7^o dia de infecção com a cepa virulenta. No 3^o dia, a cepa virulenta induziu significativamente menos apoptose de macrófagos alveolares do que a cepa atenuada. Em contraste, no 7^o dia a cepa virulenta induziu significativamente mais apoptose do que a cepa atenuada (**Figura 17**).

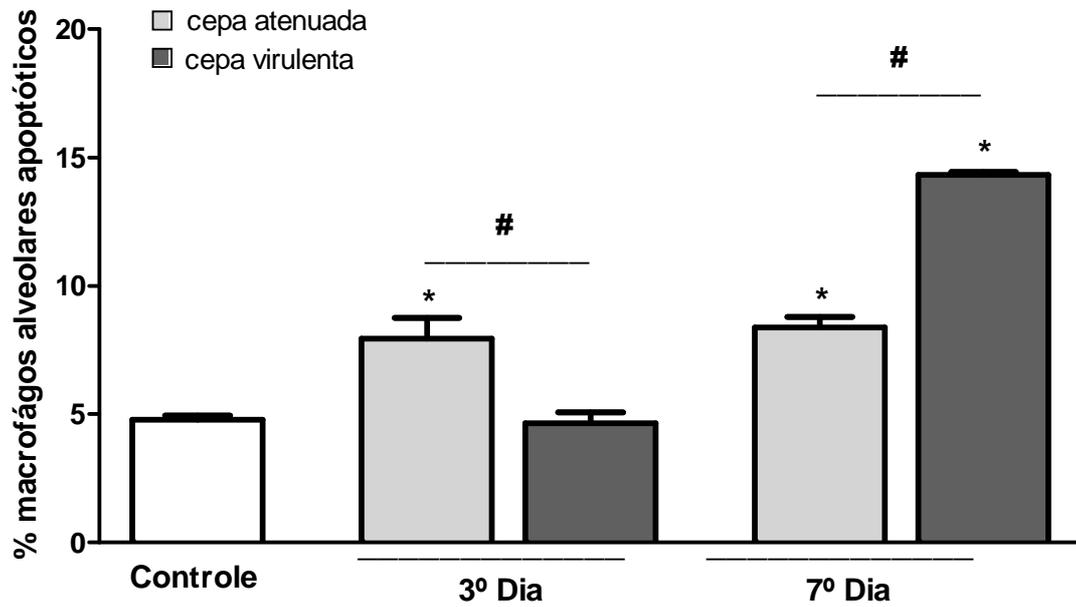


Figura 17: Apoptose de macrófagos alveolares após infecção com *M. bovis*. Camundongos C57BL/6 foram infectados com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*. Após 3 e 7 dias de infecção, a frequência de macrófagos alveolares apoptóticos foi analisada por citometria de fluxo. Cada barra representa a Média \pm EPM. Resultados de um experimento representativo de três com resultados similares são mostrados. * $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$

4.7 Participação do TNFR1 na modulação da apoptose induzida pela micobactéria.

Analisando a expressão dos receptores de TNF em macrófagos alveolares (**Figura 13**) e a ocorrência da apoptose dessas células (**Figura 17**) após a infecção com as cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*, verificamos uma relação direta entre a expressão superficial de TNFR1 e a apoptose dos macrófagos alveolares, sugerindo um papel potencial para o TNFR1 na modulação da apoptose induzida pela micobactéria. Para adicionalmente avaliar a contribuição do TNFR1 na apoptose de macrófagos durante a infecção por micobactérias, camundongos deficientes em TNFR1 (TNFR1^{-/-}) e camundongos tipo selvagem C57Bl/6 foram infectados com *M. bovis* atenuado (BCG) e a frequência de apoptose de macrófagos alveolares foi comparada. Camundongos TNFR1^{-/-} exibiram uma redução significativa da apoptose de macrófagos alveolares quando comparados a camundongos do tipo selvagem (WT) (**Figura 18**), reforçando a participação do TNFR1 na apoptose induzida pela micobactéria.

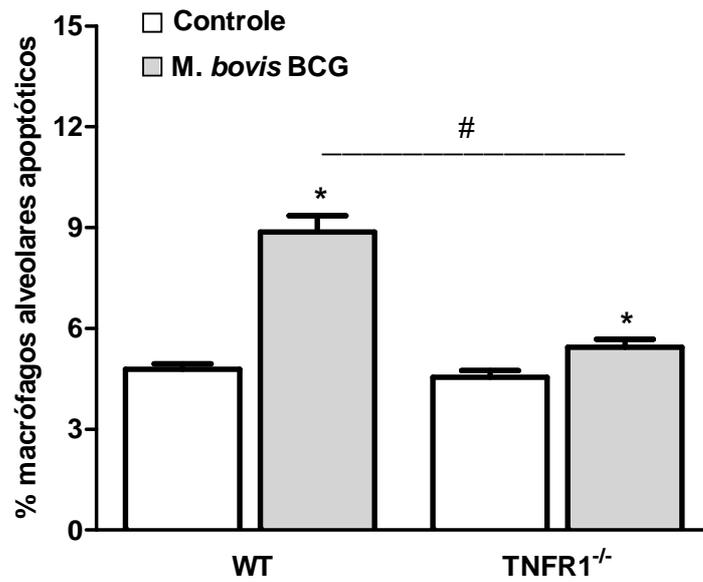


Figura 18: Apoptose de macrófagos alveolares em camundongos TNFR1^{-/-}. Camundongos C57BL/6 tipo selvagem (WT) ou deficientes em TNFR1 (TNFR1^{-/-}) foram infectados com *M. bovis* BCG. Controles foram inoculados com PBS. Após 3 dias de infecção a frequência de macrófagos alveolares apoptóticos foi analisada por citometria de fluxo. Cada barra representa a Média ± EPM. Resultados de um experimento representativo de dois com resultados similares são mostrados. * $P < 0.05$ versus controle, # $P < 0.05$

4.8 Contagem de bacilos em macrófagos alveolares

Em prévio estudo, foi verificado que a modulação da apoptose do macrófago durante a infecção pela micobactéria parece ser influenciada pela carga bacteriana intracelular (RODRIGUES et al., 2009) Portanto, no presente estudo, foi avaliado o número de bacilos em macrófagos, utilizando coloração alcóol-ácido-resistente, a fim de se investigar uma possível relação entre a carga bacteriana e a expressão de TNFR1.

Na infecção com a cepa atenuada, a porcentagem de macrófagos infectados diminuiu de 23% no 3º dia para 16% no 7º dia de infecção. Em ambos os dias, a maioria dos macrófagos infectados continham de 1 a 10 bacilos (**Figura 19A**), com elevada ocorrência de macrófagos apresentado um único bacilo (**Figura 19C**) principalmente no 3º dia da infecção. Em contraste, na infecção com a cepa virulenta, a porcentagem de macrófagos infectados aumentou de 29% para 41%, entre o 3º e o 7º dia de infecção. No 3º dia, a maioria dos macrófagos infectados (88%) continham menos do que 10 bacilos (**Figura 19B e 19D**), enquanto que no 7º dia a maioria dos macrófagos (82%) apresentaram mais de 10 bacilos (**Figura 19B e 19E**).

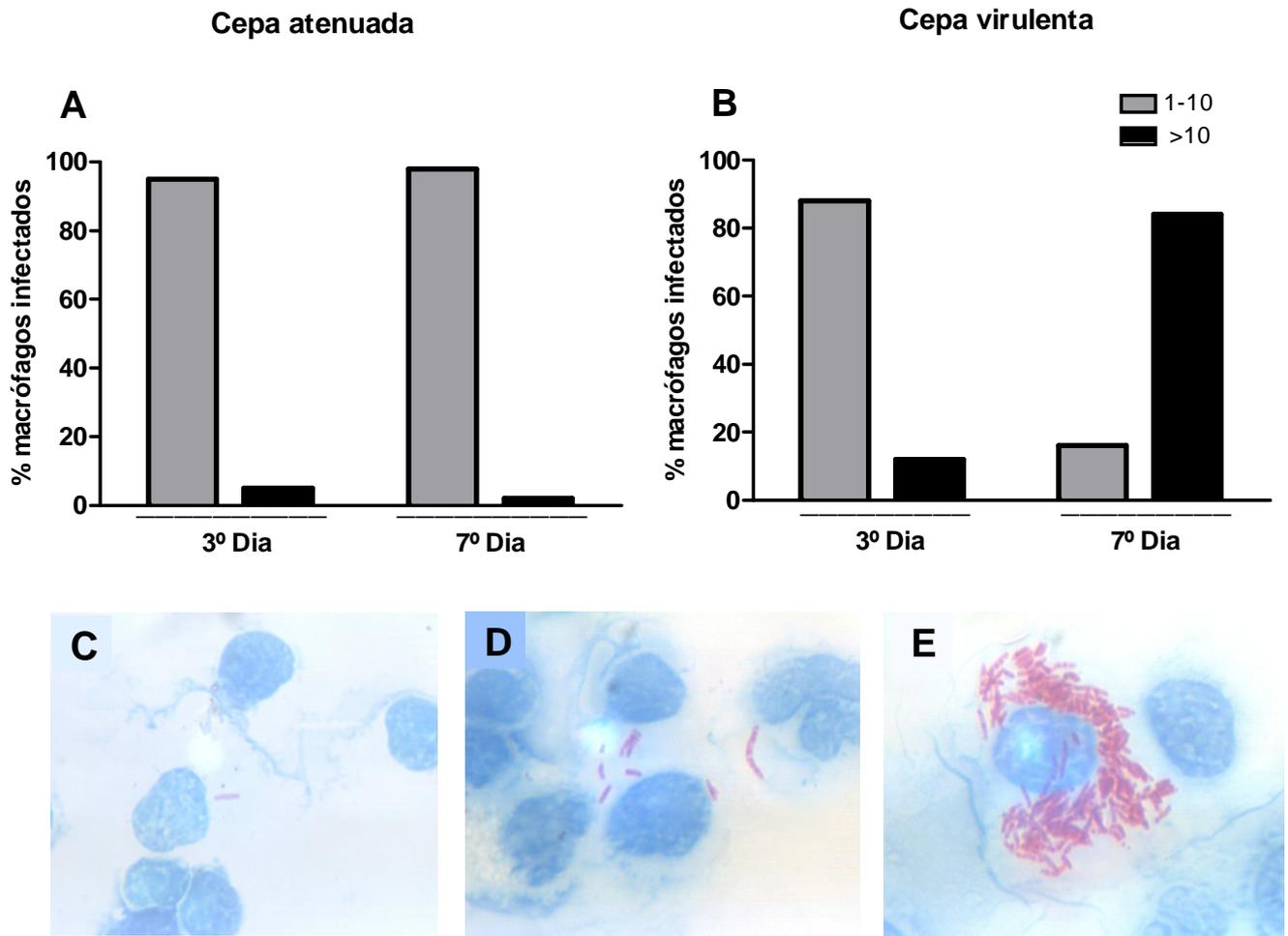


Figura 19: Número de bacilos em macrófagos alveolares de camundongos infectados com a cepa atenuada (A) ou virulenta (B) de *M. bovis*. Células pulmonares obtidas no BAL, 3 e 7 dias após a infecção, foram citocentrifugadas e coradas para identificação de BAAR pelo método de Ziehl-Neelsen. Aproximadamente 100 macrófagos por amostra foram contados e o número de bacilos em cada macrófago infectado foi pontuado em 1 a 10 bacilos/macrófago (C,D) ou > 10 bacilos/macrófago (E). Resultados são representativos de dois experimentos. (C, D e E x1000).

5. DISCUSSÃO

Micobactérias patogênicas empregam diversas estratégias para escapar da resposta imunológica e se estabelecer em macrófagos, os quais constituem o local preferencial para a persistência intracelular e proliferação das micobactérias (COSMA et al., 2003; de CHASTELLIER, 2009). Estudos comparando a resposta do hospedeiro a cepas atenuadas e virulentas de micobactérias contribuem para a elucidação de tais estratégias. O reconhecimento de que a manipulação das vias de morte dos macrófagos é um dos métodos utilizados pela micobactéria para evadir as defesas do hospedeiro (BEHAR et al., 2010; PORCELLI; JACOBS, 2008) tem motivado muitos grupos a investigar os mecanismos envolvidos neste processo sendo que, alguns estudos tem estabelecido um papel central para o TNF- α na modulação da apoptose induzida pela micobactéria (KEANE et al., 1997; ROJAS et al., 1999; SPIRA et al., 2003).

Conforme já mencionado, o TNF- α (TNF) é uma citocina pleiotrópica que desempenha diversas funções durante a infecção pela micobactéria. As ações do TNF são mediadas através de dois receptores transmembrana, sendo que a sinalização iniciada pelo TNFR1 pode resultar em ativação e sobrevivência celular, apoptose ou ainda necroptose dependendo do ambiente celular, enquanto que o TNFR2 induz primariamente sinais de sobrevivência (CABAL-HIERRO; LAZO, 2012; MOCARSKI et al., 2012; VANDENABEELE et al., 2010). Embora a maioria das atividades do TNF sejam mediadas através da sinalização pelo TNFR1, diferentes tipos de células coexpressam TNFR1 e TNFR2 e requerem a cooperação entre estes dois receptores para gerar respostas ao TNF, incluindo alguns casos de apoptose mediada pelo TNF (FONTIN-MLECZEK et al., 2002; GRECH et al., 2005).

Apesar da importância do TNF na resposta imunológica à micobactérias e seu potencial papel na indução da apoptose de macrófagos durante a infecção, poucos

estudos têm se dedicado a avaliar *in vivo* a expressão de TNFR1 e TNFR2 durante a infecção por micobactérias ou determinar a influência da expressão destes receptores sobre a apoptose induzida pela micobactéria. Portanto, no presente trabalho, foi investigado a relação entre a expressão dos receptores de TNF e apoptose de macrófagos alveolares, durante a fase inicial da infecção com cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*.

Na infecção com a cepa atenuada foi observado um aumento significativo da expressão superficial de TNFR1 em macrófagos alveolares e da apoptose dessas células, tanto no 3º como no 7º dia após a infecção. Já na infecção com a cepa virulenta, o aumento da expressão de TNFR1 e apoptose de macrófagos alveolares ocorreu somente no 7º dia de infecção. No 3º dia de infecção pela cepa virulenta, a expressão de TNFR1 em macrófagos alveolares permaneceu baixa e foi acompanhada por reduzidas taxas de apoptose dessas células. Além disso, uma redução significativa da apoptose de macrófagos alveolares foi observada em camundongos deficientes em TNFR1 (TNFR1^{-/-}) três dias após a infecção com *M. bovis* BCG. Tomados em conjunto, estes resultados sugerem um papel potencial do TNFR1 na modulação da apoptose de macrófagos durante a fase inicial da infecção por micobactérias.

Diferentes patógenos apresentam a capacidade de modular a expressão dos receptores do TNF a fim de inibir as funções antimicrobianas mediadas por esta citocina. Essa modulação pode ocorrer através de vários mecanismos. Foi demonstrado que o vírus Epstein-Barr diminui a expressão de TNFR1 por sub-regulação do seu promotor, e assim evita a sinalização de morte celular induzida pelo TNFR1 (MORRISON et al., 2004). *Chlamydia trachomatis*, uma bactéria intracelular que ativamente inibe a apoptose da célula hospedeira, diminui a expressão superficial de TNFR1 em células infectadas. Esta redução parece estar relacionada a clivagem

“shedding” do receptor e ao sequestro do receptor dentro de vacúolos endossomais denominados inclusões clamidiais (PALAND et al., 2008).

No presente estudo, foi observado aumento significativo dos níveis de sTNFR1 no BAL no 3º dia de infecção com a cepa virulenta de *M. bovis*, o qual foi relacionado com a menor expressão de TNFR1 na superfície dos macrófagos. Assim, a redução da expressão superficial de TNFR1 em macrófagos alveolares devido a clivagem “shedding” do receptor pode representar um mecanismo de escape por meio do qual a micobactéria impede a apoptose induzida pelo TNF- α .

A regulação do processo de “shedding” foi previamente proposta como um possível mecanismo através do qual as micobactérias inibem a apoptose de macrófagos. Balcewicz-Sablinska et al. (1998) sugeriram que a micobactéria virulenta evita a apoptose do macrófago hospedeiro através do “shedding” de TNFR2. Esses pesquisadores observaram que a cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv induziu uma maior liberação de sTNFR2 em comparação com a cepa atenuada H37Ra, resultando na neutralização da bioatividade do TNF- α por meio da formação de complexos inativos entre o ligante e o receptor solúvel (TNF-sTNFR2). No presente estudo, também foi observado aumento de sTNFR2 no BAL, o qual foi acompanhado por redução da expressão superficial de TNFR2 em macrófagos alveolares. Este aumento do “shedding” de TNFR2 ocorreu na infecção com ambas as cepas de *M. bovis* e portanto, diferente do estudo de Balcewicz-Sablinska et al. (1998), parece não ter sido influenciado pela virulência da micobactéria. Além disso, aqui, o aumento de sTNFR2 não foi correlacionado com inibição da apoptose dos macrófagos. No entanto, a importância deste processo durante a infecção pela micobactéria deve ser considerada, uma vez que “cross-talk” entre TNFR1 e TNFR2 ocorre em múltiplos níveis e pode ser

influenciado pela expressão dos receptores, tanto em suas formas ligadas à membrana como em suas formas solúveis (NAUDÉ et al., 2011).

As formas solúveis dos receptores de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) ligam-se ao TNF- α e embora possam atuar como agonistas, estabilizando e preservando a forma trimérica bioativa do TNF, eles parecem agir principalmente como antagonistas do TNF, pois competem pelo ligante com os receptores de superfície celular e assim bloqueiam a ação dessa citocina (DAI et al., 2005; PESCHON et al., 1998a). Assim, tal como sugerido por Balcewicz-Sablinska et al. (1998), a liberação de sTNFR2 com a formação de complexos inativos TNF-sTNFR2 poderia contribuir para impedir a ligação TNF-TNFR1 e reduzir a apoptose de macrófagos.

Por outro lado, tem sido proposto que o TNFR2, em sua forma ligada a membrana, pode também aumentar a resposta apoptótica mediada pelo TNFR1 (BIGDA et al., 1994; CHAN; LENARDO, 2000). Neste contexto, alguns estudos sugeriram que o TNFR2 poderia aumentar a resposta mediada pelo TNFR1 através do recrutamento de moléculas de TNF- α para a superfície da célula e sua transferência para o TNFR1, num modelo de passagem do ligante (DRI et al., 1999; TARTAGLIA et al., 1993). No entanto, outros estudos sugerem que o TNFR2 pode aumentar a apoptose induzida pelo TNFR1 devido a sua própria atividade de sinalização, através da regulação negativa da função de TRAF2 (GRECH et al., 2005; WEISS et al., 1998). TRAF2 é uma molécula adaptadora recrutada no início do processo de sinalização celular de ambos receptores TNFR1 e TNFR2. TRAF2 forma um complexo heterodimérico com TRAF1, o qual interage com proteínas inibidoras de apoptose celular (cIAP-1 e cIAP-2) e fornece um sinal anti-apoptótico que é essencial para o bloqueio da apoptose e sobrevivência celular (HSU et al., 1996a; ROTHE et al., 1994; ROTHE et al., 1995). De acordo com este modelo, a estimulação do TNFR2 poderia

umentar fortemente a morte celular induzida pelo TNFR1, devido à depleção de TRAF2 mediada pelo TNFR2, que levaria a anulação da sinalização antiapoptótica, dependente de TRAF2, induzida pelo TNFR1 (FOTIN-MLECZEK et al., 2002; WEISS et al., 1998). Portanto, o complexo “cross-talk” entre TNFR1 e TNFR2 pode resultar tanto em efeito estimulatório como em efeito inibitório, os quais podem influenciar o equilíbrio entre a sobrevivência e apoptose das células (NAUDÉ et al., 2011).

Baseado na discussão acima, no presente estudo, tanto o aumento dos níveis de sTNFR2 como a redução da expressão de TNFR2 na superfície dos macrófagos, poderiam contribuir de diferentes modos para inibir a apoptose dessas células. Entretanto, baixa apoptose de macrófagos foi detectada somente quando a expressão superficial de TNFR1 foi menor e os níveis de sTNFR1 aumentaram. Uma possível explicação para esse achado pode ser a diferença na estabilidade de cada um dos complexos ligante-receptor solúvel. Krippner-Heidenreich et al. (2002) verificaram que a interação do TNF- α com o TNFR1 e com o TNFR2 difere marcadamente. Enquanto TNF- α forma complexos muito estáveis com TNFR1 (vida-média de 33 min), sua ligação com TNFR2 é muito transitória (vida-média de 1,1 min). Sendo assim, é possível especular que, similarmente, a variação na estabilidade dos complexos TNF-sTNFR1 e TNF-sTNFR2 possa influenciar no efeito inibitório desses complexos.

A liberação do TNFR1 e TNFR2 da superfície das células é mediada através da ação de uma metaloproteinase, da família ADAM, chamada Enzima Conversora de TNF- α (TACE), a qual também cliva a forma precursora do TNF- α da membrana para gerar a forma solúvel do TNF- α (BLACK et al., 1997; PESCHON et al., 1998b; REDDY et al., 2000). Em camundongos nocautes para TACE, o nível de sTNFR2 circulante no soro é aproximadamente 90% menor do que em camundongos selvagens, enquanto que o nível de sTNFR1 é cerca de 50% menor (MOSS et al., 2008). Portanto, o

aumento da atividade de TACE pode estar envolvido no aumento do “shedding” dos TNFRs observado após a infecção com *M. bovis*. De fato, Richmond et al., (2012) observaram *in vitro* ativação sustentada de TACE em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*, mas não em macrófagos infectados com a cepa avirulenta *M. smegmatis*. Entretanto, a liberação de sTNFR2 aumentou na infecção com ambas as cepas, enquanto que a quantidade de sTNFR1 diminuiu. No presente estudo, foi também observado um aumento preferencial de sTNFR2 na infecção com ambas as cepas de *M. bovis* tanto no 3º como no 7º dia de infecção, enquanto que a quantidade de sTNFR1 aumentou somente no 3º dia de infecção com a cepa virulenta, sugerindo a existência de outro mecanismo regulando o “shedding” de TNFR1. Embora TACE esteja envolvida no “shedding” de diversas proteínas de membrana, incluindo TNFR1 e TNFR2, as condições requeridas para cada uma dessas atividades proteolíticas podem ser diferentes. Por exemplo, em células epiteliais e endoteliais humanas, o “shedding” do TNFR1 é também regulado pela expressão de ARTS-1 (aminopeptidase reguladora do shedding TNFR1), uma proteína que se liga especificamente no domínio extracelular do TNFR1 e aumenta o “shedding” de TNFR1 mas não de TNFR2 (CUI et al., 2002). Além disso, a quantidade de inibidores naturais de TACE, bem como a participação de outras enzimas da família ADAM pode também influenciar a liberação dos TNFRs. Portanto, adicionais estudos são necessários para investigar os mecanismos que regulam o “shedding” dos receptores de TNF durante a infecção pela micobactéria.

Embora os mecanismos envolvidos na liberação dos receptores solúveis de TNF ainda não estejam totalmente esclarecidos, a importância do processo de “shedding” do TNFR1 durante a infecção pela micobactéria foi demonstrada em um estudo usando camundongos transgênicos que produziam diferentes quantidades de sTNFR1. Neste

estudo, foi verificado que camundongos transgênicos expressando baixos níveis de sTNFR1 foram protegidos contra a infecção pelo *M. bovis* BCG através do aumento de mecanismos bactericidas. Entretanto, camundongos que expressavam altos níveis de sTNFR1 não desenvolveram uma resposta imune efetiva e sucumbiram à infecção pelo BCG, o que foi atribuído a inibição do TNF- α circulante e a reduzida sinalização via ambos receptores TNFR1 e TNFR2 (GARCIA et al., 1997; SCHLÜTER; DECKERT, 2000). Sendo assim, no presente estudo, embora um aumento significativo de TNF- α tenha sido observado no 3º dia de infecção com ambas as cepas de *M. bovis*, na infecção com a cepa virulenta, o aumento dos níveis de sTNFR1, acompanhado pela menor expressão superficial deste receptor, pode ter contribuído para a inibição da apoptose de macrófagos induzida pelo TNF- α . Essa inibição favoreceria a permanência e replicação da micobactéria virulenta dentro da célula hospedeira neste ponto onde poucos bacilos por célula foram observados. Em contraste, no 7º dia de infecção, a expressão de TNFR1 em macrófagos não diferiu entre as duas cepas, no entanto, a cepa virulenta induziu significativamente mais TNF- α do que a cepa atenuada, o que pode possivelmente estar relacionado com o grande aumento da apoptose de macrófagos observado no 7º dia de infecção com a cepa virulenta. A apoptose de um grande número de macrófagos neste ponto, onde a maioria destas células infectadas continha mais do que 10 bacilos, poderia facilitar a saída da micobactéria da célula hospedeira para infecção de novas células, uma vez que células apoptóticas lisam e tornam-se necróticas, ou seja, sofrem necrose secundária, quando a quantidade de células que morrem supera a capacidade local de remoção “clearance” mediada por fagócitos (SAVIL et al., 2002; SILVA, 2010).

Tomados em conjunto, estes resultados reforçam a hipótese de que a micobactéria virulenta modula a apoptose de macrófagos de acordo com a carga bacteriana intracelular. No entanto, não foi possível estabelecer uma direta relação entre o número de bacilos e a expressão superficial de TNFR1 em macrófagos, para as duas cepas de *M. bovis*, pois embora na infecção com a cepa virulenta baixa expressão de TNFR1 tenha ocorrido na presença de pequeno número de bacilos e aumento da expressão tenha ocorrido somente na presença de alta carga bacteriana, na infecção com a cepa atenuada foi observada expressão aumentada de TNFR1, mesmo na presença de um pequeno número de bacilos. Portanto, embora seja possível que o número de bacilos influencie a expressão superficial de TNFR1, a modulação deste processo parece ser dependente da virulência da micobactéria.

A manipulação da morte do macrófago pela micobactéria virulenta, parece envolver tanto a inibição da apoptose como a indução da apoptose seguida por necrose (necrose secundária), as quais podem favorecer a replicação intracelular do bacilo e sua saída da célula hospedeira, respectivamente. No entanto, ainda não está claro se durante a fase inicial da infecção, a inibição e a indução da apoptose ocorrem como processos independentes ou se representam alternativas de uma mesma via (RAMAKRISHNAN, 2012). Neste contexto, a regulação da expressão do TNFR1 favorece a hipótese de que esses processos ocorrem através de uma mesma via, onde a redução ou aumento da expressão do TNFR1 levaria a inibição ou indução da apoptose.

Um outro tipo de morte celular envolvendo TNFR1 que poderia favorecer a saída da micobactéria da célula hospedeira é a necroptose. Recentes estudos têm demonstrado que na ausência da atividade da caspase 8, a ativação do TNFR1 não resulta em apoptose, mas aos invés disso, inicia uma via de necrose programada a

qual é chamada de necroptose (MOCARSKI et al., 2012; VANDENABEELE et al., 2010). A morfologia da célula que sofre necroptose é muito semelhante aquela observada após a necrose ou necrose secundária, e incluiu a perda precoce da integridade da membrana plasmática (BERGHE et al., 2010) que poderia favorecer a disseminação do bacilo. De fato, foi demonstrado que, na presença de alta carga intracelular, o *M. tuberculosis* virulento rapidamente induz a morte do macrófago em um modo independente de caspases (LEE et al., 2006) e com ruptura da membrana plasmática (LEE et al., 2011), a qual pode ser compatível com a necroptose induzida pelo TNFR1. No entanto, adicionais estudos são necessários para avaliar a ocorrência da necroptose durante a infecção pela micobactéria e para determinar se a sinalização mediada pelo TNFR1 pode ter diferentes conseqüências para as vias de morte celular induzidas pelas cepas atenuada e virulenta de *M. bovis*.

Enfim, os achados deste estudo sugerem que o TNFR1 desempenha um importante papel na indução da apoptose de macrófagos durante a fase inicial da infecção pela micobactéria, e que a redução da expressão superficial de TNFR1 através da sua clivagem “shedding” pode ser um mecanismo usado pela micobactéria virulenta para inibir a apoptose de macrófagos.

6. CONCLUSÕES

1. A infecção com *Mycobacterium bovis* altera a expressão superficial dos receptores de TNF- α em macrófagos, sendo observado em geral aumento da expressão de TNFR1 e redução da expressão de TNFR2. A cepa virulenta de *M. bovis* parece ser capaz de reduzir a expressão superficial do TNFR1 e este receptor parece influenciar a indução da apoptose dos macrófagos alveolares. Em contraste, a expressão superficial de TNFR2 em macrófagos alveolares parece não ter efeito sobre a modulação da apoptose dessas células.
2. Ocorre aumento dos níveis de TNF- α após a infecção com ambas as cepas de *M. bovis*. Os níveis do receptor solúvel sTNFR2 também aumentaram após a infecção com ambas as cepas, tanto no 3^o como no 7^o dia de infecção, enquanto que o nível de sTNFR1 aumentou somente no 3^o dia de infecção com a cepa virulenta de *M. bovis*.
3. A redução da expressão de TNFR2 na superfície dos macrófagos alveolares no 3^o e 7^o dia de infecção com ambas as cepas de *M. bovis*, bem como a menor expressão superficial de TNFR1 no 3^o dia de infecção com a cepa virulenta não ocorreram devido à alteração da expressão gênica destes receptores, uma vez que não foi verificada redução na expressão de RNA mensageiro de *TNFR1* e *TNFR2* nestes pontos.
4. O bloqueio da sinalização TNF-TNFR1 durante a infecção com *M. bovis* BCG, em camundongos deficientes em TNFR1 (*TNFR1*^{-/-}), reduziu a apoptose dos macrófagos alveolares.

5. O receptor TNFR1 desempenha um importante papel na indução da apoptose dos macrófagos alveolares durante a fase inicial da infecção pela micobactéria. A redução da expressão superficial de TNFR1 em macrófagos alveolares através da clivagem “shedding” deste receptor pode representar um mecanismo de escape por meio do qual a micobactéria virulenta impede a apoptose induzida pelo TNF- α .

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**, 5^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ADERKA, D. et al. Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors. **J. Exp. Med.**, 175:323-329, 1992.

ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytok. Grow. Fact. Rev.**, 7:231-240, 1996.

ALGOOD, H. M. S.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytok. Growth. Fac. Rev.**, 14:467-477, 2003.

ALGOOD, H. M. S. et al. TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, 172:6846-6857, 2004.

ALLEENDOERFER, R.; DEEPE, G. S. Regulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by TNFR1 and -2. **J. Immunol.**, 165:2657-2664, 2000.

ALMAGRO, M. C.; VUCIC, D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. **Exp. Oncol.**, 34:200-211, 2012.

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.

ANDRADE, M. R. et al. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC. Microbiol.**, 12:166, 2012.

ARANAZ, A. et al. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 53:1785-1789, 2003.

ARCILA, M. L. et al. 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.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science**, 281:1305-1308, 1998.

AXELROD, S. et al. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. **Cell. Microbiol.**, 10:1530-1545, 2008.

BAILLIE, J.; SAHLENDER, D. A.; SINCLAIR, J. H. Human cytomegalovirus infection inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Signaling by targeting the 55-Kilodalton TNF- α receptor. **J. Virol.**, 77:7007-7016, 2003.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. et al. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNFR2, resulting in inactivation of TNF- α . **J. Immunol.**, 161:2636:2641, 1998.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **Trends Cell Biol.**, 11:372-377, 2001.

BEAN, A. G. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in *TNF* gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J. Immunol.**, 162:3504-3511, 1999.

BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nat. Rev. Microbiol.**, 8:668-674, 2010.

BEKKER, L. G. et al. Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent. **Infect. Immun.**, 68:6954–6961, 2000.

BERGHE, T. V. et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death Differ.**, 17:922-930, 2010.

BIGDA, J. et al. Dual role of the p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor in TNF cytotoxicity. **J. Exp. Med.**, 180:445-460, 1994.

BLACK, R. A. et al. A metalloproteinase disintegrin that releases Tumor-Necrosis Factor- α from cells. **Nature**, 385:729-733, 1997.

BOCCHINO, M. et al. Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, 9:375-383, 2005.

BOLDIN, M. P. et al. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. **Cell**, 85:803–815, 1996.

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

BROCKHAUS, M. Soluble TNF receptor: what is the significance? **Intens. Care Med.**, 23:808-809, 1997.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 99:3684–89, 2002.

CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P. S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell. Signal.**, 24:1297-1305, 2012.

CANADAY, D. H. et al. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. **J. Immunol.**, 167:2734-2742, 2001.

CARVALHO, N. B. et al. Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to *Mycobacterium avium* infection but plays no role in induction of Th1 responses. **Infect. Immun.**, 79:1638-1646, 2011.

CASTANOS-VELEZ, E. et al. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infect. Immun.**, 66:2960-2968, 1998.

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.

CHAN, F. K.; LENARDO, M. J. A crucial role for p80 TNF-R2 in amplifying p60 TNF-R1 apoptosis signals in T lymphocytes. **Eur. J. Immunol.**, 30:652-660, 2000.

CHEN, G.; GOEDDEL, D. V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. **Science**, 296:1634-1635, 2002.

CHIN, Y. R.; HORWITZ, M. S. Adenovirus RID complex enhances degradation of internalized tumour necrosis factor receptor 1 without affecting its rate of endocytosis. **J. Gen. Virol.**, 87:3161-3167, 2006.

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

COSMA, C. L.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, 57:641-676, 2003.

COUSINS, D.V. et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, 53:1305-1314, 2003.

CROWELL, R.E. et al. Alveolar and interstitial macrophage populations in the murine lung. **Exp. Lung Res.**, 18:435-446, 1992.

CUI, X. et al. Identification of ARTS-1 as a novel TNFR1-binding protein that promotes TNFR1 ectodomain shedding. **J. Clin. Invest.**, 110:515-526, 2002.

DAI, H. et al. Production of soluble tumor necrosis factor receptors and Tumor Necrosis Factor- α by alveolar macrophages in sarcoidosis and extrinsic allergic alveolitis. **Chest**, 127:251-256, 2005.

de CHASTELLIER, C. The many niches and strategies used by pathogenic mycobacteria for survival within host macrophages. **Immunobiology**, 214:526-542, 2009.

DECKERT-SCHLUTER M. [Rudolf-Virchow Prize 1998: Award lecture. Toxoplasmosis: a model infection for studying systemic and intracerebral immune reactions]. **Verh. Dtsch. Ges. Pathol.**, 82:9-22, 1998.

DEMANGEL, C. et al. Stimulation of Dendritic cells via CD40 enhances immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Infect. Immun.**, 69:2456-2461, 2001.

DHEDA, K. et al. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology**, 15:433-450, 2010.

DIEZ-RUIZ, A. et al. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. **Eur. J. Haematol.**, 54:1-8, 1995.

DRI, P. et al. Role of the 75-kDa TNF receptor in TNF-induced activation of neutrophil respiratory burst. **J. Immunol.**, 162:460-466, 1999.

DUNN, P. L.; NORTH, R. J. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. **Infect. Immun.**, 63:3428-3437, 1995.

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

EHLERS, S. et al. Lethal granuloma disintegration in Mycobacteria-infected TNFRp55^{-/-} mice is dependent on T cells and IL-12. **J. Immunol.**, 165:483-492, 2000.

ENDRES, R. et al. Listeriosis in p47 (phox^{-/-}) and TRp55^{-/-} mice: protection despite absence of ROI and susceptibility despite presence of RNI. **Immunity**, 7:419-432, 1997.

ERMERT, M. et al. In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. **Cytokine**, 22:89-100, 2003.

FAIRBAIRN, I. P. Macrophages apoptosis in host immunity to mycobacterial infections. **Biochem. Soc. Trans.**, 32:496-497, 2004.

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

FLESCHE, I. E.; KAUFMANN, S. H. Activation of tuberculostatic macrophage functions by γ interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. **Infect. Immun.**, 58:2675-2677, 1990.

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

FLYNN, J. L. et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, 2:561-572, 1995.

FOTIN-MLECZEK, M. et al. Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. **J. Cell. Sci.**, 115:2757-2770, 2002.

FRATAZZI, C. et al. 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. et al. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. **J. Leukoc. Biol.**, 66:763-764, 1999.

GARCIA, I. et al. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas. **Eur. J. Immunol.**, 27:3182-3190, 1997.

GARCIA, I. et al. Roles of soluble and membrane TNF and related ligands in mycobacterial infections: effects of selective and non-selective TNF inhibitors during infection. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 691:187-201, 2011.

GARN, H. Specific aspects of flow cytometric analysis of cells from the lung. **Exp. Toxic. Pathol.**, 57:21-24, 2006.

GONZALEZ-JUARRERO, M. et al. Dynamics of macrophage cell populations during murine pulmonary tuberculosis. **J. Immunol.**, 171:3128-3135, 2003.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat. Rev. Immunol.**, 3:23-35, 2003.

GOTO, T. et al. Importance of Tumor Necrosis Factor- α Cleavage Process in Post-Transplantation Lung Injury in Rats. **Amer. J. Respir. Crit. Care Medic.**, 170:1239-1246, 2004.

GRECH, A. P. et al. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) signaling is negatively regulated by a novel, carboxyl-terminal TNFR-associated factor 2 (TRAF2)-binding site. **J. Biol. Chem.**, 280:31572-31581, 2005.

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

GRELL, M. et al. Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. **EMBO J.**, 18:3034-3043, 1999.

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Life and death by death receptors. **FASEB J.**, 23:1625-1637, 2009.

GUPTA, S. A decision between life and death during TNF- α -induced signaling. **J. Clin. Immunol.**, 22:185-194, 2002.

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

HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. **Nat. Rev. Microbiol.**, 8:296-307, 2010.

HEHLGANS, T.; PFEFFER, K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. **Immunol.**, 115:1-20, 2005.

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

HODGE-DUFOUR, J. et al. Inhibition of interferon γ induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:13806-13811, 1998.

HSU, H. et al. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. **Cell**, 84:299-308, 1996a.

HSU, H. et al. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP-1 to the TNF receptor-1 signaling complex. **Immunity**, 4:387-396, 1996b.

IHNATKO, R.; KUBES, M. TNF signaling: early events and phosphorylation. **Gen. Physiol. Biophys.**, 26:159-167, 2007.

JACOBS, M. et al. Tumor necrosis factor receptor 2 plays a minor role for mycobacterial immunity. **Pathobiol.**, 68:68-75, 2000.

JORDÃO, L.; VIEIRA, O. V. Tuberculosis: New aspects of an old disease. **Int. J. Cell. Biol.**, 2011:1-13, 2011.

KAPUR, V.; WHITTAM, T. S.; MUSSER, J. M. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? **J. Infect. Dis.**, 170:1348–1349, 1994.

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.

KAUFMANN, S.H.E.; HUSSEY, G.; LAMBERT, P.H. New vaccines for tuberculosis. **Lancet**, 375:2110-2119, 2010.

KEANE, J. et al. 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. et al. Effects of mycobacteria on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.**, 65:5272-5278, 1997.

KRIPPNER-HEIDENREICH, A. et al. Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. **J. Biol. Chem.**, 277:44155-44163, 2002.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell. Death. Differ.**, 16:3-11, 2009.

KRUGLOV, A. A. et al. Physiological functions of tumor necrosis factor and the consequences of its pathologic overexpression or blockade: mouse models. **Cytokine Growth Factor Rev.**, 19:231-244, 2008.

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

LEE, J. et al. 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.

LEE, J. et al. *Mycobacterium tuberculosis* induces an atypical cell death mode to escape from infected macrophages. **PLoS One**, 6:e18367, 2011.

MACMICKING, J. D. et al. Identification of nitric oxide synthase as a protected locus against tuberculosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 94:5243-5248, 1997.

MARTIN, S. J. et al. 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.

MEDINA, E. et al. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. **Tuberculosis**, 86:20-27, 2006.

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

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, 114:181-190, 2003.

MOCARSKI, E. S.; UPTON, J.; W.; KAISER, W.; J. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. **Nat. Rev. Immunol.**, 12:79-88, 2012.

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.

MORRISON, T. E. et al. Epstein-Barr Virus immediate-early protein BZLF1 inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating Tumor Necrosis Factor Receptor. **J. Virol.**, 78:544-549, 2004.

MOSS, M. L.; SKLAIR-TAVRON, L.; NUDELMAN, R. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. **Nat. Clin. Pract. Rheumatol.**, 4:300-309, 2008.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PEALLER, M.A. Capítulo 29 *Mycobacterium In Microbiologia Médica*, tradução da 5ª Edição, Murray PR, Rosenthal KS, Pealler MA (eds.). Elsevier Editora Ltda, pp.289-302, 2006.

MUZIO, M. et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. **Cell**, 85:817-827, 1996.

NASHLEANAS, M.; KANALY, S.; SCOTT, P. Control of *Leishmania major* infection in mice lacking TNF receptors. **J. Immunol.**, 160:5506-5513, 1998.

NAUDÉ, P.J. et al. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **FEBS. J.**, 278:888-898, 2011.

PALAND, N. et al. Reduced display of Tumor Necrosis Factor receptor I at the host cell surface supports infection with *Chlamydia trachomatis*. **J. Biol. Chem.**, 283:6438-6448, 2008.

PAN, H. et al. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. **Nature**, 434:767-772, 2005.

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

PESCHON, J. J. et al. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. **J. Immunol.**, 160:943-952, 1998a.

PESCHON, J.J. et al. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. **Science**. 282:1281-1284, 1998b.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res.**, 30:e36, 2002.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. **Annu. Rev. Pathol.**, 7:353-384, 2012.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. **Cell. Host. Microbe.**, 12:399-407, 2008.

PINCKARD, J. K. et al. Constitutive shedding of both p55 and p75 murine TNF receptors in vivo. **J. Immunol.**, 158:3869-3873, 1997.

POPKIN, D. L.; VIRGIN, H. W. Murine cytomegalovirus infection inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha responses in primary macrophages. **J. Virol.**, 77:10125-10130, 2003.

PORCELLI, S. A.; JACOBS, W. R. Tuberculosis: unsealing the apoptotic envelope. **Nat. Immunol.**, 9:1101-1102, 2008.

QUESNIAUX, V. F. et al. TNF in host resistance to tuberculosis infection. **Curr. Dir. Autoimmun.**, 11:157-179, 2010.

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

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nat. Rev. Immunol.**, 12:352-366, 2012.

RANDALL, L. M. et al. Common strategies to prevent and modulate experimental cerebral malaria in mouse strains with different susceptibilities. **Infect. Immun.**, 76:3312-3320, 2008.

RAQIB, R. et al. Down-regulation of Gamma Interferon, Tumor Necrosis Factor Type I, Interleukin 1 (IL-1) Type I, IL-3, IL-4, and Transforming Growth Factor b Type I receptors at the local site during the acute phase of *Shigella* infection. **Infect. Immun.**, 63:3079-3087, 1995.

RAY, J. C. J.; FLYNN, J. L.; KIRSCHNER, D. E. Synergy between individual TNF-Dependent functions determines granuloma performance for controlling *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, 182:3706 -3717, 2009.

REDDY, P. et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. **J. Biol. Chem.**, 275:14608-14614, 2000.

RICHMOND, J. M. et al. Mannose-capped Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces soluble TNFR production through TACE activation. **Infect. Immun.**, 80:3858-3868, 2012.

RÍOS-BARRERA, A. V. R. et al. Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. **Eur. J. Immunol.**, 36:345-353, 2006.

ROACH, D. R. et al. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J. Immunol.**, 168:4620-4627, 2002.

RODRIGUES, M. F. et al. Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. **Immunology**, 128:e691-e699, 2009.

ROJAS, M. et al. 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.; HERNADEZ-PANDO, R. The pathogenesis of tuberculosis. **Annu. Rev. Microbiol.**, 50:259-284, 1996.

ROTHER, M. et al. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. **Cell**, 78:681-692, 1994.

ROTHER, M. et al. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. **Cell**, 83:1243-1252, 1995.

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.

SAUNDERS, B. M. et al. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J. Immunol.**, 174:4852-4859, 2005.

SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat. Rev. Immunol.**, 2:965-975, 2002.

SCHAIBLE, U. E. et al. Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. **Nat. Med.**, 9:1039-1046, 2003.

SCHNEIDER, B. E. et al. A role for IL-18 in protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur. J. Immunol.**, 40:396-405, 2010.

SCHNEIDER-BRACHERT W. et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles. **Immunity**, 21:415-428, 2004.

SCHNEIDER-BRACHERT, W. et al. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. **J. Clin. Invest.**, 116:2901-2913, 2006.

SCHLÜTER, D.; DECKERT, M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. **Microbiol. Infect.**, 2:1285-1292, 2000.

SCHÜTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHERT, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signalling by receptor compartmentalization. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, 9:655-662, 2008.

SILVA, M. T. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. **FEBS Lett.**, 584:4491-4499, 2010.

SLY, L. M. et al. 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. et al. Impaired host defense to *Klebsiella pneumoniae* infection in mice treated with the PDE4 inhibitor rolipram. **Brit. J. Pharmacol.**, 140:855-862, 2003.

SPIRA, A. et al. 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.

SUN M.; FINK P. J. A new class of reverse signaling costimulators belongs to the TNF family. **J. Immunol.**, 179:4307-4312, 2007.

TARTAGLIA, L. A.; PENNICA, D.; GOEDEL, D. V. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. **J. Biol. Chem.**, 268:18542-18548, 1993.

TEIXEIRA, H. C.; ABRAMO, C.; MUNK, M.E. Immunological diagnosis of tuberculosis: problems and strategies for success. **J. Bras. Pneumol.**, 33:323-334, 2007.

van CREVEL, R., OTTENHOFF, T. H., van der MEER, J. W. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.**, 15:294-309, 2002.

van CRUCHTEN, S.; van DEN BROECK, W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embryol.**, 31:214-223, 2002.

van der WEL. et al. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. **Cell.**, 129:1287-1298, 2007.

VANDENABEELE, P. et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, 11:700-714, 2010.

WAJANT, H.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death. Differ.**, 10:45-65, 2003.

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

WEISS, T. et al. TNFR-80-dependent enhancement of TNFR60-induced cell death is mediated by TNFR-associated factor 2 and is specific for TNFR60. **J. Immunol.**, 161:3136-3142, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global tuberculosis report 2012. **WHO Press, Geneva**, 2011.

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. et al. No life without death – apoptosis as prerequisite for T cell activation. **Apoptosis**, 10:707-715, 2005.

WINAU, F. et al. Apoptotic vesicles crossprime CD8 T cells and protect against tuberculosis. **Immunity**, 24:105-117, 2006.

XANTHOULEA, S. et al. Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. **J. Exp. Med.**, 200:367-376, 2004.

ZHANG, J. et al. 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. et al. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. **Infect. Immun.**, 66:794-799, 1998.

ZHANG, M. et al. Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha pathway is radioprotective for the lung. **Clin. Cancer. Res.**, 14:868-876, 2008.

ANEXO A - Comprovante de aceite do artigo para publicação na revista Immunology, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Saúde Brasileira.

Immunology

The Journal of cells, molecules, systems and technologies

British Society for

Original Article

Tumor necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*

Michele F. Rodrigues¹, Caio C. S. Alves¹, Bárbara Bruna M. Figueiredo¹, Alice B. Rezende¹, Sabine Wohlfres-Viana², Vânia Lúcia da Silva¹, Marco Antônio Machado², Henrique C. Teixeira^{1,*}

DOI: 10.1111/imm.12097

© 2013 The Authors. Immunology © 2013 Blackwell Publishing Ltd

Immunology

Accepted Article (Accepted, unedited articles published online and citable. The final edited and typeset version of record will appear in future.)

SEARCH

In this issue ▼

▶

Advanced > Saved Searches >

ARTICLE TOOLS

- Get PDF (423K)
- Save to My Profile
- E-mail Link to this Article
- Export Citation for this Article
- Get Citation Alerts
- Request Permissions

Share |

Additional Information [\(Show All\)](#)

[Author Information](#)

[Publication History](#)

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as an 'Accepted Article', doi: 10.1111/imm.12097

Abstract

Cited By

[Get PDF \(423K\)](#)

Keywords:
TNFR1; TNFR2; Macrophage; Apoptosis; *M. bovis*

Summary

Apoptosis of macrophages has been reported as an effective host strategy to control the growth of intracellular pathogens, including pathogenic mycobacteria. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) plays an important role in the modulation of apoptosis of infected macrophages. TNF- α exerts its biological activities via two distinct cell surface receptors, TNFR1 and TNFR2, whose extracellular domain can be released by proteolysis forming soluble TNF receptors (sTNFR-1 and sTNFR-2). The signaling through TNFR1 initiates the majority of the biological functions of TNF- α , leading to either cell death or survival whereas TNFR2 mediates primarily survival signals. Here, the expression of TNF- α receptors and the apoptosis of alveolar macrophages were investigated during the early phase of infection with attenuated and virulent mycobacteria in mice. A significant increase of apoptosis and high expression of TNFR1 were observed in alveolar macrophages at 3 and 7 days after infection with attenuated *M. bovis* but only on day 7 in infection with the virulent *M. bovis*. Low surface expression of TNFR1 and increased levels of sTNFR1 on day 3 after infection by the virulent strain were associated with reduced rates of apoptotic macrophages. In addition, a significant reduction in apoptosis of alveolar macrophages was observed in TNFR1^{-/-} mice at day 3 after BCG infection. These results suggest a potential role for TNFR1 in mycobacteria induced alveolar macrophage apoptosis *in vivo*. In this scenario, shedding of TNFR1 seems to contribute to the modulation of macrophage apoptosis in a strain dependent manner.

© 2013 The Authors. Immunology © 2013 Blackwell Publishing Ltd

[Get PDF \(423K\)](#)