

Stefanny Lucía Viloche Morales

**A LECTINA BACTERIANA sMTL-13 REGULA A MORTE
CELULAR E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE
TUMORAL EM MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO POR
Mycobacterium tuberculosis.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Morales, Stefanny Lucia Viloche

A lectina bacteriana sMTL-13 regula a morte celular e produção de fator de necrose tumoral em macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis* / Stefanny Lucia Viloche Morales ; orientador, André Luiz Barbosa Báfica - Florianópolis, SC, 2014.

93 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. *Mycobacterium tuberculosis*. 3. Lectina. 4. sMTL-13. 5. Morte celular. I. Báfica, André Luiz Barbosa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

“A lectina bacteriana sMTL-13 regula morte celular e produção de fator de necrose tumoral em macrófagos durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*”.
por

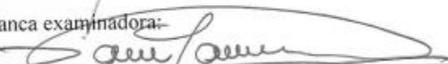
STEFANNY LUCÍA VILOCHE MORALES
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 09/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:

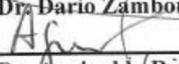


Prof. Dr. André Báfica (MIP/CCB/UFSC)

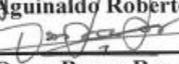
Banca examinadora:



Prof. Dr. Dario Zamboni (FMRP/USP)



Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto (MIP/CCB/UFSC)



Prof. Dr. Oscar Bruna Romero (MIP/CCB/UFSC)

Coordenador:



Prof. Dr. Marcelo Maraschin
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 14 de abril de 2014.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação, amadurecimento profissional e pessoal nestes dois anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. André, pelo carinho e atenção, por todos os ensinamentos sobre ciência e sobre a vida. Obrigada por ter me dado a oportunidade de crescer junto ao laboratório.

Ao Prof. Daniel e Prof. Fernando, que sempre participaram na discussão de resultados e contribuíram com ideias pertinentes para o desenvolvimento do trabalho.

Aos Profs. Aguinaldo, Edmundo e Mário, por terem gentilmente cedido reagentes e o espaço de seus laboratórios para a realização deste trabalho.

Nestes quatro anos e meio de LiDI tive a oportunidade de conhecer e trabalhar com muitas pessoas diferentes no nosso laboratório, mas também de outros do Departamento. Acredito que todas contribuíram de alguma forma para este trabalho, seja pela contribuição no meu amadurecimento profissional como pessoal.

Em especial, agradeço a Nicole, por ter me ajudado inúmeras vezes, mesmo à distância. Agradeço também a Carol e Jonatas, pela companhia e ajuda nos feriados, nas longas noites e madrugadas passadas no laboratório realizando experimentos.

Estendo meu agradecimento a todos do LiDI, minha segunda família, que tornam o ambiente de trabalho agradável, proporcionando ótimos momentos de descontração. Obrigada pelos inúmeros momentos de risadas, pela convivência e pela companhia nas excursões aos bares de Florianópolis.

Ao pessoal do laboratório de Protozoologia, pela ajuda e pelas conversas de corredor.

A meus amigos, que me proporcionam momentos de relaxamento até nos dias mais difíceis. Em especial ao Giancarlo, meu amigo irmão, cuja amizade de longa data sempre me ajudou a superar os momentos frustração. Os anos passam e a vida muda, levando-nos a lugares que nem imaginávamos, não é? Obrigada pela amizade incondicional e por estar sempre ao meu lado me apoiando, agora a quilômetros de distância.

À minha família, pelo amor, carinho e apoio em todos os momentos da minha vida. Pelos conselhos, orientação e incentivo em momentos críticos e na tomada de decisões.

À banca avaliadora pela disposição e aceite do convite.

Às agencias de fomento, HHMI e CAPES pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

Science, my lad, is made up of mistakes, but they are mistakes which it is useful to make, because they lead little by little to the truth.

(Jules Verne, 1864)

RESUMO

A infecção por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) pode levar a um estado latente no qual o hospedeiro é capaz de controlar o crescimento do patógeno. Embora uma resposta imune celular seja fundamental para o controle de *Mtb* dentro de macrófagos, foi demonstrado que fatores associados à micobactéria apresentam um papel importante no desenlace da infecção. Levando em consideração o alto impacto na saúde mundial causado pela tuberculose (TB), a ineficiência de vacinas e o surgimento de cepas de *Mtb* resistentes, há uma necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para diagnósticos, tratamentos e vacinas contra TB. O nosso grupo descreveu previamente uma nova lectina de 13 kDa secretada pelo *M. tuberculosis* (sMTL-13) e embora tenha sido sugerida a importância desta proteína em pacientes com tuberculose, ainda restam questões fundamentais da biologia desta lectina que precisam ser elucidadas. Para investigar o possível papel da sMTL-13 durante a infecção, um nocaute (Δ Rv1419) foi gerado. Um aumento significativo na morte celular foi observado em macrófagos infectados com Δ Rv1419, assim como o crescimento intracelular exacerbado em comparação com a infecção pela bactéria selvagem. Análises *in silico* da proteína, assim como a sua detecção na superfície do *Mtb*, sugerem que a sMTL-13 pode atuar na entrada da bactéria durante interação inicial patógeno-hospedeiro. Isto foi confirmado através de experimentos de adesão, onde foi observado que a capacidade do bacilo em se ligar à membrana do macrófago é afetada pela ausência da sMTL-13. Além disto, níveis mais baixos de TNF foram detectados em macrófagos infectados com Δ Rv1419, sugerindo que esta lectina pode ser importante para o reconhecimento do bacilo. Ademais, foi observado que a proteína purificada pode levar à morte celular via necrose em condições onde a função de caspase está bloqueada. Portanto, nós especulamos que a sMTL-13 regula a morte celular e produção de citocina pró-inflamatória como uma estratégia de sobrevivência, permitindo o crescimento do patógeno sem levar as células hospedeiras à morte prematura.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Lectina. sMTL-13. Morte celular.

ABSTRACT

Infection by *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) can lead to a latent state in which the host is able to control pathogen growth. While effective cellular immune responses are critical to control *Mtb* growth inside macrophages, it has been demonstrated that mycobacteria-associated factors play an important role in the outcome of infection. Given the high impact in public health caused by tuberculosis (TB), inefficient vaccine and emergence of *Mtb* resistant strains, there is a need for novel diagnosis, treatment and vaccine strategies against TB. We have previously described a novel secreted 13-kDa lectin in pathogenic *Mtb* (sMTL-13) and although a possible importance for this protein as a major mycobacterial antigen was shown in TB patients, fundamental questions on the biology of this lectin remain to be answered. In order to investigate the possible role of sMTL-13 during infection, a knock out mutant (Δ Rv1419) was generated. Significant cell death was observed in Δ Rv1419-infected macrophages as well as increased knockout intracellular growth compared to infection with wild type bacteria. *In silico* analysis of the protein as well as its detection on the surface of *Mtb* suggests sMTL-13 may act during bacteria entry in the cell in the initial pathogen-host interactions. This was confirmed by binding experiments where it was observed that the adhesion of bacilli is affected in the absence of sMTL-13. Furthermore, lower levels of TNF were detected in Δ Rv1419-infected macrophages, suggesting that this lectin may be important for cell recognition. In addition, it was shown that this purified protein can lead to cell death in a necrotic pathway in conditions where the function of caspases is impaired. Therefore, we speculate that sMTL-13 regulates cell death and pro-inflammatory cytokine production as a survival strategy, allowing pathogen growth without leading host cells to a premature death.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Lectin. sMTL-13. Cell death.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Incidência de novos casos de TB no mundo por 100.000 habitantes em 2012.....	24
Figura 2- Representação da parede celular micobacteriana.	27
Figura 3 – A resposta imune celular durante a infecção por <i>Mtb</i>	30
Figura 4 – Esquema geral das etapas envolvidas na resposta contra <i>Mtb</i>	32
Figura 5 – Análise da sequência aminoacídica da sMTL-13.....	51
Figura 6 – Análise da estrutura tridimensional predita da sMTL-13....	54
Figura 7 – Representação de um <i>cluster</i> de ligantes preditos para sMTL-13.....	55
Figura 8 – sMTL-13 está presente na parede celular de <i>M. tuberculosis</i>	56
Figura 9 – Avaliação de adesão das bactérias H37Rv e Δ Rv1419 na superfície de BMMs.	58
Figura 10 – Cinética de crescimento intracelular das bactérias H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos murinos até 72 horas.	59
Figura 11 – Taxa de crescimento das bactérias H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos murinos.	60
Figura 12 – Detecção de TNF e IL-10 no sobrenadante de culturas de BMM infectadas com H37Rv ou Δ Rv1419.....	62
Figura 13 – Fotomicrografias de culturas infectadas com H37Rv ou Δ Rv1419.....	65
Figura 14- Morte celular em culturas infectadas por H37Rv e Δ Rv1419..	68
Figura 15 – Purificação por FPLC de sMTL-13 recombinante expressa em <i>E. coli</i> Arctic Express.....	70
Figura 16 – Quantificação da concentração de LPS após a limpeza da proteína recombinante em coluna Detoxigel.....	71
Figura 17 – Indução de morte celular via necroptose com sMTL-13 recombinante.	72
Figura 18 – Esquema ilustrativo das possíveis vias de atuação da lectina sMTL-13.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419...	45
Quadro 2- Método de purificação por afinidade à histidina com a coluna Histrap FF 1 mL.	47
Quadro 3- Método de purificação por exclusão de tamanho com a coluna Superdex 200 10/300 GL.....	48
Quadro 4 – Proteínas selecionadas por homologia com a sequência completa da sMTL-13 usadas para a modelagem no servidor Phyre2..	52
Quadro 5 – Proteínas selecionadas por homologia com a sequência parcial da sMTL-13 usadas para a modelagem no servidor Phyre2.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG – Arabinogalactana
ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APCs – Células apresentadoras de antígeno
BMMs – Macrófagos derivados de medula óssea
BS3 – Nível de biossegurança 3
CFP – Proteínas do filtrado de cultura
CFU – Unidades formadoras de colônia
CLR – Receptor de lectinas do tipo C
CMTB – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
DCs – Células dendríticas
DFC – Doses fixas combinadas
DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DOT – Tratamento diretamente observado
EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético
ELISA – Ensaio imunoenzimático
ESAT-6 – Antígeno de 6 kDa secretado precocemente
FPLC – Cromatografia líquida rápida de proteínas
FS – Fração solúvel
HBHA – Hemaglutinina ligante de heparina
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
IFN- γ – Interferon gamma
IgG – Imunoglobulina do tipo G
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – Interleucina 12
IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
LB – Luria-Bertani
LDH – Lactato desidrogenase
LJ – Löwestein-Jensen
LPS – Lipopolissacarídeo
LXA4 – Lipoxina A4
MA – Ácido micólico
MDR-TB – Tuberculose resistente a múltiplas drogas
MOI – Multiplicidade de infecção
MOM – Membrana externa micobacteriana
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
Nec-1 – Necrostatina-1
NK – Células *natural killer*
NLR – Receptor do tipo NOD

NO – Óxido nítrico
O.D. – Densidade ótica
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMP – Padrão molecular associado a patógenos
PBMC – Células mononucleares de sangue periférico
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PG - Peptídeoglicana
PGE2 – Prostaglandina E2
Phyre2 – *Protein Homology/AnalogY Recognition Engine*
PRRs – Receptores de reconhecimento de padrões
RIPs – Proteínas inativadoras de ribossomos do tipo II
RIPK - Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase
SDS – Dodecil sulfato de sódio
sMTL-13 – lectina de 13 kDa secretada pelo *M. tuberculosis*
TB – Tuberculose
Th1 – *T helper 1*
Th2 – *T helper 2*
TLR – Receptor do tipo Toll
TNF – Fator de necrose tumoral
Treg – Células T regulatórias

SUMÁRIO

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
1.1 A TUBERCULOSE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO	23
1.2 BIOLOGIA DO <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
1.3 PATOGÊNESE DA DOENÇA	28
1.4 LECTINAS	33
2 OBJETIVOS	37
2.1 OBJETIVO GERAL	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3 METODOLOGIA	39
3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..	39
3.2 GERAÇÃO DE UMA CEPA DE <i>Mtb</i> DEFICIENTE PARA O GENE Rv1419	39
3.3 CULTIVO CELULAR	40
3.3.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMM)	40
3.3.2 Cultivo de <i>Mtb</i> H37Rv e ΔRv1419	41
3.4 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS PARA INFECÇÃO	41
3.5 CINÉTICA DE CRESCIMENTO INTRACELULAR DAS BACTÉRIAS H37Rv E Δ Rv1419	41
3.6 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DAS BACTÉRIAS H37Rv e Δ Rv1419 À SUPERFÍCIE DE BMM.....	42
3.7 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU)	42
3.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE sMTL-13 NA SUPERFÍCIE CELULAR DO <i>MTB</i> CEPA H37Rv.....	43
3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	43
3.10 DOSAGEM DE LDH	44
3.11 DETECÇÃO DE CASPASE-3 ATIVA	45
3.12 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE	45
3.12.1 Amplificação e clonagem	45
3.12.2 Expressão da sMTL-13 recombinante	46
3.12.3 Purificação da sMTL-13 por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC)	47
3.12.4 Avaliação da presença da sMTL-13	48
3.12.5 Remoção de lipopolissacarídeos (LPS)	49
3.13 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS TRATADAS COM sMTL-13 RECOMBINANTE	49
3.14 ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	50
3.14.1 Modelagem tridimensional da sMTL-13.....	50

3.14.2 Avaliação de possíveis ligantes da sMTL-13.....	50
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 CARACTERIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA sMTL-13 E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS LIGANTES ATRAVÉS DE ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	51
4.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DA sMTL-13 NA SUPERFÍCIE DE <i>MTB</i>	56
4.3 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA sMTL-13 NOS EVENTOS INICIAIS DE ADESÃO.....	57
4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA NOCAUTE $\Delta Rv1419$	59
4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TNF E IL-10 NO CONTROLE DA INFECÇÃO	61
4.6 CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS INFECTADAS COM $\Delta Rv1419$	63
4.7 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR EM DECORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR $\Delta Rv1419$	67
4.8 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR EM CULTURAS TRATADAS COM sMTL-13 RECOMBINANTE	69
4.8.1 Produção da proteína recombinante	69
4.8.2 Avaliação de morte celular.....	71
5 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 A TUBERCULOSE: ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E TRATAMENTO

No ano de 1882, quando a tuberculose (TB) levava a óbito um em cada sete habitantes no mundo, o microbiologista Robert Koch descreveu a etiologia da doença e isolou o patógeno, nomeado no ano seguinte *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (CAMBAU E DRANCOURT, 2014). A tuberculose é uma doença infecciosa que afeta predominantemente os pulmões, sendo que a TB pulmonar corresponde a aproximadamente 70% dos casos. No entanto, o *Mtb* também pode se disseminar para outros tecidos, incluindo linfonodos, ossos e meninges, causando a TB extra-pulmonar (WHO, 2013). Desta forma, por se tratar de uma doença que afeta principalmente as vias respiratórias, os pulmões representam não apenas os órgãos de entrada, mas também o principal sítio de infecção (KAUFMANN E DORHOI, 2013; O'GARRA *et al.*, 2013).

Pessoas acometidas com TB pulmonar ativa disseminam a doença através da tosse, promovendo a expulsão de gotículas contendo bacilos viáveis no ar. Após a inalação do patógeno, alguns indivíduos progridem rapidamente para a forma ativa da doença, chamada TB primária, que, embora seja mais comum em crianças, também ocorre em adultos (RUSSELL, 2007). Por outro lado, há indivíduos assintomáticos que não transmitem a doença, pois conseguem controlar a infecção inicial, mantendo-a em uma forma quiescente (TB latente) (KAUFMANN E DORHOI, 2013; O'GARRA *et al.*, 2013). Acredita-se que o desenlace da infecção para a forma ativa da doença depende não somente do balanço dinâmico entre a persistência bacteriana e a resposta imune (COOPER, 2009; DORHOI, REECE E KAUFMANN, 2011), como também da susceptibilidade genética do hospedeiro (WILKINSON *et al.*, 1999; ALCAIS *et al.*, 2010; COOPER, MAYER-BARBER E SHER, 2011). Assim sendo, somente uma parcela reduzida da população exposta ao *Mtb* desenvolverá a doença.

Estimativas baseadas em dados epidemiológicos indicam que um terço da população mundial possui a forma latente da doença (RUSSELL, 2007; YOUNG *et al.*, 2008; WHO, 2013) e, dentre estes, 5 a 20% desenvolverão TB ativa (WHO, 2013). A progressão da enfermidade é lenta e ocorre através da reativação de um foco pré-existente anos após a primeira exposição (O'GARRA *et al.*, 2013;

WHO, 2013). Diversos fatores aumentam o risco da progressão da infecção para a forma ativa, os quais estão relacionados à imunossupressão do indivíduo, como desnutrição, idade avançada, estresse ou ainda infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (DYE, 2006; RUSSELL, 2007; YOUNG *et al.*, 2008).

A TB é a segunda causa de morte por doença infecciosa no mundo (WHO, 2013). No ano de 2012, quase 20 anos após a Organização Mundial da Saúde (OMS) ter declarado TB como uma emergência de saúde pública mundial, a mortalidade desta doença foi reduzida globalmente a 45% e as taxas de incidência estão decaindo em grande parte do mundo (WHO, 2013). Dados epidemiológicos recentes estimam 8,6 milhões de casos no ano de 2012, sendo que 1,3 milhão de pessoas vieram a óbito por causa da doença. Dentre estas mortes foi estimado um total de 170.000 casos relacionados a cepas resistentes a múltiplas drogas (TB-MDR), um valor relativo alto comparado aos 450.000 casos de TB-MDR neste mesmo ano (WHO, 2013). Observando estes números, fica claro o alto impacto da TB na saúde pública global.

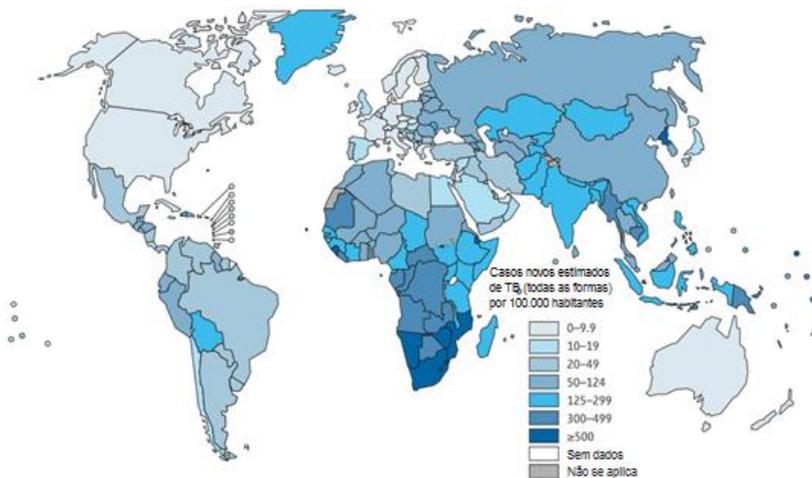


Figura 1- Incidência de novos casos de TB no mundo por 100.000 habitantes em 2012. Adaptado de Who (2013).

A taxa de incidência de TB varia entre países, sendo que as menores taxas são vistas principalmente em países de alta renda, incluindo a maior parte da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos,

Japão, Austrália e Nova Zelândia. Nestes países a incidência é de menos de 10 casos por 100.000 habitantes. A região das Américas apresenta a menor média de carga de TB e a maior parte dos países desta região apresenta taxas menores que 50 por 100.000 habitantes (Figura 1) (WHO, 2013).

Existem 22 países que em conjunto perfazem cerca de 80% dos casos globais de TB, sendo que a maioria destes apresentam taxas de 150-300 casos por 100.000 habitantes. Nove dentre os dez países com as maiores taxas de incidência no mundo se encontram no continente africano, sendo que na África do Sul e Suazilândia estima-se que pelo menos um em cem habitantes desenvolva TB a cada ano. Embora o Brasil se encontre dentre este grupo juntamente com a China, ambos os países apresentam as menores taxas do conjunto (WHO, 2013).

No Brasil estimativas recentes indicam 92 mil casos incidentes e 120 mil casos prevalentes com mortalidade de 4,9 mil pessoas por ano (WHO, 2013). Embora Santa Catarina tenha sido o estado com a menor incidência de TB no ano de 2010 (27 em 100.000 habitantes), alguns de seus municípios apresentaram taxas de incidência iguais ou até maiores que o observado no País (BRASIL, 2009; SINAN, 2011).

Embora um grande avanço tenha sido alcançado desde a implementação do Tratamento Diretamente Observado (DOT) na década de 90, o controle da epidemia é comprometido pela ausência de uma vacina efetiva, pelo surgimento de cepas resistentes às drogas usadas no tratamento e pela falta de métodos diagnósticos rápidos e sensíveis (YOUNG *et al.*, 2008; MCSHANE *et al.*, 2012; WHO, 2013).

Atualmente, o regime terapêutico da doença tem uma duração mínima de seis meses e é dividido em duas fases; a intensiva, para a eliminação de *Mtb* replicando ativamente, e a fase de manutenção, de forma a assegurar que bacilos persistentes sejam também atingidos. O tratamento é realizado através da administração em conjunto de etambutol, rifampicina, isoniazida e pirazinamida na forma de um único comprimido com doses fixas combinadas (DFC), o que simplifica o regime terapêutico, melhora a adesão, e conseqüentemente, diminui o risco de persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência (SIQUEIRA *et al.*, 2010; WHO, 2013).

Fatores complicadores do tratamento estão relacionados diretamente à biologia do patógeno. Isto se dá pela sua localização no meio intracelular, divisão lenta e à presença de uma parede celular que fornece uma barreira de permeabilidade eficiente para compostos nocivos, tornando o *Mtb* intrinsecamente resistente a várias drogas

(NIKAIDO, 1994; BRENNAN E NIKAIDO, 1995; NGUYEN E PIETERS, 2009).

1.2 BIOLOGIA DO *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mtb*, também conhecido como bacilo de Koch, é uma bactéria pertencente à Classe Actinobacteria, Ordem Actinomycetales, Família Mycobacteriaceae e Gênero *Mycobacterium*. Espécies pertencentes a este gênero são amplamente distribuídas no ambiente, dentre as quais existem parasitas obrigatórios, saprófitos e patógenos oportunistas (RASTOGI, LEGRAND E SOLA, 2001; COOK *et al.*, 2009). Os organismos deste táxon são separados em dois grupos: as micobactérias não causadoras de TB e o Complexo *M. tuberculosis* (CMTB), formado por *Mtb*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*, espécies que podem causar a doença (BROSCH *et al.*, 2002).

As micobactérias são bacilos aeróbicos de 0,3 a 0,6 μm de diâmetro e de comprimento variando de 1 a 4 μm (BRENNAN E NIKAIDO, 1995). As espécies do gênero *Mycobacterium* possuem taxas de crescimento bastante variáveis, dentre as quais existem bactérias de crescimento rápido, cujas colônias são visíveis a olho nu em até sete dias, e bactérias de crescimento lento, que precisam de mais de sete dias sob as mesmas condições para produzir colônias visíveis. Isto é um reflexo do período de geração destes bacilos que pode demorar até aproximadamente 20h, como no caso de *Mtb* (COOK *et al.*, 2009; NIEDERWEIS *et al.*, 2010), característica que é responsável pela natureza crônica da doença, além de dificultar o diagnóstico e levar a tratamentos farmacológicos de longa duração (KAUFMANN, 2001).

Embora a coloração de Gram não seja efetiva para estas bactérias, elas são consideradas Gram positivas, uma vez que apresentam composição química geral semelhante a frações da parede celular de outras bactérias deste grupo (CUMMINS E HARRIS, 1958). As micobactérias, no entanto, apresentam uma parede celular altamente complexa, constituído por uma membrana plasmática e parede celular, cuja estrutura pode ser observada na Figura 2 (NIEDERWEIS *et al.*, 2010).

O constituinte presente em maior abundância na parede micobacteriana é o ácido micólico (MA), molécula complexa e ramificada que pode apresentar de 60 a 90 carbonos. Acredita-se que os ácidos micólicos tem um papel crucial na manutenção da notável arquitetura e impermeabilidade da parede celular das micobactérias,

estando presentes nas duas camadas da membrana externa micobacteriana (MOM), também conhecida como micomembrana (COOK *et al.*, 2009; MARRAKCHI, LANÉELLE E DAFFÉ, 2014).

A camada mais externa da parede celular de *Mtb* é composta principalmente por glucanas e proteínas, com uma quantidade reduzida de lipídeos. Abaixo desta, observa-se a MOM, considerada a camada de permeabilidade, uma vez que nela estão inseridas proteínas formadoras de poros que permitem a translocação de moléculas através desta estrutura (COOK *et al.*, 2009; NGUYEN E PIETERS, 2009). O folheto superior da micomembrana é composto por lipídeos e ácidos graxos de cadeias curtas e longas e o seu folheto interno é formado pelo arranjo paralelo de cadeias de MA covalentemente unidas ao polímero arabinogalactana (AG) – formado por subunidades de arabinose e galactose – que, por sua vez, está ligado à peptídeoglicana (PG) (NIEDERWEIS *et al.*, 2010; MARRAKCHI, LANÉELLE E DAFFÉ, 2014).

Ainda vale ressaltar que outras moléculas se encontram difundidas pela parede celular, dentre estas fosfatidilinositol, lipomanan e lipoarabinomanan. Além das proteínas micobacterianas se encontrarem dispersas, elas também estão presentes acima da membrana plasmática, na chamada camada granular (CHATTERJEE E KHOO, 1998; ZUBER *et al.*, 2008).

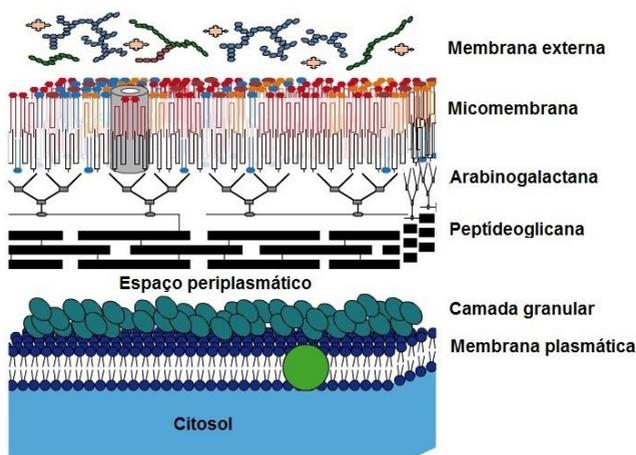


Figura 2- Representação da parede celular micobacteriana. Adaptado de Marrakchi, Lanéelle e Daffé (2014).

Este revestimento altamente complexo que envolve as micobactérias contribui para sua sobrevivência e resistência a ambientes hostis, como o ambiente nocivo do meio intracelular de células fagocitárias. Mutações e tratamentos que afetam a biossíntese e a produção de lipídeos em *Mtb* evidenciam a importância da integridade da parede celular para sobrevivência do patógeno dentro de células, visto que estas manipulações acarretam o aumento da permeabilidade celular e consequente perda de virulência (BARRY *et al.*, 1998). Além disto, a parede micobacteriana fornece uma grande fonte de moléculas antigênicas que estão relacionadas ao reconhecimento e a resposta imune gerada pelo hospedeiro (ERNST, 1998; BRENNAN, 2003; RUSSELL, 2013).

1.3 PATOGÊNESE DA DOENÇA

Avanços no estudo da imunopatologia da doença deixam cada vez mais claro que *Mtb* é um patógeno bacteriano altamente robusto que não somente tem a capacidade de resistir ao ambiente hostil do hospedeiro, como também pode subverter a resposta protetora do organismo colonizado. A partir do momento em que o bacilo atinge os alvéolos do hospedeiro (FENNELLY *et al.*, 2012), ocorre uma intensa migração de células fagocitárias para o local, levando à captura do *Mtb* por macrófagos alveolares, neutrófilos e células dendríticas (DCs) (WOLF *et al.*, 2007; LOWE *et al.*, 2012; KAUFMANN E DORHOI, 2013). Estas células fagocitárias, consideradas a primeira barreira de defesa do organismo contra a infecção, desempenham um papel fundamental no reconhecimento inicial do bacilo, assim como no direcionamento da resposta imune adaptativa devido à sua atuação como células apresentadoras de antígeno (APCs).

A adesão do bacilo a estas células ocorre em domínios ricos em colesterol na membrana plasmática da célula do hospedeiro (GATFIELD E PIETERS, 2000) e sua entrada por fagocitose envolve diferentes tipos de receptores que podem se ligar a *Mtb* não opsonizado ou ainda a opsoninas na superfície micobacteriana. Dentre estes podem ser citados receptores do tipo *scavenger*, receptores de complemento 1, 3 e 4 (CR1, CR3 e CR4), além de receptores de lectinas do tipo C, como o receptor de manose, DC-SIGN e dectina-1 (ERNST, 1998; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011).

O revestimento do patógeno com anticorpos, proteínas do complemento, lectinas e surfactantes pode levar ao seu reconhecimento

por receptores opsônicos. No contexto da infecção natural, acredita-se que a interação direta de *Mtb* com receptores dos fagócitos seja importante durante a infecção primária com a bactéria inalada, uma vez que soro e componentes do complemento uma vez que sua disponibilidade é limitada no espaço alveolar. A captura mediada por opsonização ou soro parece ser mais importante em estágios mais tardios da infecção (STOKES *et al.*, 1993).

Tendo em vista que a invasão de macrófagos pelo bacilo é crítica para o estabelecimento da infecção, *Mtb* dispõe de diversas estratégias de sobrevivência e crescimento intracelular. Embora seja possível observar a formação de um fagossomo circundando o bacilo após sua entrada na célula (ARMSTRONG E HART, 1971), foi demonstrado que cepas virulentas de *Mtb* são capazes de impedir a fusão destas vesículas com lisossomos, o que previne a sua acidificação e, conseqüentemente, leva à persistência bacteriana no meio intracelular (STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994; VERGNE *et al.*, 2005). Patógenos bem sucedidos como, por exemplo, *Salmonella typhi*, parecem ter sua sobrevivência relacionada a uma via de entrada na célula que não está ligada à ativação de mecanismos antimicrobianos de macrófagos, como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ISHIBASHI *et al.*, 1990). Até o momento não foi esclarecido se *Mtb* usa de receptores seletivos como uma estratégia patogênica de proliferação intracelular. Desta forma, é possível que as diversas vias de entrada do bacilo levem a um padrão de secreção de citocinas ou sinalização *downstream* diferenciados, influenciando na sobrevivência de *Mtb*.

Um dos mecanismos dos quais o macrófago dispõe para a eliminação destas bactérias é via morte por apoptose. Este mecanismo de morte, onde a integridade da membrana plasmática das células é preservada, está associado com a diminuição na viabilidade dos bacilos intracelulares e, conseqüentemente, com uma melhor resposta imune (BEHAR *et al.*, 2011). Por outro lado, quando a infecção por *Mtb* leva à morte de macrófagos via necrose, ocorre lise celular e, com isso, a disseminação de bacilos viáveis. O direcionamento para o tipo de morte durante a infecção depende do balanço entre os eicosanoides prostaglandina E2 (PGE2), molécula que promove a apoptose de células da imunidade inata, e lipoxina A4 (LXA4) que promove a morte celular via necrose (Figura 3A) e contribui para a sobrevivência de *Mtb* (BAFICA *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008; BEHAR *et al.*, 2011).

Neste contexto, foi demonstrado que cepas virulentas de *Mtb* induzem baixos níveis de apoptose e crescem de maneira progressiva no

meio intracelular, o que não é observado em cepas não virulentas (KELLY *et al.*, 2008). Esta evasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro se dá em parte através da indução de LXA4 e inibição de PGE2, o que leva à necrose de macrófagos e neutrófilos assim como à inibição da via apoptótica, resultando na disseminação da micobactéria (CHEN *et al.*, 2008; DIVANGAHI *et al.*, 2010; BEHAR *et al.*, 2011).

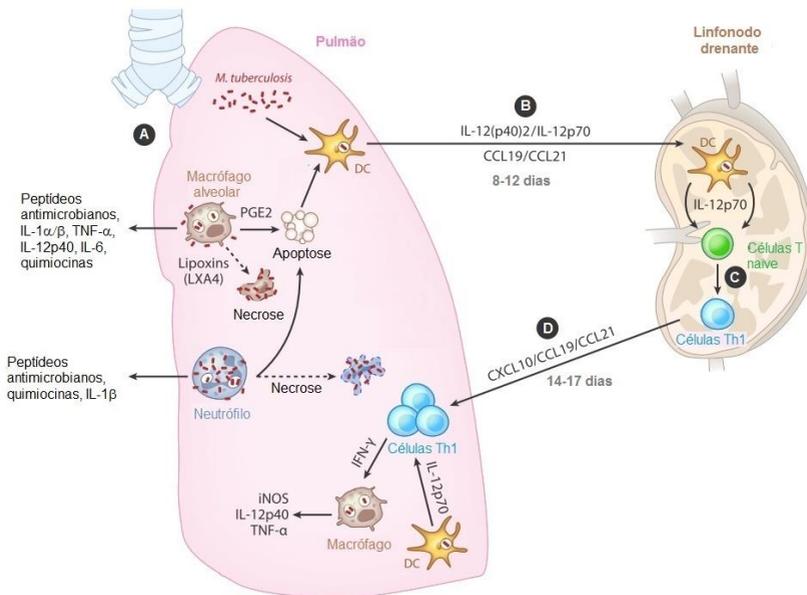


Figura 3 – A resposta imune celular durante a infecção por *Mtb*. Após infecção via aerossol, macrófagos alveolares, neutrófilos e DCs podem ser infectadas, levando à produção de citocinas e quimiocinas para o controle da infecção. O balanço entre os mediadores lipídicos no interior de macrófagos infectados é importante para determinar a via de morte destas células (A). DCs infectadas migram sob a influência de IL-12 e das quimiocinas CCL19 e CCL21 para o linfonodo drenante após 8-12 dias da infecção (B), promovendo a diferenciação de células T *naíve* ao fenótipo Th1 (C). Entre 14 a 17 dias após a exposição inicial, células Th1 antígeno-específicas migram para o local da infecção e produzem IFN-γ, levando à ativação de macrófagos, produção de citocinas e o controle bacteriano (D). Adaptado de O'garra *et al.* (2013).

Durante a infecção por *Mtb*, diversos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) estão envolvidos na sinalização via APCs. Dentre estes estão os receptores do tipo Toll (TLRs),

especificamente TLR2, TLR4 e TLR9, receptores de lectinas do tipo C (CLRs) – incluindo a dectina-1, o receptor de manose e DC-SIGN – e receptor do tipo NOD (NLRs) (SCHAFER *et al.*, 2009; TANNE *et al.*, 2009; KLEINNIJENHUIS *et al.*, 2011). A atuação destas moléculas em conjunto determina a resistência do hospedeiro frente à infecção pelo bacilo e, além de promover a produção de citocinas e quimiocinas (RUSSELL, 2007; COOPER, MAYER-BARBER E SHER, 2011; FABRI *et al.*, 2011), são essenciais para a ativação de células T (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT E JANEWAY, 1997; SCANGA *et al.*, 2004; BAFICA *et al.*, 2005; ROTHFUCHS *et al.*, 2007; DIVANGAHI *et al.*, 2008; COURT *et al.*, 2010).

Foi demonstrado que a imunidade protetora durante a infecção por *Mtb* é amplamente dependente da atividade de células TCD4⁺, embora células TCD8⁺ também contribuam para a resposta imune contra o patógeno através da secreção de produtos citotóxicos que podem eliminar células infectadas ou ainda diretamente os bacilos (FENG *et al.*, 1999). Esta resposta celular, nomeada T *helper* 1 (Th1), é mais significativa do que a resposta T *helper* 2 (Th2) no panorama da TB (SCANGA *et al.*, 2000; COOPER, 2009).

Neste contexto, as DCs – consideradas as principais células apresentadoras de antígeno – desempenham um papel importante na geração da uma resposta imune celular, uma vez que após a fagocitose de bacilos no tecido pulmonar, estas células agora ativadas amadurecem e migram para os linfonodos drenantes (KAUFMANN, 2001; WOLF *et al.*, 2007) a fim de realizar a apresentação de antígenos e induzir a ativação de linfócitos T antígeno-específicos (Figura 3B e C) (TIAN *et al.*, 2005). Estas células infectadas induzem a diferenciação de células T para o fenótipo Th1 de forma dependente de interleucina 12 (IL-12) (COOPER *et al.*, 1997; COOPER, MAYER-BARBER E SHER, 2011).

Como resultado da ativação de células Th1 há produção de uma grande quantidade de citocinas, dentre as quais é importante ressaltar interferon gamma (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF) e IL-12, consideradas críticas para o controle da infecção por *Mtb* (FLYNN *et al.*, 1993; ORME *et al.*, 1993; FLYNN *et al.*, 1995; COOPER *et al.*, 1997; SCANGA *et al.*, 2000; COOPER, 2009). O IFN- γ liberado atua em macrófagos induzindo a maturação de endossomos (RUSSELL *et al.*, 2010), assim como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ambos importantes mecanismos bactericidas (HERBST *et al.*, 2011). Estes macrófagos agora ativados (juntamente a neutrófilos e DCs) secretam, dentre outras moléculas, TNF, cujo principal papel no

contexto da infecção por *Mtb* é aumentar a eliminação de bacilos intracelulares controlando a persistência do bacilo durante a infecção (MOHAN *et al.*, 2001; BOTHA E RYFFEL, 2003).

Além disto, a produção de interleucina 10 (IL-10) por APCs e linfócitos regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias através da inibição do processo de apresentação de antígeno por macrófagos e DCs. Sob sua atividade, a eliminação de bactérias intracelulares por macrófagos é afetada, uma vez que a produção de óxido nítrico (NO) e TNF é impedida (BOGDAN, VODOVOTZ E NATHAN, 1991; SARAIVA E O'GARRA, 2010).

Uma vez ativadas, as células T antígeno-específicas conseguem conter os bacilos em pequenas lesões granulomatosas. Os granulomas da TB humana são compostos por uma grande diversidade de células, apresentando um núcleo de macrófagos infectados, células gigantes multinucleadas, células epitelióides, macrófagos esponjosos e neutrófilos. Esta acumulação central de células é circundada por linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺, linfócitos B e fibroblastos, sendo que o último é responsável pela formação de uma cápsula periférica fibrosa (RUSSELL *et al.*, 2009; EGEN *et al.*, 2011). Uma característica clássica das estruturas granulomatosas em humanos é a presença de um centro caseoso necrótico que resulta da lise celular do centro do granuloma, tornando o microambiente hostil e hipóxico (TSAI *et al.*, 2006). Sugere-se que durante a fase latente da TB, os bacilos permanecem na zona hipóxica em um estado metabólico alterado, enquanto na TB ativa os bacilos replicam em zonas periféricas oxigenadas (BARRY *et al.*, 2009).

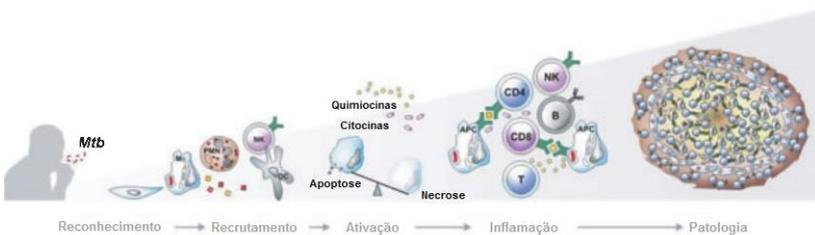


Figura 4 – Esquema geral das etapas envolvidas na resposta contra *Mtb*. Adaptado de Dorhoi, Reece e Kaufmann (2011).

Observando o panorama geral da resposta imune na TB (Figura 4), fica evidente a importância do entendimento das interações entre

Mtb-hospedeiro, sendo que o reconhecimento inicial do patógeno e a ativação adequada das células APCs são pontos críticos para o desenvolvimento de uma resposta protetora ou a patogênese e doença.

1.4 LECTINAS

Enquanto uma resposta imune celular efetiva é fundamental para o controle de *Mtb* no interior de macrófagos, foi demonstrado que fatores associados à bactéria, como proteínas, desempenham um papel importante no desenlace da infecção (O'GARRA *et al.*, 2013). Estas proteínas – presentes na superfície bacteriana ou secretadas – podem participar na manutenção e persistência do *Mtb* no hospedeiro e por este motivo são consideradas moléculas interessantes para estudo (DE SOUZA *et al.*, 2011).

Proteínas associadas à superfície do bacilo são importantes para diversos processos biológicos, como a interação célula a célula e sinalização celular, além de poderem estar envolvidas em mecanismos de patogenicidade (PIZARRO-CERDA E COSSART, 2006). A eficiência destas moléculas depende do endereçamento correto no momento em que estas proteínas são sintetizadas e para isto, bactérias apresentam diversos mecanismos de exportação ativa de proteínas, sendo o principal a via Sec, responsável pela translocação de proteínas através da membrana celular. No caso de *Mtb*, sabe-se que é necessária a presença de um peptídeo sinal, comumente localizado na porção N-terminal da sequência para o endereçamento da proteína (ABDALLAH *et al.*, 2007; DE SOUZA *et al.*, 2011). Embora seja comum a clivagem do peptídeo sinal, com a liberação da forma madura da proteína uma vez que a proteína chega à membrana, é possível que estas moléculas permaneçam associadas à superfície da bactéria (LEE E SCHNEEWIND, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2011). Acredita-se que um dos possíveis motivos para que isto aconteça seja devido à sobreposição da porção transmembrana da sequência com o sítio de clivagem das peptidases. Estas moléculas secretadas pelo bacilo estão presentes na fração de proteínas do filtrado de cultura (CFP) composta por aproximadamente 257 proteínas como demonstrado por espectrometria de massas (MALEN *et al.*, 2007).

Dentre estas moléculas associadas à superfície do bacilo e também secretadas, temos, por exemplo, a lipoproteína de 19 kDa, predominantemente associada à parede do bacilo e que induz uma resposta pro-inflamatória através de APCs pela produção de IL-12/23p40

(BRIGHTBILL *et al.*, 1999). Diversas proteínas do CFP foram descritas como sendo importantes proteínas para a resposta contra *Mtb*. Dentre elas é possível citar o antígeno de 6 kDa secretado precocemente (ESAT-6), cuja liberação leva à produção de IFN- γ por células T de memória (AL *et al.*, 1995). Outras moléculas presentes nesta fração incluem o CFP-10, que induz a produção de IFN- γ por células T e B, e o complexo Ag85 que induz a produção desta citocina além da proliferação de células T (SKJOT *et al.*, 2000; LAUNOIS *et al.*, 2011). Embora algumas proteínas já tenham sido descritas e estudadas pelo seu papel na modulação de processos inflamatórios, sabe-se que elas representam apenas uma parte reduzida do todo e ainda resta uma grande quantidade de moléculas cujo mecanismo de atuação ainda não foi esclarecido. O seu estudo pode criar perspectivas não somente para o melhor entendimento da biologia do *Mtb*, como também pode ter consequências positivas na criação de novos métodos diagnósticos, novos alvos para fármacos e desenvolvimento de vacinas.

Uma classe de proteínas que ainda permanece pouco explorada em microrganismos é a classe das lectinas, moléculas capazes de reconhecer e ligar a diversos carboidratos de maneira específica. Apesar de terem sido descobertas originalmente em plantas, as lectinas estão amplamente distribuídas na natureza, o que reflete a sua participação em diversos processos biológicos como a adesão célula a célula, apoptose e agregação (GOSWAMI *et al.*, 1994; MENOZZI *et al.*, 1996; PUJARI *et al.*, 2013; TATSUTA *et al.*, 2013). Atualmente, a lectina de *Mtb* mais bem estudada é a hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) que é capaz de se ligar a carboidratos sulfonados. A HBHA participa na adesão do bacilo a células epiteliais do hospedeiro e a sua atividade promove a disseminação extrapulmonar do *Mtb*, sendo então importante para a imunopatogênese da doença (MENOZZI *et al.*, 1996; PETHE *et al.*, 2001).

Embora o papel das lectinas na adesão de microrganismos à células do hospedeiro seja bem aceito, ainda existe uma lacuna no estudo destas moléculas e sua relação nas interações patógeno-hospedeiro. Neste contexto, através da criação de uma base de dados lectínica não redundante, o nosso grupo descreveu uma nova proteína codificada pelo gene Rv1419, nomeada lectina de 13kDa secretada pelo *Mtb* (sMTL-13). Análises *in silico* revelaram que esta proteína possui homologia ao domínio lectínico β -*trefoil* de proteínas inativadoras de ribossomos tipo II (RIPs), dentre as quais se destaca a cadeia B da ricina (NOGUEIRA *et al.*, 2010).

A ricina é composta por duas cadeias; a cadeia A é uma toxina capaz de impedir a síntese proteica em células de mamíferos, mas a sua atividade depende do seu sucesso em entrada nas células. Por outro lado, a cadeia B é capaz de interagir com carboidratos presentes na membrana destas células e desempenha o papel fundamental de carreador da cadeia A para o meio intracelular (OLSNES E PIHL, 1973).

Embora o grupo de PATRA e col. (2010) tenha iniciado estudos com a cristalografia da proteína em questão, até o presente momento a estrutura tridimensional não foi resolvida. Caracterizações prévias indicam que a sMTL-13 está presente no sobrenadante de cultura de *Mtb* cepa virulenta H37Rv (MALEN *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2010) e que é capaz de induzir aumento da produção de IFN- γ em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de pacientes com tuberculose ativa. Estes pacientes apresentam altos títulos de imunoglobulina do tipo G (IgG) contra sMTL-13, o que indica a atuação da sMTL-13 como antígeno (NOGUEIRA, 2012). A imunogenicidade desta lectina, determinada pela capacidade de ser reconhecida por células do sistema imune e levar a proliferação de linfócitos T CD4⁺ antígeno-específicos, sugere que a sMTL-13 pode atuar como um padrão molecular associado à patógenos (PAMP) (SOUZA, 2012).

Estes dados sugerem a relevância desta proteína como um importante antígeno micobacteriano. No entanto, questões fundamentais sobre a biologia desta lectina ainda necessitam ser esclarecidas. Desta forma, a hipótese deste estudo é que **a sMTL-13 produzida por *Mtb* participa nos eventos iniciais da interação patógeno-hospedeiro, modulando a resposta imune protetora do indivíduo.**

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a importância da lectina sMTL-13 para o estabelecimento da infecção de *Mycobacterium tuberculosis* em macrófagos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Avaliar a importância da sMTL-13 no reconhecimento do bacilo;
- II. Avaliar o *fitness* do *Mtb* na ausência do gene Rv1419;
- III. Descrever alterações no perfil da resposta celular à infecção com *Mtb* nocaute para o gene Rv1419.

3 METODOLOGIA

3.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO E CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Camundongos machos, da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, foram utilizados para obtenção de medula óssea e diferenciação em macrófagos. Os animais foram alimentados em regime *ad libitum* e mantidos no Biotério Setorial do MIP em ciclo claro/escuro de 12h a temperatura de 22°C ± 2. O uso de animais neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob o protocolo PP00880.

3.2 GERAÇÃO DE UMA CEPA DE *Mtb* DEFICIENTE PARA O GENE Rv1419

O método utilizado foi baseado em substituição alélica por recombinação homóloga descrito por PARISH e STOKER (2000). A geração do mutante foi realizada previamente a este estudo e descrito em detalhe por NOGUEIRA (2012). Brevemente, usando iniciadores complementares às extremidades das regiões adjacentes ao gene alvo Rv1419, as sequências nucleotídicas foram amplificadas por PCR. Os oligonucleotídeos utilizados, introduziram os sítios de restrição para as enzimas *ScaI/HindIII* e *HindII/KpnI* a fim de facilitar a inserção no vetor de clonagem.

O produto de PCR foi subclonado no vetor p2NIL, que confere resistência à canamicina para a seleção em *Escherichia coli* e *Mtb*, além de possuir os genes *lacZ* e *sacB* que foram usados para seleção em placas de cultura. Os mutantes de *Mtb* obtidos na primeira etapa (*single cross overs*) eram resistentes à canamicina, apresentavam cor azul e sensibilidade a sucrose, em decorrência da incorporação do vetor p2NIL. Estas bactérias foram mantidas em meio Middlebrook 7H9 (BD Biosciences) suplementado com OADC (composto por ácido oleico, albumina bovina (fração V), dextrose e catalase), durante uma semana para que a fase final da recombinação homóloga ocorresse e os mutantes *double cross-overs* fossem formados.

A seleção dos mutantes que perderam o vetor p2NIL foi realizada através da coleta de colônias brancas resultantes do plaqueamento em placas contendo 2% sucrose e X-gal. A ausência do gene Rv1419 foi

confirmada por PCR convencional e a presença de possíveis mutações pontuais foi verificada por sequenciamento.

3.3 CULTIVO CELULAR

3.3.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMM)

Camundongos C57/BL6 foram eutanasiados através de deslocamento cervical e tiveram seus membros posteriores dissecados para o isolamento do fêmur e da tíbia em câmara de fluxo laminar. Para evitar o ressecamento, os ossos foram mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) até o momento da sua lavagem. De maneira asséptica, as epífises dos ossos foram cortadas com uma lâmina de bisturi e, usando uma seringa com agulha de insulina, o interior do osso foi lavado com meio DMEM para coleta de medula óssea.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 453 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em DMEM suplementado com 20% de sobrenadante de L929, 10% de soro bovino fetal (SBF, Hyclone), piruvato de sódio 1mM (Sigma), HEPES 25mM e L-glutamina 2mM (Invitrogen). O volume de meio usado foi determinado de forma a se obter uma suspensão em 36mL por animal usado e as células foram plaqueadas em duas placas de seis poços, resultando em 3mL da suspensão por poço. As placas foram mantidas durante cinco dias em incubadora a 37°C, 5% de CO₂. No quinto dia, adicionou-se 2mL de meio DMEM suplementado a cada poço e as placas foram devolvidas à incubadora, onde ficaram até o sétimo dia de cultivo.

Após sete dias em cultura, os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) para retirada de células não aderentes. As células aderentes, agora macrófagos diferenciados, foram removidas através do uso de Tripsina/ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 0,05% (Invitrogen) e jateamento vigoroso da monocamada com micropipeta de 1mL. Estas células foram coletadas e transferidas para um tubo Falcon de 50 mL, onde se adicionou DMEM com 10% de SBF a fim de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 453 x g, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 5 mL de DMEM suplementado com SBF, Piruvato de sódio, HEPES e L-glutamina nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente. As

células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com o uso de Azul de Tripán (Invitrogen) e a concentração foi ajustada de acordo com o experimento.

3.3.2 Cultivo de *Mtb* H37Rv e Δ Rv1419

Todos os procedimentos envolvendo *Mtb* foram realizados em fluxo laminar com nível de biossegurança 3 (BS3), utilizando como proteção individual máscaras N-95 (3M), luvas, toucas, propés e jalecos descartáveis.

As culturas de *Mtb* foram mantidas através de repiques semanais a partir de amostras congeladas da cepa laboratorial H37Rv e cepa nocaute Δ Rv1419. As amostras foram diluídas dez vezes em PBS e 50 μ L da suspensão de cada bactéria foram adicionados ao meio sólido Löwestein-Jensen (LJ – Laborclin). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C e usadas após 4-6 semanas de crescimento.

3.4 PREPARAÇÃO DAS SUSPENSÕES BACTERIANAS PARA INFECÇÃO

Uma vez obtido o crescimento bacteriano, as colônias foram raspadas do meio sólido e transferidas para um tubo contendo pérolas de vidro, que foi agitado em vórtex para a dissociação de agregados. Adicionou-se 1 mL de PBS ao tubo e ele foi novamente agitado em vórtex para obtenção da suspensão bacteriana. A suspensão foi recuperada e transferida para um novo tubo e a concentração de bactérias foi ajustada pela comparação entre a turbidez da suspensão e a turbidez do tubo n°1 da escala de McFarland, equivalente a 3×10^8 bactérias/mL. As escalas obtidas para cada experimento foram diluição na ordem 10^{-6} e 100 μ L da suspensão foram plaqueados meio ágar Middlebrook 7H10 (BD Biosciences) enriquecido com 10% OADC para confirmação da concentração de bactérias. Este procedimento é descrito em detalhe na seção 3.7.

3.5 CINÉTICA DE CRESCIMENTO INTRACELULAR DAS BACTÉRIAS H37Rv E Δ Rv1419

No dia precedente ao experimento, BMMs foram plaqueadas na concentração de 2×10^5 células / poço em placas de 96 poços e deixadas aderindo até o dia seguinte. A infecção foi realizada a partir da escala 1

de McFarland das suspensões bacterianas obtidas na seção 3.4. O volume usado foi determinado de acordo com a multiplicidade de infecção (MOI) escolhida para o experimento e o volume usado para cada MOI foi normalizado de forma que todos os poços ficassem com o mesmo volume final. Quatro horas após o momento da infecção, o sobrenadante foi coletado e os poços foram lavados com PBS para a remoção de bactérias extracelulares. À placa de quatro horas pós-infecção foram adicionados 200 μ L de saponina 1% (Vetec) para a lise das células e liberação de bactérias intracelulares. Esta placa corresponde ao *input*, ou seja, o número inicial da carga bacilar. As bactérias e o sobrenadante referente ao *input* foram armazenados a -20°C para futuro plaqueamento e dosagem de citocinas, respectivamente.

Às placas correspondentes a outros tempos de incubação foram adicionados 200 μ L de meio DMEM suplementado e devolvidas à incubadora. Uma vez que o tempo de incubação desejado era alcançado, o sobrenadante da placa foi coletado, foram adicionados 200 μ L de saponina 1% aos poços e as placas foram armazenadas a -20°C.

3.6 AVALIAÇÃO DA ADESÃO DAS BACTÉRIAS H37Rv E Δ Rv1419 À SUPERFÍCIE DE BMM

Para avaliar a capacidade de adesão das cepas H37Rv e Δ Rv1419, a infecção foi realizada como descrito na seção 3.5; no entanto, a incubação das células foi realizada em gelo durante 30, 90, 150 e 240 minutos. Uma vez terminado o período de incubação, os poços foram lavados gentilmente duas vezes com PBS para remover as bactérias não aderidas, e foram adicionado 200 μ L de saponina 1% aos poços para plaqueamento. A incubação das células a baixas temperaturas resulta no impedimento da internalização dos bacilos aderidos à superfície do macrófago, o que permite o estudo dos eventos iniciais da interação patógeno-célula.

3.7 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS (CFU)

As placas congeladas em saponina 1% foram descongeladas e cada poço foi jateado vigorosamente com o auxílio de uma pipeta para a liberação total de bactérias intracelulares. Após diluição seriada de ordem 10 da suspensão bacteriana, 50 μ L foram plaqueados em placas de

Petri contendo meio ágar 7H10 enriquecido com 10% OADC. As placas foram vedadas e mantidas a 37°C até o momento de contagem das colônias, 30 a 40 dias após o plaqueamento. Após o período de crescimento as colônias foram contadas e o número de CFU/mL foi determinado multiplicando o valor obtido pelo fator de diluição e corrigido de acordo com o volume plaqueado.

3.8 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE SMTL-13 NA SUPERFÍCIE CELULAR DO *MTB* CEPA H37RV

A escala de H37Rv foi preparada como mencionado na seção 3.4. No entanto, as bactérias foram suspensas em PBS com BSA a 1%. Em uma placa de 96 poços com fundo em “U” foram adicionadas 3×10^6 bactérias H37Rv, que foram lavadas com 200µL de PBS + 1% BSA e centrifugadas a 3.000 x g por 30 minutos a 20°C. Após a centrifugação, as bactérias foram incubadas com o sobrenadante de cultura monoclonal de hibridoma (clone 681.B2.B2) produtor de IgG anti-sMTL-13. A placa foi mantida a temperatura ambiente por uma hora e lavada como descrito anteriormente. Em seguida, as bactérias foram marcadas por uma hora com anticorpo secundário anti-IgG murino conjugado com Alexa 488 (Invitrogen), diluído 1.000 vezes e no volume final de 200µL. Os poços foram lavados novamente e as bactérias foram suspensas em paraformaldeído a 4% e mantidas por 16-18h a 4°C. No dia seguinte, a presença da proteína foi avaliada por citometria de fluxo com o equipamento FACSVerse (BD Biosciences) e analisadas no software FlowJo 7.2.2.

3.9 DOSAGEM DE CITOCINAS POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

A dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-10 foi realizada a partir do sobrenadante de infecção através de método de ELISA sanduíche, seguindo o protocolo do fabricante (eBioscience). Resumidamente, foi feita a sensibilização de placas Nunc Maxisorp com 100 µL de anticorpo de captura, previamente diluído em *Coating buffer*, por 16-18h a 4°C.

No dia seguinte, os poços foram lavados cinco vezes com 200µL de tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween-20) usando uma lavadora de microplacas (DYNEX Ultrawash Plus). O bloqueio foi realizado com 200µL de tampão de bloqueio (PBS com 0,05% de

Tween-20 com 5% de leite em pó desnatado) durante 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados como descrito anteriormente e 100µL do sobrenadante a ser testado, assim como 100µL do padrão, foram adicionados aos poços para incubação de 16-18 horas a 4°C.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas manualmente em BS3 e 100µL do anticorpo de detecção biotilado em *Assay diluent* foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e lavadas novamente. Adicionaram-se 100 µL de avidina conjugada com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) às placas e estas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, após a lavagem dos poços, foi adicionado 100µL do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenziazolina-6-sulfônico) (ABTS, KPL) para a reação colorimétrica ocorrer. Após o desenvolvimento da cor, 15µL da solução de parada contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) foram adicionados aos poços e a leitura foi realizada em leitora de placa de ELISA (Biotek) a 405 nm.

3.10 DOSAGEM DE LDH

A presença de lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante das culturas infectadas foi determinada através do kit Cytotox96 non-radioactive cytotoxicity assay seguindo as especificações do fabricante (Promega). Brevemente, o sobrenadante das culturas infectadas foi transferido para uma nova placa e as células restantes foram lisadas de forma a obter o LDH liberado espontaneamente e o que ainda permanecia dentro da célula.

As amostras foram então distribuídas no volume de 50µL por poço em uma placa de 96 orifícios. Foram adicionados 50µL de *Substrate Mix* aos poços e a placa foi incubada durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegida da luz. Em seguida, a reação foi interrompida com 50µL de solução de parada fornecida pelo fabricante e a leitura da placa foi realizada no comprimento de onda de 490 nm em leitora de placa de ELISA (Biotek). Os dados foram representados na forma de porcentagem de liberação em relação ao total, calculado através da fórmula:

$$\% \text{ Liberação} = \frac{O.D.\text{liberação espontânea}}{O.D.\text{liberação total}} \times 100$$

3.11 DETECÇÃO DE CASPASE-3 ATIVA

A presença de caspases ativas foi determinada através do kit colorimétrico Apotarget (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Para isto, células foram adicionadas a placas de 12 poços na concentração de 2×10^6 por poço e infectadas com MOI de 10. Após 48 e 72 horas do momento da infecção, as células foram lisadas com *Cell Lysis Buffer* (fornecido no *kit*) para obtenção do extrato total. As suspensões proteicas obtidas foram dosadas pelo método de BCA e diluídas de forma que a concentração final delas fosse 1-4mg/mL.

A reação foi realizada em placa de 96 orifícios, onde foram colocados 50µL de cada amostra e 50µL de *Reaction Buffer* fornecido pelo kit. Aos poços foi adicionado o substrato da caspase cuja atividade era desejada quantificar e a placa foi mantida em incubadora a 37°C sob proteção da luz durante 2 horas. A atividade das caspases foi determinada pela densidade ótica (O.D.) das amostras em 405nm em comparação com o valor obtido para o controle não estimulado.

3.12 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE

3.12.1 Amplificação e clonagem

A proteína recombinante sMTL-13 foi obtida através da técnica de DNA recombinante utilizando a bactéria *E. coli*. Para isto, a sequência do gene Rv1419 foi amplificada através da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores apresentados no Quadro 1. Utilizando o DNA da cepa H37Rv como molde, no produto obtido houve remoção do códon de parada e inserção de sítios de restrição para as enzimas *NdeI* e *XhoI*.

Quadro 1- Iniciadores utilizados para amplificação do gene Rv1419.

Iniciadores	Sequência
<i>Forward</i>	5' GGAATTCCATATGGGTGAATTACGGTTG 3'
<i>Reverse</i>	5' CCGCTCGAGCGGCACGCTATCCCA 3'

A amplificação foi realizada em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient) e consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 4 min, seguida de 36 ciclos formados por etapas de

desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização a 56°C por 1 min e extensão dos iniciadores a 72°C por 1 min. O produto obtido da PCR foi clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e usado para a transformação de *E. coli* DH5 α eletrocompetentes através de eletroporação.

A seleção de colônias positivas foi realizada em meio Luria-Bertani (LB) ágar acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina, uma vez que apenas as colônias capazes de crescer na presença deste antibiótico possuíam o plasmídeo. A presença do inserto Rv1419 foi confirmada através de PCR de colônia usando as condições previamente descritas. Uma vez que a seleção dos clones positivos foi realizada, procedeu-se com a purificação plasmidial através do *kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin Kit* (GE Healthcare). Os plasmídeos purificados e o vetor de expressão pET21a (Novagen, USA) foram digeridos com as enzimas de restrição *Nde*1 e *Xho*1 (Promega) e corridos em gel de agarose 1,5% para a purificação das bandas referentes ao inserto e ao vetor de expressão linearizado, através do *kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare).

Foi realizada a subclonagem do gene Rv1419 no vetor de expressão pET21a para produzir a proteína sMTL-13. Este plasmídeo insere seis resíduos de histidina na porção C-terminal da proteína e possui genes de resistência à ampicilina. Para isto, bactérias *E. coli* DH5 α foram transformadas por eletroporação e semeadas em LB ágar acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina para a seleção das colônias positivas. O plasmídeo foi então purificado pelo *kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin* (GE Healthcare) e 20ng deste DNA foram usados na transformação de bactérias *Arctic Express* eletrocompetentes.

3.12.2 Expressão da sMTL-13 recombinante

A expressão da sMTL-13 recombinante foi realizada em 10 L de LB sob indução de 1mM de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a 13°C. Após 24h de indução, as bactérias foram centrifugadas em tubos cônicos de 50 mL a 5.000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as bactérias foram suspendidas em tampão de lise (Tris-HCl 20mM, pH 7,5, contendo NaCl 300mM, imidazol 10mM, β -mercaptoetanol 10mM, glicerol 10% e inibidor de protease (Sigma)) na proporção de 5mL para cada litro de indução. A lise das células foi realizada em banho de gelo por seis ciclos de 30 segundos de sonicação com 85% de potência (sonicador modelo 120 Sonic

Dismembrator, Fisher Scientific). O homogenato obtido foi tratado com nuclease universal (Thermo) a temperatura ambiente e então a amostra foi centrifugada a 12.000 x g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, correspondente à fração solúvel (FS), foi transferido para um novo tubo e filtrado em membrana de 0,45µm.

3.12.3 Purificação da sMTL-13 por cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC)

A purificação de sMTL-13 presente na FS foi realizada no equipamento Äkta Avant 25 (GE Healthcare Life Sciences) através de cromatografia de afinidade seguida de gel filtração. A cromatografia de afinidade foi realizada com a coluna HisTrap FF 1mL (GE Healthcare Life Sciences) para purificação através da cauda de histidina presente na sMTL-13 recombinante. Para isto, foi realizado um gradiente de eluição com o tampão A – Tris-HCL pH7,520mM, NaCl 300mM, Imidazol 10mM, β-mercaptop 10mM, Glicerol 10% – e B, cuja constituição varia apenas na concentração de Imidazol que passa a ser 500mM. O método esta descrito em detalhe no Quadro 2.

Quadro 2- Método de purificação por afinidade à histidina com a coluna HisTrap FF 1 mL.

Método	
Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 5 CV
Injeção da amostra	Bomba de amostra: 50 mL
Lavagem da coluna	Porcentagem de B – 0% 15 CV
Eluição	Eluição gradiente Porcentagem de B 20 CV
Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 10 CV

Ao final da corrida, a presença da proteína nas frações obtidas foi avaliada em gel SDS-PAGE (separação 12%, concentração 4%) através de coloração de prata e Western Blot utilizando anticorpos anti-sMTL13 e anti-histidina (seção 3.12.4). As frações confirmadas como positivas

foram coletadas e concentradas em Centricon 3kDa (Amicon) para um volume final de 500 μ L.

A próxima etapa de purificação consistiu no uso da coluna Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) para o isolamento de proteínas por tamanho. Para isto, os 500 μ L da amostra foram injetados no sistema para a eluição da proteína em PBS, seguindo as condições apresentadas no Quadro 3. A identificação do pico correspondente à sMTL-13 e a pureza destas frações foi realizada por SDS-PAGE.

Quadro 3- Método de purificação por exclusão de tamanho com a coluna Superdex 200 10/300 GL.

Método	
Equilíbrio	Porcentagem de B – 0% 0,2 CV
Injeção da amostra	Loop capilar de 500 μ L
Eluição	Isocrática Porcentagem de B – 0% 3 CV
Lavagem da coluna	Porcentagem de B – 0% 2,5 CV

3.12.4 Avaliação da presença da sMTL-13

As amostras foram preparadas em microtubos adicionando tampão LDS 4x (Invitrogen) a 15 μ L de cada fração escolhida para teste e incubados em banho seco por 5 minutos a 95°C para que ocorresse a desnaturação proteica. As amostras foram então submetidas à eletroforese em dois géis SDS-PAGE em gel Bis-tris 1,0mm, 4-12% (Invitrogen) em tampão de corrida NuPAGE Running Buffer (Invitrogen) nas condições 200V/125mA. Após a corrida, um dos géis foi corado o *kit* para coloração com prata (Pierce), seguindo as recomendações do fabricante. A partir do outro gel, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose por duas horas (GE Healthcare) utilizando o módulo XCELL II Blot Module (Invitrogen), seguindo as especificações do fabricante.

Ao final deste período, a membrana foi lavada em tampão de lavagem que consistiu em TBS (20mM de Tris-base, 500mM NaCl pH 8,0) acrescido de 0,1% de Tween-20 (Sigma) e bloqueada por uma hora

sob agitação com 5% de leite em pó desnatado em tampão de lavagem. O anticorpo primário anti-sMTL-13 (clone 276.B7/IgG1κ) ou anti-histidina (Sigma) foi diluído, respectivamente, em tampão de bloqueio a 2μg/mL ou 10.000 vezes, respectivamente, e adicionado à membrana lavada para incubação por 16-18h a 4°C sob agitação. No dia seguinte, a membrana foi lavada novamente e incubada por uma hora a temperatura ambiente com o anticorpo secundário anti-IgG murino ligado a HRP (Cell Signaling) diluído 2.000 vezes em tampão de bloqueio. Finalmente, a membrana foi lavada e revelada com o *kit* ECL (Pierce).

3.12.5 Remoção de lipopolissacarídeos (LPS)

As frações positivas identificadas após a etapa final de purificação foram concentradas em Centricon 3kDa (Amicon) para um volume final de 1 mL. A remoção de endotoxinas presentes na amostra foi realizada através da coluna *Detoxi-gel endotoxin removing columns* (Thermo) seguindo as recomendações do fabricante. A amostra coletada após o procedimento foi quantificada através do método de BCA (Pierce), alíquotada e armazenada a -80°C para uso. Para avaliar se a remoção de LPS foi realizada com sucesso, a quantidade de endotoxina presente na amostra foi dosada pelo método de LAL com o *Chromogenic Endotoxin Quantitation Kit* (Pierce) seguindo as recomendações do fabricante.

3.13 AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS TRATADAS COM sMTL-13 RECOMBINANTE

De forma a determinar o envolvimento da sMTL-13 na regulação da morte celular, macrófagos foram pré-tratados por uma hora com o inibidor de pan-caspase zVAD 20μM (R&D) e inibidor de *receptor-interacting serine/threonine-protein kinase* (RIPK1) Necrostatina-1 (Nec-1, Calbiochem) 30μM. Após este período, necessário para inibição das vias de apoptose e necroptose, respectivamente, os macrófagos foram tratados com 10μg/mL de sMTL-13 recombinante e mantidos a 37°C, 5% de CO₂ por 12 horas. A coleta das amostras para dosagem de LDH foi realizada conforme descrito na seção 3.10.

3.14 ANÁLISES *IN SILICO*

3.14.1 Modelagem tridimensional da sMTL-13

A modelagem da proteína foi feita através do servidor *Protein Homology/AnalogY Recognition Engine 2* (Phyre2) no modo intensivo (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Resumidamente, o servidor faz uma busca por sequências que possuam homologia com a sequência aminoacídica inserida, neste caso a sMTL-13, e seleciona os 6 melhores *hits* que fornecem maior confiabilidade e cobertura ao modelo gerado. Estas proteínas selecionadas possuem estrutura conhecida determinada por cristalografia e são usadas como um *template* para criação do modelo solicitado (KELLEY E STERNBERG, 2009).

3.14.2 Avaliação de possíveis ligantes da sMTL-13

Os possíveis ligantes da sMTL-13 foram avaliados através do servidor *3DLigandSite* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dligandsite/>). Após o envio do modelo obtido na seção 3.14.1, o servidor identifica estruturas homólogas com seus ligantes a partir do banco de dados e seleciona os que apresentam melhor *score* para análise. Estas estruturas são então alinhadas com o modelo fornecido para determinar o posicionamento dos ligantes. A partir disto os ligantes são agrupados por proximidade e os resíduos localizados nas proximidades são preditos como parte do sítio de ligação (WASS, KELLEY E STERNBERG, 2010).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados são expressos como a média \pm erro padrão da média e foram submetidos aos testes não paramétricos ANOVA de uma via quando a análise envolvia mais de dois grupos e ANOVA de duas vias para grupos com mais de duas variáveis. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO TRIDIMENSIONAL DA sMTL-13 E AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS LIGANTES ATRAVÉS DE ANÁLISES *IN SILICO*

Estudos prévios do nosso grupo evidenciaram o potencial antigênico e imunogênico da sMTL-13. No entanto, questões fundamentais relacionadas à biologia desta lectina ainda necessitam esclarecimento (NOGUEIRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2012). Para tentar elucidar a atuação desta proteína no estabelecimento da infecção por *Mtb*, é importante determinar sua localização na bactéria, assim como possíveis interações com moléculas do hospedeiro.

Nogueira e col. (2010) realizaram previamente a caracterização da sequência aminoacídica linear do gene de cópia única Rv1419. A sequência de 474 nucleotídeos codifica uma proteína de 157 aminoácidos e apresenta um peptídeo sinal predito do tipo SEC que compreende os resíduos 1-33 (Figura 5). O sinal de clivagem para este peptídeo sinal localiza-se entre os resíduos Ala33 e Asp34, sendo que os aminoácidos que precedem este sítio seguem o padrão Ala-X-Ala (onde “X” representa qualquer aminoácido), sequência normalmente encontrada associada ao local de clivagem (TUTEJA, 2005). Acredita-se que a clivagem do peptídeo sinal leva à liberação da forma madura da proteína cuja sequência está sublinhada na Figura 5.

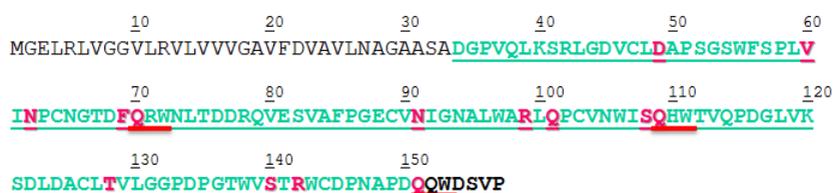


Figura 5 – Análise da sequência aminoacídica da sMTL-13. A porção referente à proteína madura está destacada em negrito; em ciano está destacado o domínio conservado de ricina B e seus padrões característicos (Q-X-W) estão sublinhados em vermelho. Os resíduos preditos para ligação a açúcares estão destacados em rosa.

Análises para detecção de domínios conservados indicaram a presença de homologia da sequência ao domínio lectínico β -trefoil do

tipo ricina B (destacado em ciano), apresentando as três repetições do padrão Q-X-W características deste domínio (HAZES, 1996) (sublinhado em vermelho), assim como os possíveis resíduos envolvidos na interação com açúcares em rosa (NOGUEIRA *et al.*, 2010) (Figura 5).

Uma vez que o conhecimento da estrutura de proteínas é essencial para o refinamento do conhecimento acerca de sua biologia, a busca por métodos computacionais para predição de estruturas é uma alternativa relevante para caracterização de proteínas. Desta forma, para o melhor entendimento da estrutura da sMTL-13, o modelo desta proteína foi gerado com o servidor Phyre2, que selecionou por homologia seis proteínas relacionadas para usar como *template*, de forma a maximizar a confiabilidade, a identidade e cobertura do alinhamento entre as sequências aminoacídicas (KELLEY E STERNBERG, 2009).

Levando em consideração que a sMTL-13 foi detectada no sobrenadante de cultura de *Mtb* (MALEN *et al.*, 2007; NOGUEIRA *et al.*, 2010), foram feitos dois modelos distintos baseados na sequência completa da proteína ou na região correspondente à proteína madura após clivagem do peptídeo sinal (Figura 5). As moléculas usadas como *template* para a geração do modelo com peptídeo sinal e sem peptídeo sinal estão descritas nos Quadros 4 e 5, respectivamente.

Quadro 4 – Proteínas selecionadas por homologia com a sequência completa da sMTL-13 usadas para a modelagem no servidor Phyre2.

PDB ID	Organismo	Nome
3A23	<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>Beta-L-Arabinopyranosidase complexed with D-galactose</i>
2IHO	<i>Marasmius oreades</i>	<i>MOA, a lectin from the mushroom Marasmius oreades in complex with the trisaccharide Gal(1,3)Gal(1,4)GlcNAc</i>
1ISZ	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	<i>Xylanase from Streptomyces olivaceoviridis E-86 complexed with galactose</i>
2Z48	<i>Cucumaria echinata</i>	<i>Hemolytic Lectin CEL-III Complexed with GalNac</i>
2VLC	<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>Natural cinnamomin (isoform iii)</i>
3VT2	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Ct1,3Gal43A in complex with isopropyl-beta-D-thiogalactoside</i>

Quadro 5 – Proteínas selecionadas por homologia com a sequência parcial da sMTL-13 usadas para a modelagem no servidor Phyre2.

PDB ID	Organismo	Nome
3A23	<i>Streptomyces avermitilis</i>	<i>Beta-L-Arabinopyranosidase complexed with D-galactose</i>
2Z48	<i>Cucumaria echinata</i>	<i>Hemolytic Lectin CEL-III Complexed with GalNac</i>
1HSZ	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i>	<i>Xylanase from Streptomyces olivaceoviridis E-86 complexed with galactose</i>
2IHO	<i>Marasmius oreades</i>	<i>MOA, a lectin from the mushroom Marasmius oreades in complex with the trisaccharide Gal(1,3)Gal(1,4)GlcNAc</i>
1YF8	<i>Viscum album</i>	<i>Himalayan mistletoe RIP</i>
2VLC	<i>Cinnamomum camphora</i>	<i>Natural cinnamomin (isoform iii)</i>

Como esperado, as proteínas selecionadas para gerar os dois modelos foram as mesmas com exceção de uma molécula. Estas proteínas estão distribuídas em diversos táxons, entre plantas, animais, fungos e bactérias, sendo que duas proteínas são provenientes de *Streptomyces* spp., gênero pertencente à Classe Actinobacteria, e por isso, mais próximo filogeneticamente do *Mtb*.

Pelo fato da sequência da proteína madura ser formada quase exclusivamente pelo domínio conservado (Figura 5), a sua modelagem foi realizada com sucesso por homologia com as proteínas selecionadas pelo servidor (Figura 6A). No entanto, no caso da sequência completa, a porção inicial da proteína dos resíduos 1-29 foi modelada *ab initio*, ou seja, a simulação do processo de dobramento da proteína naquela região foi realizada baseada apenas na sequência como *input* (Figura 6B). Isto pode ser devido ao fato que essa porção corresponde a uma região fora do domínio conservado. Consequentemente, este modelo teve 82% da sua estrutura modelada com mais de 90% de confiabilidade, enquanto 100% da sequência referente à proteína madura foi modelada com confiabilidade maior que 90%.

O método *ab initio* em geral apresenta baixa confiabilidade, especialmente para sequências longas, e por isso estruturas geradas exclusivamente por esta abordagem devem ser analisadas com cautela. Ainda assim, o seu uso limitado a pequenas regiões pode fornecer informações valiosas para o estudo de estruturas que de outra maneira

estariam indisponíveis sem que a estrutura seja determinada experimentalmente (KELLEY E STERNBERG, 2009).

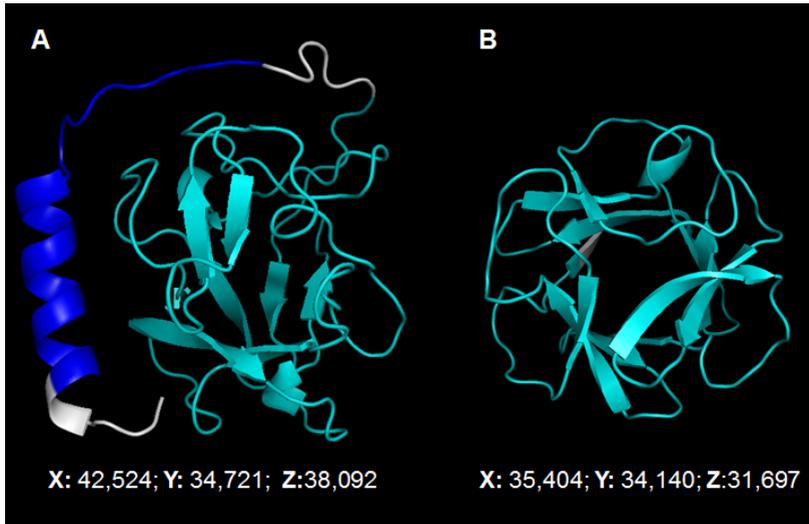


Figura 6 – Análise da estrutura tridimensional predita da sMTL-13. A modelagem tridimensional da proteína foi feita com a sequência completa (A) e com a porção da sequência referente à forma madura da proteína após a clivagem do peptídeo sinal (B). Em azul está destacada a porção de possível localização transmembranar e em ciano o domínio de ricina B. As dimensões do modelo estão expressas em Ångstrom.

De acordo com a predição do servidor, a região inicial da sequência da sMTL-13 corresponde a uma alfa-hélice representada em azul na Figura 6A. Quando é feita uma busca para o gene Rv1419 no banco de dados UniProtKB (código de acesso: Y1419_MYCTU) ou TubercuList (código de acesso: Rv1419), a alfa hélice presente no início da sequência é predita como uma possível região transmembrana onde estariam localizados os resíduos responsáveis pela associação à parede do *Mtb*.

Para fazer o levantamento dos possíveis ligantes da sMTL-13, os modelos obtidos na etapa anterior foram enviados ao servidor 3DBindingSite e a presença de ligantes putativos foi determinada por homologia com proteínas cuja cristalografia foi realizada em associação a seus ligantes. Os ligantes encontrados foram agrupados em *clusters* de acordo com sua proximidade de ligação, revelando oito agrupamentos

diferentes para ambas as proteínas. No caso da sequência completa, o maior *cluster* com maior *score* contém 15 ligantes, dentre os quais duas N-acetilglucosamida (NAG), oito galactoses (GAL), duas N-acetil-D-galactosamina (NGA), uma alfa-L-fucose (FUC) e duas arabinoses (ARA), representados em rosa na Figura 7. No caso da sequência parcial, o maior agrupamento contém 13 ligantes, dos quais 5 GAL, 3 NGA, 2 ARA (em rosa) e 3 íons de cálcio (Ca^{2+}), representados em verde na Figura 7.

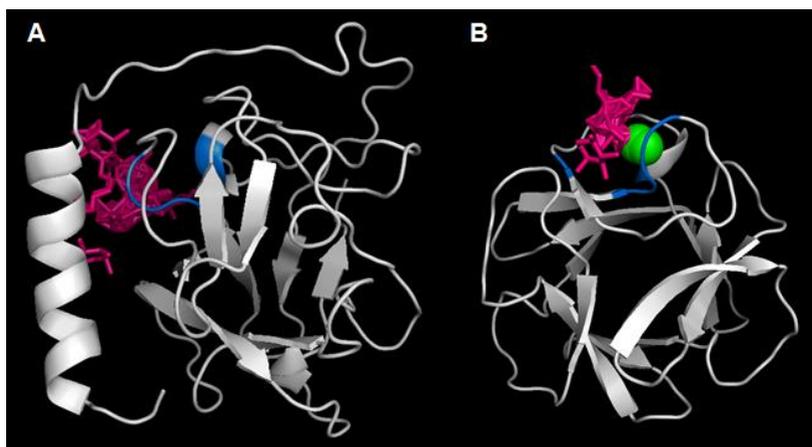


Figura 7 – Representação de um *cluster* de ligantes preditos para sMTL-13. Os açúcares estão representados na cor rosa e os íons de cálcio em verde. Os resíduos da proteína que participam da ligação estão representados na cor azul.

Observa-se também que, embora a localização dos agrupamentos de ligantes e os resíduos associados à superfície de interação com estas moléculas (representados em azul) sejam praticamente os mesmos nos dois modelos, a molécula com peptídeo sinal apresenta uma maior quantidade e diversidade de ligantes preditos. Considerando que a estrutura *β -trefoil* apresenta três lobos, cada lobo possui locais de adesão independentes. No entanto, na maioria das lectinas do tipo R, apenas um ou dois destes lobos apresentam os aminoácidos conservados necessários para a ligação a açúcares (CUMMINGS E ETZLER, 2009). Os resultados obtidos vão ao encontro desta característica, uma vez que os três maiores *clusters* preditos parecem se restringir a apenas dois lobos da proteína.

Em conjunto, estes resultados sugerem que a sMTL-13 pode estar associada à membrana através do peptídeo sinal e que seus ligantes podem variar dependendo do estágio de processamento da proteína. Por este motivo, é possível que a proteína esteja envolvida em interações com diferentes moléculas-alvo, dependendo da sua localização durante a infecção.

4.2 DETECÇÃO DA PRESENÇA DA sMTL-13 NA SUPERFÍCIE DE *Mtb*

A presença da sMTL-13 associada à superfície de *Mtb* foi demonstrada previamente através de *Western Blotting* da fração correspondente à parede celular da bactéria (Figura 8A) (NOGUEIRA *et al.*, 2010). Com o objetivo de confirmar sua localização na superfície nos bacilos através de outra metodologia, foi realizada a marcação de bactérias H37Rv com o sobrenadante de cultura de hibridoma (clone 681.B2.B2), contendo anticorpos monoclonais IgG anti-sMTL-13 para análise por citometria de fluxo.

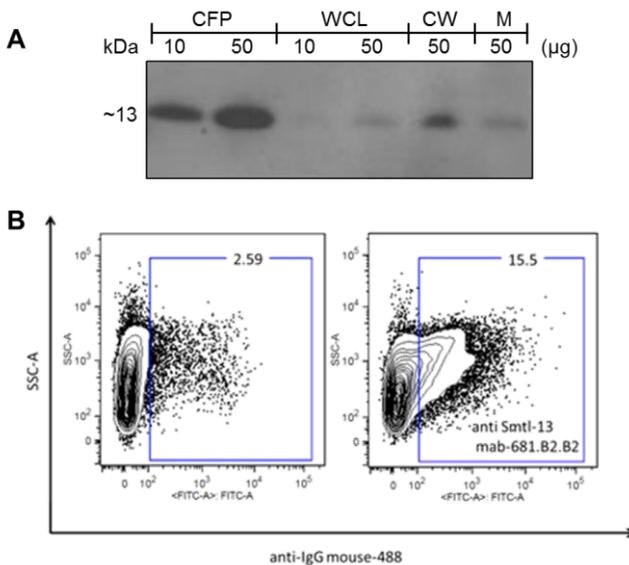


Figura 8 – sMTL-13 está presente na parede celular de *M. tuberculosis*. Em *western blotting* das frações referentes às proteínas do filtrado de cultura, lisado

total da célula, parede celular e membrana de *Mtb* (CFP, WCL, CW e M, respectivamente) foi detectado previamente a presença de sMTL-13 (A). A cepa H37Rv foi incubada com anticorpo monoclonal anti-sMTL-13 e marcado com anti-IgG murino conjugado com Alexa 488 para visualização da marcação da parede celular por citometria de fluxo. Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Observa-se na Figura 8B que após marcação do *Mtb* com o anticorpo monoclonal, há maior intensidade de fluorescência, reflexo do aumento da frequência de bactérias positivamente marcadas. Este dado confirma a associação da proteína à parede micobacteriana. Levando em consideração que o processo de endereçamento e secreção desta proteína em particular não é conhecido, ainda não se sabe a dinâmica da liberação da proteína no meio extracelular ao bacilo. Uma possibilidade é que haja uma prevalência da sMTL-13 madura em comparação com a proteína associada à parede celular e, por isto, a sua detecção na superfície de *Mtb* representaria um momento transitório até a sua secreção. Contudo, embora seja comum a clivagem do peptídeo sinal com a liberação da forma madura da proteína uma vez que esta chega à parede bacteriana, sabe-se também que elas podem permanecer associadas à superfície da bactéria (LEE E SCHNEEWIND, 2001; DE SOUZA *et al.*, 2011). Assim sendo, é possível que a sMTL-13 atue em ambas as localizações.

4.3 AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA sMTL-13 NOS EVENTOS INICIAIS DE ADESÃO

Com a finalidade de investigar o envolvimento desta proteína durante a infecção em macrófagos, nosso grupo gerou uma bactéria nocaute para o gene Rv1419, denominada Δ Rv1419 (NOGUEIRA, 2012). Sabe-se que moléculas presentes na estrutura da parede micobacteriana são importantes na interação com células do hospedeiro. Levando em consideração que a presença da proteína foi detectada na superfície dos bacilos, é cabível associar à sMTL-13 uma função na interação inicial patógeno-hospedeiro. Para investigar esta possibilidade, foi realizado um experimento de adesão, onde macrófagos murinos foram infectados com as cepas H37Rv ou Δ Rv1419 e mantidos em gelo por 30, 90, 150 e 240 minutos, de forma a evitar a entrada dos bacilos nas células.

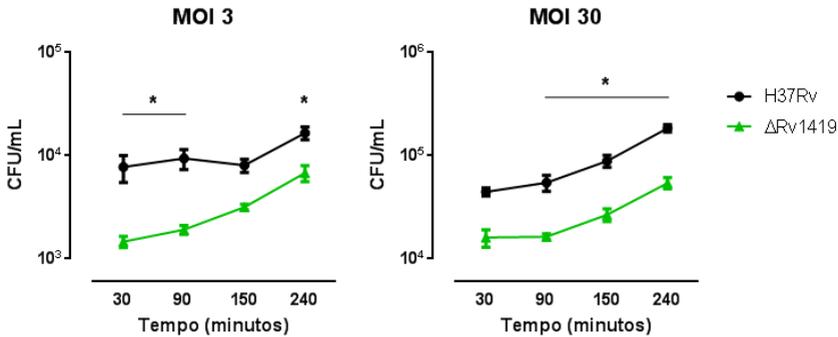


Figura 9 – Avaliação de adesão das bactérias H37Rv e ΔRv1419 na superfície de BMMs. Macrófagos (2×10^5) foram expostos às cepas padrão ou nocaute (MOI 3 ou 30) no gelo. Os dados estão expressos como a média + erro padrão da média de triplicatas; *diferença estatística significativa ($P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak) entre as duas bactérias. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Através desta abordagem é possível observar que sMTL-13 é importante para os eventos iniciais de interação do *Mtb* com a superfície de macrófagos, uma vez que o número de CFU correspondente à adesão do bacilo em culturas expostas à ΔRv1419 é significativamente menor em relação ao obtido em células expostas à cepa padrão (Figura 9). Embora ocorra um aumento na adesão da cepa mutante ao longo do tempo, 240 minutos após a infecção a quantidade de bactérias aderidas é meio log menor em comparação ao número de CFU obtido na interação das células com a cepa H37Rv.

Sabe-se que proteínas lectínicas, conhecidas também como adesinas, são caracterizadas pela sua capacidade de se ligar a carboidratos na superfície das células do hospedeiro e promover os processos de adesão, colonização e invasão (LEO E SKURNIK, 2011). A sua distribuição é ampla e, em protozoários, como o tripanossomatídeo *Leishmania* spp. *Plasmodium* sp., estas moléculas são utilizadas para o ancoramento à membrana celular do hospedeiro (JACOBSON E DOYLE, 1996).

Neste contexto, a lectina HBHA, uma proteína de 28 kDa encontrada na parede celular e CFP de *Mtb*, já foi descrita como sendo capaz de promover a adesão do bacilo a células epiteliais do alvéolo (PETHE *et al.*, 2001; BRIKEN, 2013). Esta facilitação da adesão do bacilo a células não fagocíticas é importante para a disseminação

extrapulmonar do *Mtb*. Tendo isto em vista, sMTL-13 parece compartilhar a característica de promover a adesão do patógeno embora, contrariamente à HBHA, seja importante para interação com células fagocíticas como macrófagos (PETHE *et al.*, 2001).

4.4 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE CRESCIMENTO DA BACTÉRIA NOCAUTE Δ Rv1419

Ainda que já tenha sido previamente descrito por nosso grupo que a deleção do gene não afeta crescimento da bactéria nocaute em relação à cepa H37Rv em sistema isolado (meio líquido enriquecido) (NOGUEIRA, 2012), o *fitness* da bactéria no estabelecimento da infecção em células fagocíticas ainda não havia sido investigado.

Desta forma, o próximo passo consistiu em observar se a proteína codificada pelo gene Rv1419 é importante para o desenvolvimento da infecção em macrófagos. Para isto, BMMs murinos foram infectados com diferentes MOI e o seu crescimento intracelular foi acompanhado até 72 horas através da quantificação de CFU a partir do lisado obtido com saponina 1% (Figura 10).

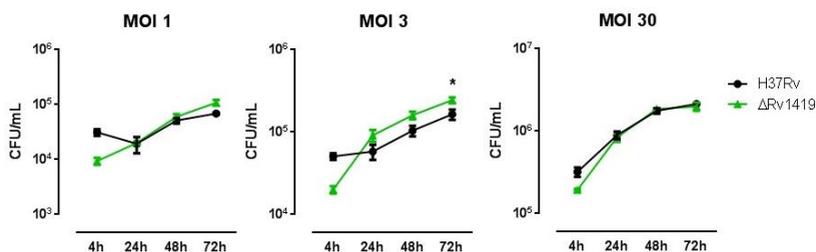


Figura 10 – Cinética de crescimento intracelular das bactérias H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos murinos até 72 horas. BMMs (2×10^5) foram infectados com *Mtb* (MOI 1, 3 ou 30). Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de triplicatas; *diferença estatística significativa ($P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak) entre as duas bactérias utilizadas. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Surpreendentemente, apesar de não ter sido notada nenhuma alteração em meio líquido enriquecido, ao analisarmos o crescimento intracelular da bactéria mutante comparada à cepa selvagem, a maior proliferação da Δ Rv1419 fica evidente. Na ausência de sMTL-13, ocorre uma diminuição na entrada de bacilos na célula, uma vez que o número

de CFU do *input* da infecção com a bactéria nocaute em MOI baixa é aproximadamente 3 vezes menor que o obtido na infecção com H37Rv. Este resultado pode ser explicado pela diferença observada na capacidade de adesão de *Mtb* à membrana celular dos macrófagos em decorrência da remoção do gene Rv1419.

Embora a quantidade inicial de bactérias intracelulares seja menor na infecção com Δ Rv1419, o número de CFU ao final da cinética é equivalente ou até maior em relação à cepa selvagem. Esta diferença fica clara quando analisamos a taxa de crescimento relativo das bactérias, onde os valores obtidos em cada incubação são avaliados em relação à quantidade de CFU do *input* (Figura 11).

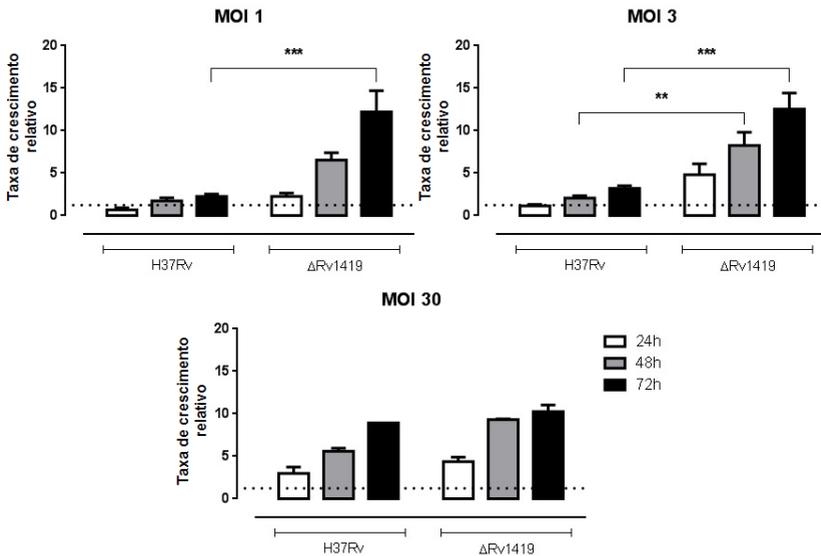


Figura 11 – Taxa de crescimento das bactérias H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos murinos. BMMs (2×10^5) foram infectados com *Mtb* (MOI 1, 3 ou 30). A taxa de crescimento relativo foi determinada em relação ao número inicial de bactérias intracelulares após 4h de infecção. A linha interrompida representa o *input*. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de triplicatas; diferença estatística significativa (***) $P < 0,001$ e (**) $P < 0,01$; ANOVA de duas vias seguida de teste de Sidak) entre as duas bactérias utilizadas. Figura representativa de dois experimentos independentes.

Nota-se uma diferença significativa na taxa de crescimento da bactéria nocaute durante a infecção com MOI de 1 e 3 em comparação

com H37Rv. Observando em detalhe o gráfico referente à MOI de 3, é possível notar que 24 horas após a infecção com Δ Rv1419 há um aumento de aproximadamente cinco vezes no número de CFU em relação à sua entrada inicial, enquanto que a taxa de crescimento relativo da cepa padrão fica em torno de um. Tendo em vista que o tempo de replicação de *Mtb* é de aproximadamente 20 horas, neste período de incubação apenas um evento de replicação teria acontecido. Embora seja possível que o perfil observado ocorra devido à redução no período de replicação dos bacilos, é mais plausível supor que, apesar de ambas as cepas apresentarem o mesmo tempo de replicação, os macrófagos conseguem controlar mais eficientemente a proliferação da cepa selvagem, o que como consequência, leva a um número menor de CFU em relação à cepa nocaute. Essa hipótese deve ser testada em estudos subsequentes.

Estes dados em conjunto sugerem que, embora a sMTL-13 não pareça estar envolvida com o crescimento isolado do bacilo é importante para a entrada do patógeno em macrófagos, sendo que sua ausência afeta a taxa de crescimento do *Mtb*.

4.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TNF E IL-10 NO CONTROLE DA INFECÇÃO

Alguns fatores, como a produção de citocinas, são cruciais para o estabelecimento de patógenos intracelulares no hospedeiro. Neste contexto, sabe-se que uma das citocinas chave produzida pelas células da imunidade inata para a restrição do crescimento de *Mtb*, em humanos e modelos experimentais, é o TNF (FLYNN *et al.*, 1995; SOLOVIC *et al.*, 2010). Uma vez que foi observado maior crescimento da cepa mutante, uma das possibilidades levantadas é que isto aconteça em decorrência de uma falha na produção desta citocina. Desta forma, os níveis de TNF foram dosados nos sobrenadante de culturas infectadas.

A partir da detecção do TNF liberado durante a cinética de infecção pelas cepas selvagem e nocaute, é possível observar que bactéria H37Rv leva à produção de níveis mais altos desta citocina. A deficiência na produção de TNF em culturas infectadas com Δ Rv1419 é notada desde cedo (4 horas), mantendo-se ao longo da cinética de maneira independente ao MOI usado (Figura 12A).

Tem sido amplamente descrito que moléculas presentes na complexa estrutura da parede celular micobacteriana participam na interação com células do hospedeiro, podendo atuar como antígenos

para o desenvolvimento de uma resposta efetiva (BARRY, 2001; Sinha *et al.*, 2005). Tendo em vista que a ausência de sMTL-13 afeta a produção de TNF, pode-se sugerir que esta proteína tenha capacidade de interagir com algum receptor presente na superfície de macrófagos, cujo reconhecimento seria importante para ativação celular. Outra possibilidade levantada para explicar este perfil é que a menor quantidade de bactérias na interação celular inicial pode levar a uma menor ativação dos macrófagos em comparação com a cepa selvagem e, como consequência, afetar o desenvolvimento de uma resposta micobactericida.

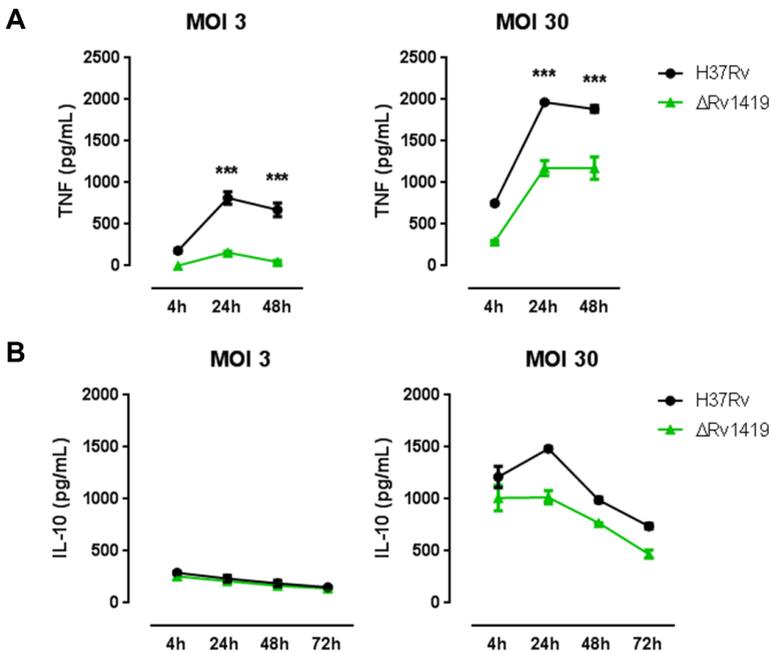


Figura 12 – Detecção de TNF e IL-10 no sobrenadante de culturas de BMM infectadas com H37Rv ou Δ Rv1419. BMMs (2×10^5) foram infectados com *Mtb* (MOI 3 ou 30) e o sobrenadante foi coletado para dosagem de TNF (A) e IL-10 (B) através do método de ELISA. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de triplicatas; ***diferença estatística significativa ($P < 0,001$; ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak) entre as duas bactérias utilizadas. Figura A representativa de dois experimentos independentes, B de um experimento.

A IL-10, produzida por diversas células imunes, apresenta um papel importante na supressão das funções de macrófagos e DCs, as quais são necessárias para a captura, controle e iniciação da resposta imune frente a patógenos como *Mtb* (REDFORD, MURRAY E O'GARRA, 2011). Sabe-se que a secreção de IL-10 inibe os mecanismos de macrófagos para eliminação de bactérias intracelulares, dentre os quais se destaca o TNF (BOGDAN, VODOVOTZ E NATHAN, 1991). Desta forma, os níveis desta citocina anti-inflamatória foram quantificados para investigar o seu envolvimento na regulação da produção de TNF no contexto da infecção na ausência da sMTL-13.

A dosagem de IL-10 nas culturas infectadas não revelou diferenças em sua produção, uma vez que níveis semelhantes foram encontrados de maneira independente à bactéria e MOI utilizado na cinética (Figura 12B).

Desta forma, os níveis mais baixos de TNF observados ao longo da cinética de crescimento das bactérias podem ser explicados devido à deficiência na interação e reconhecimento inicial da bactéria nocaute. O defeito na produção desta citocina pode levar à perda do controle da proliferação bacteriana no meio intracelular em macrófagos, o que reflete em uma carga bacilar maior na ausência de sMTL-13.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DE CULTURAS INFECTADAS COM Δ Rv1419

Ao acompanhar a morfologia das culturas infectadas por microscopia óptica a longo prazo, podemos notar que para MOI baixa há formação de grandes aglomerados celulares que persistem em culturas infectadas com Δ Rv1419, mas em células infectadas com a cepa padrão há uma regressão destas estruturas 120 horas após a infecção (Figura 13A). A aglomeração de macrófagos observada nas fotomicrografias geralmente está associada a células ativadas em um foco de infecção, para atuar na restrição do crescimento bacteriano. Pode-se ver que em MOI baixa a diferença na carga bacteriana intracelular fica mais evidente a partir de 120h (Figura 13C), o que corrobora que a morfologia alterada das células durante a infecção seja em decorrência da alta carga bacilar. Esta diferença na morte celular observada em culturas infectadas com a cepa nocaute fica mais evidente ao observar as fotomicrografias da infecção com MOI alto, apresentadas na Figura 13B.

É possível notar a presença de células mortas a partir de 48h após a infecção através do seu destacamento espontâneo da placa e características morfológicas. No entanto, isto fica mais evidente na fotomicrografia referente à 168h após a infecção com MOI de 1, onde percebe-se que os macrófagos formando aglomerado celular apresentam características relativas à morte celular, como por exemplo a mudança no formato da célula e superfície irregular (Figura 13A).

Embora a cepa H37Rv também leve à morte celular ao longo da cinética, a diferença em relação a células que entraram em contato com a bactéria mutante pode ser percebida a partir de 72h com MOI alto. O aumento do número de células mortas fica evidente a partir de 120h após a infecção, o que corresponde também a um aumento na proliferação bacteriana em CFU (Figura 13B e D).

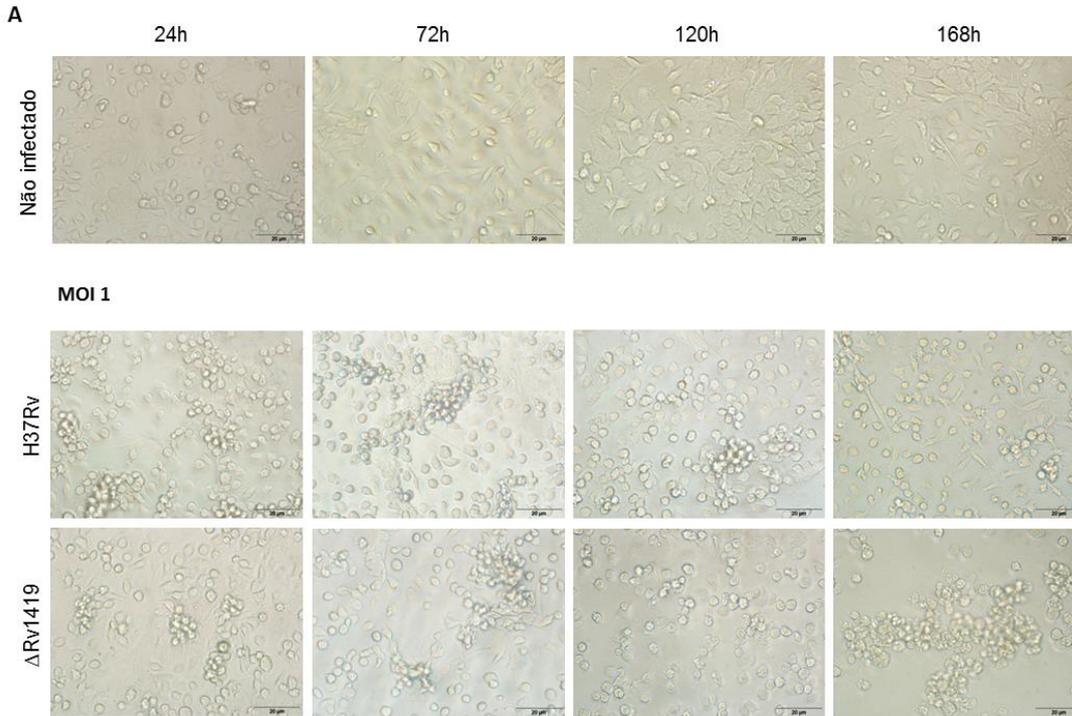


Figura 13 – Fotomicrografias de culturas infectadas com H37Rv ou Δ Rv1419. Fotos representativas da morfologia celular após infecção com MOI 1(A) e MOI 30 (B), a barra corresponde a 20 μ m.

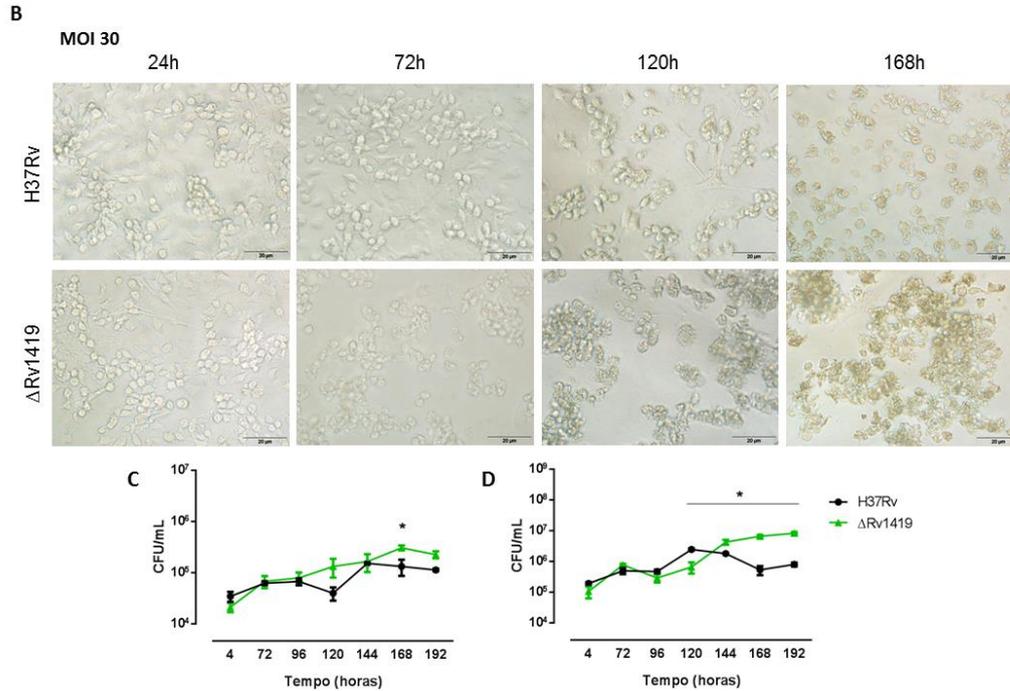


Figura 13 (cont.) – Fotos representativas da morfologia celular após infecção com MOI 30 (B), a barra corresponde a 20 μ m. O crescimento em CFU a longo prazo por H37Rv e Δ Rv1419 com MOI de 3 (C) e MOI de 30 (D) é representativo de um experimento. Os dados estão expressos como a média \pm erro padrão da média de triplicatas; *diferença estatística significativa ($P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak) entre as duas bactérias utilizadas.

Desta forma, a morte celular observada parece acontecer em decorrência da maior taxa de crescimento de *Mtb* na ausência do gene Rv1419. Considerando que a proliferação excessiva de patógenos não é vantajosa para sua sobrevivência, pois pode acarretar na morte das suas células hospedeiras (KIRCHNER E ROY, 2002), a sMTL-13 poderia então atuar na restrição da proliferação de *Mtb* no contexto de infecção de fagócitos. Até o presente momento não há genes descritos em *Mtb* envolvidos com a restrição do crescimento intracelular bacteriano. Neste contexto, nós especulamos que sMTL-13 possa desempenhar um papel importante para que a infecção evolua para uma forma latente.

4.7 AVALIAÇÃO DA MORTE CELULAR EM DECORRÊNCIA DA INFECÇÃO POR Δ Rv1419

Para identificar qual via de morte celular estava sendo ativada em decorrência da infecção com a cepa mutante, duas vias foram testadas: a via apoptótica, através da presença de caspase-3 ativa, e a via necrótica, através da dosagem de LDH presente no sobrenadante de culturas infectadas.

Os mecanismos regulatórios de apoptose são altamente complexos e sofisticados. Até o momento, duas principais vias apoptóticas foram descritas, a via extrínseca e a intrínseca. Ambas estão ligadas, uma vez que moléculas de uma via pode influenciar a outra. Embora o sinal inicial que desencadeia a morte celular possa ser diferente e proveniente de diferentes vias, ambas convergem para a via de execução. A caspase-3 é uma importante caspase efetora cuja ativação é resultado da sinalização pela via de execução e culmina na fragmentação de DNA, degradação do citoesqueleto e proteínas nucleares, *cross-linking* de proteínas e formação de corpos apoptóticos (ELMORE, 2007). Desta forma, a avaliação de moléculas ativas de caspase-3 é uma estratégia que permite a detecção de apoptose induzida por diferentes vias.

Pode-se observar que 48 horas após a infecção a quantidade de caspase-3 ativa em culturas infectadas com a cepa padrão H37Rv é maior que a detectada durante a incubação com a bactéria Δ Rv1419, embora a sua atividade diminua 72 horas após a infecção (Figura 14A). É possível que um dos motivos que pode contribuir para a não ativação de caspases-3 durante a infecção com a cepa mutante seja o defeito na produção de TNF, uma vez que a sinalização via receptor de TNF (TNFR) é capaz de ativar a procaspase-8 e consequentemente a via

efetora (ELMORE, 2007). Vale ressaltar também que embora a caspase-3 participe de grande parte das vias de morte por apoptose, já foram descritos mecanismos independentes desta molécula. Desta forma, a sua não ativação não descarta completamente a ausência deste tipo de morte celular.

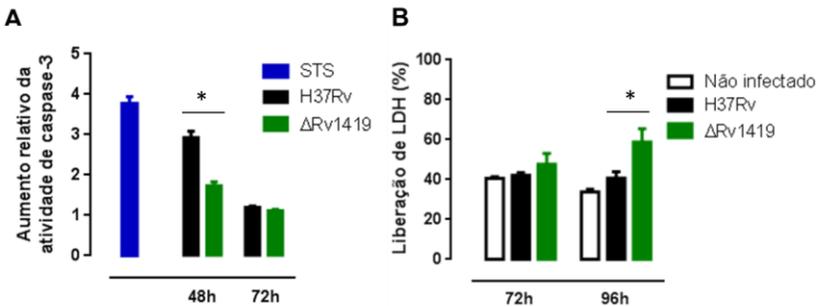


Figura 14- Morte celular em culturas infectadas por H37Rv e Δ Rv1419. BMMs (2×10^5) foram infectadas com MOI 10 e outro grupo foi tratado com staurosporina $1 \mu\text{M}$ (STS) para avaliação do aumento da atividade de caspase-3 (A). A partir de culturas de BMMs (2×10^5) infectadas com o mesmo MOI foi realizada a dosagem de liberação de LDH (B). Os dados estão expressos como a média + erro padrão da média de triplicatas; *diferença estatística significativa ($P < 0,05$; ANOVA de duas vias seguido de teste de Sidak) entre as duas bactérias. Figura representativa de um experimento.

Outro parâmetro avaliado foi a liberação de LDH no sobrenadante das culturas infectadas, uma vez que a sua presença no meio extracelular é um indicativo de morte celular decorrente da lise das células, como necrose, piroptose ou necroptose. Embora não seja observada nenhuma alteração na liberação de LDH na infecção de culturas com MOI 1, durante a infecção por Δ Rv1419 com MOI 10 há uma maior liberação desta enzima no sobrenadante em relação à infecção com a cepa selvagem (Figura 14B).

Estes resultados em conjunto sugerem que o principal tipo de morte em decorrência da infecção com a bactéria mutante é via lise celular, provavelmente por necrose. Isto pode ser explicado pelo perfil de crescimento intracelular observado da Δ Rv1419, uma vez que a proliferação exacerbada de patógenos intracelulares pode levar a lise das células do hospedeiro.

4.8 REGULAÇÃO DA MORTE CELULAR EM CULTURAS TRATADAS COM sMTL-13 RECOMBINANTE

Assim como outros patógenos que inibem apoptose em macrófagos incluindo *Legionella pneumophila*, *Coxiella burnetii*, *Brucella* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus* spp., *Mtb* também pode atuar na regulação do destino celular. Embora alguns fatores microbianos e alvos no hospedeiro já foram descritos, ainda não foi demonstrado claramente que a inibição de apoptose faz parte de um mecanismo de evasão do bacilo (BEHAR, DIVANGAHI E REMOLD, 2010). O conceito de que cepas virulentas de *Mtb* inibem ativamente a indução de apoptose em macrófagos (CHEN, GAN E REMOLD, 2006) é apoiado pela identificação de mutantes que induzem apoptose em vez de necrose (KEANE, REMOLD E KORNFELD, 2000). Desta forma, a inibição de apoptose pode representar uma vantagem evolutiva para *Mtb*, pois promove sua sobrevivência e também o desvio para necrose facilitando a disseminação dos bacilos.

4.8.1 Produção da proteína recombinante

Com o objetivo de testar atividade isolada da sMTL-13 na regulação da morte celular, tornou-se necessária a expressão heteróloga desta proteína. Para o estudo de proteínas produzidas por *Mtb* é necessário a utilização de proteínas recombinantes, uma vez que o cultivo da bactéria é lento e o volume de cultura bacteriana necessário para coleta de proteínas é grande. Adiciona-se a isso a necessidade da realização de todos os procedimentos com nível de biossegurança 3, o que torna o processo mais dispendioso.

Atualmente, um dos sistemas de expressão heteróloga mais utilizado é utilizando a *E. coli* como hospedeira, já que se trata de uma bactéria cuja genética é amplamente conhecida e com grande disponibilidade de ferramentas moleculares, além de ser de fácil cultivo. Baseando-se na metodologia descrita previamente para a expressão da proteína (PATRA *et al.*, 2010; SOUZA, 2012) foi utilizada a *E. coli* Arctic Express transformada com o vetor pET21a, que transfere a cauda de histidina da proteína da porção N-terminal para a C-terminal.

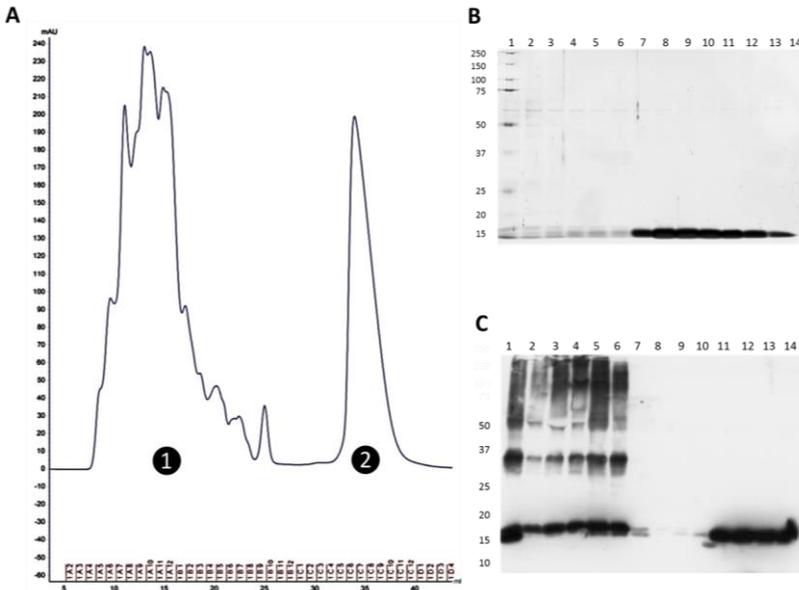


Figura 15 – Purificação por FPLC de sMTL-13 recombinante expressa em *E. coli* Arctic Express. As frações do cromatograma referente à purificação por exclusão de tamanho (A) foram testadas para a presença de sMTL-13. A pureza da amostra foi observada em gel corado por prata (B) com as frações correspondentes ao pico “2”. A confirmação da presença de sMTL-13 no pico testado foi feita por *western blotting* (C), onde as canaletas 1-10 correspondem às frações do início da eluição, representadas por “1” no cromatograma. As canaletas 11-14 são referentes ao pico “2”.

Após a última etapa de purificação por exclusão de tamanho em FPLC, foi obtido o cromatograma observado na Figura 15A. Frações representativas dos picos foram testadas para presença da sMTL-13 por *western blotting*, e a presença de contaminantes, por coloração com prata. Analisando o gel corado, foi possível observar que a proteína estava presente nas frações que correspondem ao pico destacado com uma seta vermelha e que não havia contaminantes na amostra (Figura 15B). A presença de sMTL-13 foi confirmada por *western blotting* com anticorpo monoclonal anti-sMTL-13 (Figura 15C).

As amostras positivas para a presença de sMTL-13 foram concentradas em centricon de 3kDa para então proceder com a remoção de endotoxinas presentes na amostra devido à expressão da proteína em

E. coli. A determinação da presença de LPS na amostra é de grande importância, uma vez que pode levar ao estímulo das células tratadas com a proteína recombinante. Desta forma, a resposta observada após o tratamento pode ser decorrente da presença de endotoxinas e não diretamente pela atividade da proteína.

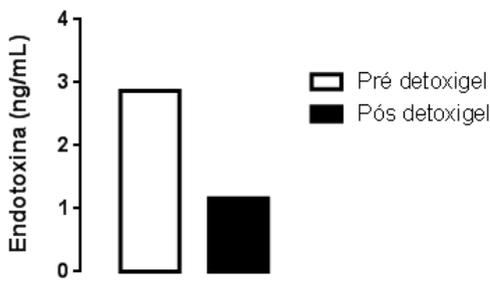


Figura 16 – Quantificação da concentração de LPS após a limpeza da proteína recombinante em coluna Detoxigel. Após o uso da coluna de remoção de endotoxina, a amostra foi concentrada em centricon de 3kDa e então foi feita a quantificação deste contaminante através do método de LAL.

A quantificação de LPS na amostra de proteína foi realizada antes da passagem pela coluna e após a limpeza. Podemos observar na Figura 16 que o processo levou à remoção de aproximadamente 70% de endotoxinas, resultando em uma concentração final de 1ng/mL. Considerando que para o tratamento de células, a concentração de uso da proteína levará ao tratamento de macrófagos com 0,01 ng/mL de contaminante, pode-se descartar sua influência na resposta à sMTL-13. Assim sendo, a produção de sMTL-13 recombinante resultou em uma amostra adequada para uso experimental.

4.8.2 Avaliação de morte celular

Após a obtenção da proteína purificada procedeu-se com o experimento para o estímulo com sMTL-13 de macrófagos pré-tratados com os inibidores zVAD e Nec-1. Embora o tratamento direto com a proteína recombinante não induza a liberação de LDH em macrófagos, quando as células foram pré-tratadas com zVAD, um inibidor de pancaspase, a porcentagem de liberação de LDH aumentou em aproximadamente três vezes. Este aumento de liberação parece ser

dependente RIPK1, uma vez que o pré-tratamento com Nec-1, associado ao zVAD e à proteína, impedem a liberação de LDH (Figura 17).

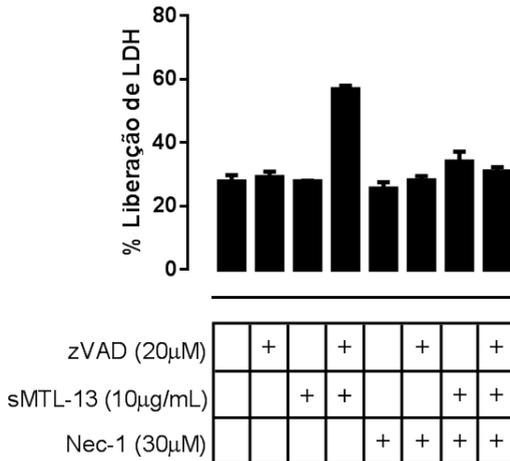


Figura 17 – Indução de morte celular via necroptose com sMTL-13 recombinante. BMMs (2×10^5) foram tratadas com os inibidores zVAD e Nec-1 nas concentrações de $20 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{M}$, respectivamente. Uma hora após os estímulo, as células foram expostas à sMTL-13 na concentração de $10 \mu\text{g/mL}$ e mantidas por 12 horas na incubadora antes da dosagem de LDH. Figura representativa de dois experimentos.

Levando em consideração que a proteína foi adicionada ao meio para o tratamento das células, é mais provável que a atividade observada seja devido à interação entre sMTL-13 com moléculas presentes na superfície de macrófagos. A possível atuação da sMTL-13 após internalização neste modelo não é descartada, no entanto, para determinar a localização sub-celular da proteína, seria necessário realizar a entrega direta da proteína ao meio citosólico dos macrófagos.

A morte necrótica regulada, chamada necroptose, é um tipo de morte celular regulada negativamente por caspase-8 e dependente da atividade do complexo RIPK1-RIPK3. Este tipo de morte celular, capaz de ser inibida com Nec-1, leva à permeabilização rápida da membrana plasmática e à liberação do conteúdo celular. No entanto, não existem marcadores bioquímicos específicos para este tipo de morte. A morte necroptótica é confirmada pela ruptura da membrana plasmática e

ausência de marcadores específicos para apoptose, como ativação de caspases e condensação de cromatina (KACZMAREK, VANDENABEELE E KRYSKO, 2013).

Sinais de processo necrótico programado como piroptose e necroptose são observados durante a infecção por *Mtb* (KAUFMANN E DORHOI, 2013). Recentemente, a relevância de necroptose induzida via IFN tipo I na inflamação e resolução de doenças infecciosas foi descrita para *Salmonella* sp., outro patógeno intracelular (ROBINSON *et al.*, 2012). Dentro do macrófago, ao *Mtb* está associada a inibição de caspase-8 (DIVANGAHI, BEHAR E REMOLD, 2013), assim como a indução da liberação de TNF e formação de espécies reativas de oxigênio. Estas condições favorecem a necroptose (KACZMAREK, VANDENABEELE E KRYSKO, 2013; MORIWAKI E CHAN, 2013) e aumentam o interesse na relevância da necroptose para a morte celular durante a TB.

Assim sendo, estes resultados em conjunto com dados da literatura sugerem que durante a infecção por *Mtb* a ativação de caspases estaria inibida e assim a sMTL-13 associada ao bacilo, ou secretada, poderia sinalizar para via de morte celular necroptótica de forma dependente de RIPK1. Como consequência da ativação desta via, ocorreria perda da integridade celular seguida pela liberação de LDH para o meio extracelular.

Como resultado da coevolução entre o patógeno e hospedeiro, datando de ao menos 50.000 anos (RUSSELL, 2013), o *Mtb* apresenta atualmente diversos mecanismos para intervenção da resposta imune do hospedeiro de forma a garantir sua sobrevivência. Assim sendo, a patogenicidade do bacilo está relacionada ao modo como a resposta imune frente à infecção pode ser manipulada através da indução de diferentes fatores intrínsecos e extrínsecos, que podem contribuir para o desenvolvimento da patogênese. Tendo em vista que a patogenicidade da bactéria é dependente dos seus fatores de virulência, que podem estar na parede celular ou ainda serem secretados por patógenos, as lectinas são alvos interessantes de estudo, principalmente por apresentarem efeitos imunomodulatórios.

Este estudo mostra a importância da lectina sMTL-13 no estabelecimento da infecção por *Mtb* em células fagocíticas, uma vez que na sua ausência o bacilo apresenta defeito na capacidade de adesão à superfície de macrófagos, assim como proliferação exacerbada, o que possivelmente ocasiona a morte das células infectadas. Além disto, os resultados apresentados neste trabalho, resumidos na Figura 18,

sustentam a capacidade de reconhecimento desta proteína e possível interação com receptores na superfície de macrófagos que podem levar à produção de TNF e ativação da via necroptótica. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar o mecanismo molecular de atuação desta proteína, é possível que sua atuação seja decorrente da sinalização através de um único receptor.

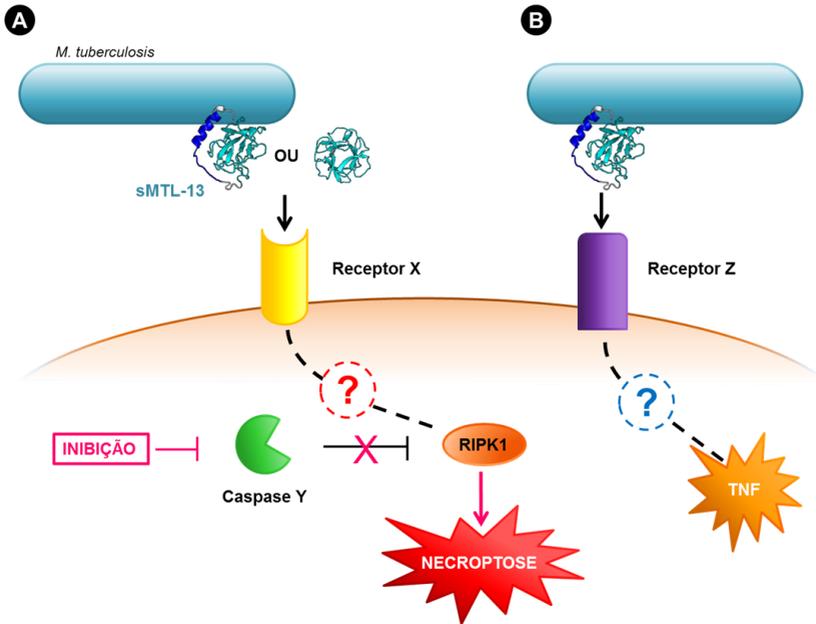


Figura 18 – Esquema ilustrativo das possíveis vias de atuação da lectina sMTL-13. sMTL-13 pode levar à morte celular via necroptose através da interação com um receptor não identificado em células cuja atividade de caspases foi inibida (A). Por outro lado, esta lectina promove a adesão do bacilo ao macrófago e parece ser reconhecida por algum receptor de membrana cuja ligação leva ativação celular e produção de TNF (B).

5 CONCLUSÕES

- I. A sMTL-13 participa na interação inicial patógeno-hospedeiro, promovendo a aderência do bacilo na superfície de macrófagos;
- II. Há um desequilíbrio no crescimento micobacteriano e no destino celular de macrófagos expostos à $\Delta Rv1419$, sugerindo que a sMTL-13 está envolvida no controle de vias de morte celular

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, A. M. et al. Type VII secretion--mycobacteria show the way. **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 883-91, Nov 2007. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1773> >.

AL, S. et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. **Infect Immun**, v. 63, n. 5, p. 1710-7, May 1995. ISSN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ALCAIS, A. et al. Life-threatening infectious diseases of childhood: single-gene inborn errors of immunity? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1214, p. 18-33, Dec 2010. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05834.x> >.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Response of cultured macrophages to mycobacterium tuberculosis, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **J Exp Med**, v. 134, n. 3, p. 713-40, Sep 1 1971. ISSN 0022-1007 (Print)1540-9538 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BAFICA, A. et al. Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest**, v. 115, n. 6, p. 1601-6, Jun 2005. ISSN 0021-9738 (Print)0021-9738. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci23949> >.

BARRY, C. E., 3RD. Interpreting cell wall 'virulence factors' of Mycobacterium tuberculosis. **Trends Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 237-41, May 2001. ISSN 0966-842X (Print)0966-842x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BARRY, C. E., 3RD et al. Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog Lipid Res**, v. 37, n. 2-3, p. 143-79, Jul-

Aug 1998. ISSN 0163-7827 (Print)0163-7827. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

BARRY, C. E. et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 12, p. 845-855, 2009-10-26 2009. ISSN 1740-1526. Disponível em: <
<http://www.nature.com/nrmicro/journal/v7/n12/full/nrmicro2236.html>
>.

BEHAR, S. M.; DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by Mycobacterium tuberculosis: is death an exit strategy? **Nat Rev Microbiol**, v. 8, n. 9, p. 668-74, Sep 2010. ISSN 1740-1526. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2387>>.

BEHAR, S. M. et al. Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 279-87, May 2011. ISSN 1933-0219. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/mi.2011.3>>.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J Exp Med**, v. 174, n. 6, p. 1549-55, Dec 1 1991. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

BOTHA, T.; RYFFEL, B. Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice. **J Immunol**, v. 171, n. 6, p. 3110-8, Sep 15 2003. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

BRASIL. Programa nacional de controle da tuberculose PNCT.
Brasília: DIVE 2009.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 83, n. 1-3, p. 91-

7, 2003. ISSN 1472-9792 (Print)1472-9792. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRENNAN, P. J.; NIKAIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu Rev Biochem**, v. 64, p. 29-63, 1995. ISSN 0066-4154 (Print)0066-4154. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000333> >.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732-6, Jul 30 1999. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

BRIKEN, V. Mycobacterium tuberculosis genes involved in regulation of host cell death. **Adv Exp Med Biol**, v. 783, p. 93-102, 2013. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_5 >.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, Mar 19 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.052548299> >.

CAMBAU, E.; DRANCOURT, M. Steps towards the discovery of Mycobacterium tuberculosis by Robert Koch, 1882. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 3, p. 196-201, Mar 2014. ISSN 1198-743x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12555> >.

CHATTERJEE, D.; KHOO, K. H. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**, v. 8, n. 2, p. 113-20, Feb 1998. ISSN 0959-6658 (Print)0959-6658. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

CHEN, M. et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death. **J Exp Med**, v. 205, n. 12, p. 2791-801, Nov 24 2008. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20080767> >.

CHEN, M.; GAN, H.; REMOLD, H. G. A mechanism of virulence: virulent *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophages leading to necrosis. **J Immunol**, v. 176, n. 6, p. 3707-16, Mar 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COOK, G. M. et al. Physiology of mycobacteria. **Adv Microb Physiol**, v. 55, p. 81-182, 318-9, 2009. ISSN 0065-2911 (Print)0065-2911. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2911\(09\)05502-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0065-2911(09)05502-7) >.

COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 393-422, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132703> >.

COOPER, A. M. et al. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 186, n. 1, p. 39-45, Jul 7 1997. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, v. 4, n. 3, p. 252-60, May 2011. ISSN 1933-0219. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2011.13> >.

COURT, N. et al. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term

control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, v. 184, n. 12, p. 7057-70, Jun 15 2010. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000164> >.

CUMMINGS, R. D.; ETZLER, M. E. R-type Lectins. 2009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> >.

CUMMINS, C. S.; HARRIS, H. Studies on the cell-wall composition and taxonomy of Actinomycetales and related groups. **J Gen Microbiol**, v. 18, n. 1, p. 173-89, Feb 1958. ISSN 0022-1287 (Print)0022-1287. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DE SOUZA, G. A. et al. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. **J Proteomics**, v. 75, n. 2, p. 502-10, Dec 21 2011. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2011.08.016> >.

DIVANGAHI, M.; BEHAR, S. M.; REMOLD, H. Dying to live: how the death modality of the infected macrophage affects immunity to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 783, p. 103-20, 2013. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: < http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_6 >.

DIVANGAHI, M. et al. Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Nat Immunol**, v. 11, n. 8, p. 751-8, Aug 2010. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1904> >.

_____. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 7157-65, Nov 15 2008. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

DORHOI, A.; REECE, S. T.; KAUFMANN, S. H. For better or for worse: the immune response against *Mycobacterium tuberculosis* balances pathology and protection. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p. 235-51, Mar 2011. ISSN 0105-2896. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00994.x> >.

DYE, C. Global epidemiology of tuberculosis. **Lancet**, v. 367, n. 9514, p. 938-40, Mar 18 2006. ISSN 0140-6736. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(06\)68384-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(06)68384-0) >.

EGEN, J. G. et al. Intravital Imaging Reveals Limited Antigen Presentation and T Cell Effector Function in Mycobacterial Granulomas. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 807-19, May 27 2011. ISSN 1074-7613 (Print)1097-4180 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.022> >.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. 2007-06-01 2007. Disponível em: < <http://tpx.sagepub.com/content/35/4/495.long> >.

ERNST, J. D. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. 1998-04-01 1998. Disponível em: < <http://iai.asm.org/content/66/4/1277.full> >.

FABRI, M. et al. Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 104, p. 104ra102, Oct 12 2011. ISSN 1946-6234. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3003045> >.

FENG, C. G. et al. Increase in Gamma Interferon-Secreting CD8+, as Well as CD4+, T Cells in Lungs following Aerosol Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, v. 67, n. 7, p. 3242-7, Jul 1999. ISSN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

FENNELLY, K. P. et al. Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 186, n. 5, p. 450-7, Sep 1 2012. ISSN 1073-449x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201203-0444OC> >.

FLYNN, J. L. et al. An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Exp Med**, v. 178, n. 6, p. 2249-54, Dec 1 1993. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

_____. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice. **Immunity**, v. 2, n. 6, p. 561-72, Jun 1995. ISSN 1074-7613 (Print)1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GATFIELD, J.; PIETERS, J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. **Science**, v. 288, n. 5471, p. 1647-50, Jun 2 2000. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

GOSWAMI, S. et al. Mycotin: a lectin involved in the adherence of Mycobacteria to macrophages. **FEBS Lett**, v. 355, n. 2, p. 183-6, Nov 28 1994. ISSN 0014-5793 (Print)0014-5793. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

HAZES, B. The (QxW)₃ domain: a flexible lectin scaffold. **Protein Sci**, v. 5, n. 8, p. 1490-501, Aug 1996. ISSN 0961-8368 (Print)0961-8368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560050805> >.

HERBST, S. et al. Interferon Gamma Activated Macrophages Kill Mycobacteria by Nitric Oxide Induced Apoptosis. **PLOS ONE**, v. 6, n. 5, 2011/5/2 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0019105.pdf> >.

ISHIBASHI, Y. et al. Roles of the complement receptor type 1 (CR1) and type 3 (CR3) on phagocytosis and subsequent phagosomal lysosome fusion in *Salmonella* infected murine macrophages. **FEMS Microbiology Letters**, v. 64, n. 2, p. 89-96, 1990. ISSN 1574-6968. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1574-6968.1990.tb03505.x/abstract> >.

JACOBSON, R. L.; DOYLE, R. J. Lectin-parasite interactions. **Parasitol Today**, v. 12, n. 2, p. 55-61, Feb 1996. ISSN 0169-4758 (Print)0169-4758. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 209-23, Feb 21 2013. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003> >.

KAUFMANN, S. H. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nat Rev Immunol**, v. 1, n. 1, p. 20-30, Oct 2001. ISSN 1474-1733 (Print)1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35095558> >.

KAUFMANN, S. H.; DORHOI, A. Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions. **Curr Opin Immunol**, v. 25, n. 4, p. 441-9, Aug 2013. ISSN 0952-7915. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.05.005> >.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages. 2000-02-15 2000. Disponível em: < <http://www.jimmunol.org/content/164/4/2016.long> >.

KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nat Protoc**, v. 4, n. 3, p. 363-71, 2009. ISSN 1750-2799. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.2>>.

KELLY, D. M. et al. Bystander macrophage apoptosis after Mycobacterium tuberculosis H37Ra infection. **Infect Immun**, v. 76, n. 1, p. 351-60, Jan 2008. ISSN 0019-9567. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1128/iai.00614-07>>.

KIRCHNER, J. W.; ROY, B. A. **Evolutionary implications of host-pathogen specificity: fitness consequences of pathogen virulence traits** Evolutionary Ecology Research. 4: 27–48 p. 2002.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, p. 405310, 2011. ISSN 1740-2522. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1155/2011/405310>>.

LAUNOIS, P. et al. T Cell Reactivity against Mycolyl Transferase Antigen 85 of M. tuberculosis in HIV-TB Coinfected Subjects and in AIDS Patients Suffering from Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, 2011. ISSN 1740-2522 (Print)1740-2530 (Electronic). Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1155/2011/640309>>.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. 2001-07-15 2001. Disponível em: <
<http://genesdev.cshlp.org/content/15/14/1725.long>>.

LEO, J. C.; SKURNIK, M. Adhesins of human pathogens from the genus Yersinia. **Adv Exp Med Biol**, v. 715, p. 1-15, 2011. ISSN 0065-2598 (Print)0065-2598. Disponível em: <
http://dx.doi.org/10.1007/978-94-007-0940-9_1>.

LOWE, D. M. et al. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? **Trends Immunol**, v. 33, n. 1, p. 14-25, Jan 2012. ISSN 1471-4906. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2011.10.003> >.

MALEN, H. et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Proteomics**, v. 7, n. 10, p. 1702-18, May 2007. ISSN 1615-9853 (Print)1615-9853. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600853> >.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M.-A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 1, p. 67-85, January 16 2014 2014. ISSN 1074-5521. Disponível em: < [http://www.cell.com/chemistry-biology/abstract/S1074-5521\(13\)00420-1](http://www.cell.com/chemistry-biology/abstract/S1074-5521(13)00420-1) >.

MCSHANE, H. et al. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. In: (Ed.). **Tuberculosis (Edinb)**. Scotland, v.92, 2012. p.283-8. ISBN 1873-281X (Electronic)1472-9792 (Linking).

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997-07-24 1997. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.nature.com/nature/journal/v388/n6640/abs/388394a0.html> >.

MENOZZI, F. D. et al. Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria. **J Exp Med**, v. 184, n. 3, p. 993-1001, Sep 1 1996. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

MOHAN, V. P. et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for

limiting pathology. **Infect Immun**, v. 69, n. 3, p. 1847-55, Mar 2001. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.69.3.1847-1855.2001> >.

MORIWAKI, K.; CHAN, F. K. Necrosis-dependent and independent signaling of the RIP kinases in inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev**, Dec 25 2013. ISSN 1359-6101. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.12.013> >.

NGUYEN, L.; PIETERS, J. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 427-53, 2009. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-061008-103123> >.

NIEDERWEIS, M. et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. **Trends Microbiol**, v. 18, n. 3, p. 109-16, Mar 2010. ISSN 0966-842x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.005> >.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-8, Apr 15 1994. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

NOGUEIRA, L. **Investigação do papel da proteína codificada pelo gene Rv1419 de Mycobacterium tuberculosis durante a infecção: potencial diagnóstico e propriedades imunoregulatórias**. 2012. (PhD). Universidade Federal de Santa Catarina

NOGUEIRA, L. et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. **Eur J Immunol**, v. 40, n. 3, p. 744-53, Mar 2010. ISSN 0014-2980. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939747> >.

O'GARRA, A. et al. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 475-527, 2013. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095939> >.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. **Biochemistry**, v. 12, n. 16, p. 3121-6, Jul 31 1973. ISSN 0006-2960 (Print)0006-2960. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

ORME, I. M. et al. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol**, v. 151, n. 1, p. 518-25, Jul 1 1993. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PARISH, T.; STOKER, N. G. Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked Mycobacterium tuberculosis tlyA plcABC mutant by gene replacement. **Microbiology**, v. 146 (Pt 8), p. 1969-75, Aug 2000. ISSN 1350-0872 (Print)1350-0872. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

PATRA, D. et al. Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray studies of a secreted lectin (Rv1419) from Mycobacterium tuberculosis. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 66, n. Pt 12, p. 1662-5, Dec 1 2010. ISSN 1744-3091. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1107/s1744309110042892> >.

PETHE, K. et al. The heparin-binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination. **Nature**, v. 412, n. 6843, p. 190-4, Jul 12 2001. ISSN 0028-0836 (Print)0028-0836. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/35084083> >.

PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P. Bacterial adhesion and entry into host cells. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 715-27, Feb 24 2006. ISSN 0092-8674

(Print)0092-8674. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.012>>.

PUJARI, R. et al. Rhizoctonia bataticola lectin (RBL) induces caspase-8-mediated apoptosis in human T-cell leukemia cell lines but not in normal CD3 and CD34 positive cells. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e79311, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0079311>>.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev Sci Tech**, v. 20, n. 1, p. 21-54, Apr 2001. ISSN 0253-1933 (Print)0253-1933. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

REDFORD, P. S.; MURRAY, P. J.; O'GARRA, A. The role of IL-10 in immune regulation during M. tuberculosis infection. **Mucosal Immunology**, v. 4, n. 3, p. 261-270, 2011-03-30 2011. ISSN 1933-0219. Disponível em: <
<http://www.nature.com/mi/journal/v4/n3/full/mi20117a.html>>.

ROBINSON, N. et al. Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Nat Immunol**, v. 13, n. 10, p. 954-62, Oct 2012. ISSN 1529-2908. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/ni.2397>>.

ROTHFUCHS, A. G. et al. Dectin-1 interaction with Mycobacterium tuberculosis leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. **J Immunol**, v. 179, n. 6, p. 3463-71, Sep 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/>>.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 1, p. 39-47, Jan 2007. ISSN 1740-1526. Disponível em: <
<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1538>>.

_____. The evolutionary pressures that have molded *Mycobacterium tuberculosis* into an infectious adjuvant. **Curr Opin Microbiol**, v. 16, n. 1, p. 78-84, Feb 2013. ISSN 1369-5274. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2012.11.007> >.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 943-8, Sep 2009. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1781> >.

_____. *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. **Cell Host Microbe**, v. 8, n. 1, p. 68-76, Jul 22 2010. ISSN 1931-3128. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2010.06.002> >.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 170-81, Mar 2010. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nri2711> >.

SCANGA, C. A. et al. MyD88-Deficient Mice Display a Profound Loss in Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Associated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. **Infect Immun**, v. 72, n. 4, p. 2400-4, Apr 2004. ISSN 0019-9567 (Print)1098-5522 (Electronic). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/iai.72.4.2400-2404.2004> >.

_____. Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. **J Exp Med**, v. 192, n. 3, p. 347-58, Aug 7 2000. ISSN 0022-1007 (Print)0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SCHAFER, G. et al. Non-opsonic recognition of *Mycobacterium tuberculosis* by phagocytes. **J Innate Immun**, v. 1, n. 3, p. 231-43, 2009. ISSN 1662-811x. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1159/000173703> >.

SINAN. **Tuberculose: Casos notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação**. Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2011.

SINHA, S. et al. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. **Microbiology**, v. 151, n. Pt 7, p. 2411-9, Jul 2005. ISSN 1350-0872 (Print)1350-0872. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.27799-0> >.

SIQUEIRA, H. R. et al. O tratamento atual da tuberculose (para adolescentes e adultos) comentado. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 6, p. 61-71, 2010. Disponível em: < http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=162 >.

SKJOT, R. L. et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. **Infect Immun**, v. 68, n. 1, p. 214-20, Jan 2000. ISSN 0019-9567 (Print)0019-9567. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

SOLOVIC, I. et al. The risk of tuberculosis related to tumour necrosis factor antagonist therapies: a TBNET consensus statement. **Eur Respir J**, v. 36, n. 5, p. 1185-206, Nov 2010. ISSN 0903-1936. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1183/09031936.00028510> >.

SOUZA, N. M. D. **Avaliação da Imunogenicidade da sMTL-13, uma lectina secretada de *Mycobacterium tuberculosis***. . 2012. Universidade Federal de Santa Catarina

STOKES, R. W. et al. Mycobacteria-macrophage interactions. Macrophage phenotype determines the nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to murine macrophages. **J Immunol**, v. 151, n. 12, p. 7067-76, Dec 15 1993. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

STURGILL-KOSZYCKI, S. et al. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-81, Feb 4 1994. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TANNE, A. et al. A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, v. 206, n. 10, p. 2205-20, Sep 28 2009. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20090188> >.

TATSUTA, T. et al. Sialic acid-binding lectin (Ic3ye) induces caspase-dependent apoptosis-mediated mitochondrial perturbation in Jurkat cells. **Int J Oncol**, v. 43, n. 5, p. 1402-12, Nov 2013. ISSN 1019-6439. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2013.2092> >.

TIAN, T. et al. In vivo depletion of CD11c+ cells delays the CD4+ T cell response to Mycobacterium tuberculosis and exacerbates the outcome of infection. **J Immunol**, v. 175, n. 5, p. 3268-72, Sep 1 2005. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

TSAI, M. C. et al. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiol**, v. 8, n. 2, p. 218-32, Feb 2006. ISSN 1462-5814 (Print)1462-5814. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2005.00612.x> >.

TUTEJA, R. Type I signal peptidase: an overview. **Arch Biochem Biophys**, v. 441, n. 2, p. 107-111, Sep 15 2005. ISSN 0003-9861 (Print)0003-9861. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2005.07.013> >.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102,

n. 11, p. 4033-8, Mar 15 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.
Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409716102> >.

WASS, M. N.; KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. **Nucleic Acids Res**, v. 38, n. Web Server issue, p. W469-73, Jul 2010. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkq406> >.

WHO. **Global tuberculosis report 2013**. Geneva, Switzerland: WHO Press 2013.

WILKINSON, R. J. et al. Influence of Polymorphism in the Genes for the Interleukin (IL)-1 Receptor Antagonist and IL-1 β on Tuberculosis. 1999-06-21 1999. Disponível em: < <http://jem.rupress.org/content/189/12/1863.long> >.

WOLF, A. J. et al. Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. **J Immunol**, v. 179, n. 4, p. 2509-19, Aug 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print)0022-1767. Disponível em: < <http://dx.doi.org/> >.

YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1255-65, Apr 1 2008. ISSN 0021-9738 (Print). Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1172/jci34614> >.

ZUBER, B. et al. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. **J Bacteriol**, v. 190, n. 16, p. 5672-80, Aug 2008. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1128/jb.01919-07> >.