



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Ana Luiza Abdalla dos Santos

A relação entre Lisossomos e autofagia durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

FLORIANÓPOLIS
2019

Ana Luiza Abdalla dos Santos

Relação entre lisossomos e autofagia durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Dissertação submetido(a) ao Programa de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis

2019

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

Santos, Ana Luiza Abdalla

Relação entre Lisossomos e autofagia durante a infecção
por Mycobacterium tuberculosis / Ana Luiza Abdalla Santos
; orientador, André Báfica, 2019.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Tuberculose. 3. Imunologia. 4.
Relação parasito - hospedeiro. I. Báfica, André . II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Ana Luiza Abdalla dos Santos

A relação entre lisossomos e autofagia durante a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. André Báfica, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.a Karina Ramalho Bortoluci, Dr(a).

Universidade Federal de São Paulo

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr. André Báfica
Orientador(a)

Florianópolis, 18 de setembro de 2019.

Este trabalho é dedicado às três mulheres que me criaram,
minha mãe, Tia Bidu e Tia Ana.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Todos que, direta ou indiretamente, ajudaram-me a concluir este trabalho.

Ao professor André Báfica, que me orientou, nesses dois anos de mestrado, a minha gratidão por todos os ensinamentos, por ter dividido a empolgação pela ciência, por ter me estimulado a sempre dar o melhor de mim e sempre aguçar o meu senso crítico. Obrigada pelas discussões científicas enriquecedoras e pelo apoio.

Aos professores Daniel Mansur, José Henrique M. Oliveira e Fernando Spiller pelas discussões científicas e sugestões de experimentos.

Ao Lucas Mascarin, que foi meu mentor nesses dois anos e me ensinou tudo que eu sei, muito obrigada por ter me ajudado em todos os experimentos dessa dissertação e pelas discussões dos resultados que pareciam eternas. Também agradeço pela amizade e pelo apoio nesses dois anos, foram imprescindíveis.

À Lucilene W. Granella que, além de colega de apartamento, se tornou uma irmã, agradeço pela ajuda nos experimentos, pela discussão dos resultados e mais ainda por todos os colos e conselhos nos momentos que eu mais precisei.

Ao Daniel Mendes pela ajuda nos experimentos, em especial no Western blot e nas abordagens experimentais. Muito obrigada pela paciência e por ter dividido o conhecimento comigo.

Agradeço à equipe da "TB": Daniel, Lucas, Lucilene, Meice Montovani. Um agradecimento especial à Yonne Menezes e Marick Starick por toda ajuda que me deram desde experimentos até a correção da dissertação.

Ao Edgar Koslova e Gabriela Luiz por me ensinarem e ajudarem nas análises de bioinformática. Muito obrigada pela paciência.

Ao Professor Sergio Costa, da UFMG, pela doação da medula óssea dos camundongos deficientes para GBP usados neste trabalho.

A Professora Karina Bortoluci, da Unifesp, que me cedeu reagentes imprescindíveis para realizar este trabalho. E o aluno Marcelo Yudi pela ajuda nos ensaios enzimáticos.

A todos os integrantes do LiDi pelos churrascos, festas juninas, bolos, conversas descontraídas e discussões científicas. Muito obrigada por fazerem os

meus dias mais alegres. Agradecimento especial à Greicy Malaquias por todo apoio técnico e científico e à Taissa por ter doado o tempo para me ajudar no TECAN. Agradeço também a Katiane Roversi, querida amiga e agregada do LiDI. A minha gratidão por todo incentivo e apoio quando eu precisei.

A banca examinadora dessa dissertação, Karina Bortoluci, Alfeu Zanotto, Daniel Mendes e Helena Cimarosti por avaliarem este trabalho.

Aos meus queridos amigos Tayná Eliz, Murilo Marmentini, Denise Damos, João Victor Faraco e Zelita Scolari pela amizade e carinho. Vocês fizeram esse último ano muito mais descontraído. Muito obrigada pelo apoio.

Ao meu amigo Jonatas pelo encorajamento em seguir a carreira acadêmica e pela ajuda na correção deste trabalho.

À pós graduação em farmacologia e aos docentes que contribuíram para minha formação.

Ao Lameb e ao laboratório de protozoologia pela disponibilização de equipamentos.

Às agências de fomento CNPQ e capes pelo financiamento de pesquisa e bolsa.

À minha família por todo apoio e confiança. A minha eterna gratidão aos meus pais Catarina, Paulo e Orlando por tudo que fizeram por mim. Agradeço de coração à minha querida Tia Bidu por todo apoio e incentivo; e a Jordana, minha prima, que sempre me incentivou a ir atrás dos meus sonhos e por ser um modelo pra mim. A minha eterna gratidão e amor.

RESUMO

A autofagia é um processo de degradação e renovação de moléculas importante tanto para a homeostase quanto para contenção de patógenos, sendo chamada de xenofagia. No entanto, patógenos como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) conseguem evadir da xenofagia ao agir em diversas etapas, como impedir a formação da vesícula e, a acidificação do lisossomo, que são etapas importantes para a eliminação do patógeno. Neste trabalho observamos que a bactéria deficiente para a lectina de Mtb sMTL-13 ($\Delta Rv1419$) é capaz de induzir o acúmulo de lisossomos em macrófagos infectados e que essa via estaria conectada com a autofagia, visto que, na ausência de proteínas GBP, importantes na indução da autofagia, não é observado esse acúmulo. Além disso, foi mostrado que sMTL-13 poderia interagir com catepsina B, uma protease presente em lisossomos capaz de regular negativamente a autofagia. Assim, hipotetizamos que a catepsina B interage com sMTL-13 e promove a regulação negativa da autofagia e, conseqüentemente, regula negativamente o acúmulo de lisossomos. Observamos que sMTL-13 não é capaz de modular a autofagia quando avaliamos a conversão de LC3B, mas que poderia regular a nível transcricional. Por outro lado, notamos que, apesar de ser regulada negativamente durante a infecção, a catepsina B aumenta o recrutamento de lisossomos, mas não possui relação com sMTL-13. No entanto, percebemos que a secreção de TNF- α dependente de sMTL-13 é também dependente de catepsina B. Esses dados mostram que sMTL-13 não modula a autofagia, logo a regulação feita sobre o acúmulo de lisossomos é consequência da regulação de outra via. Os dados sugerem, ainda, que o controle sobre a secreção de TNF- α é independente da regulação do acúmulo de lisossomos.

Palavras- chave: Catepsina B, sMTL-13, tuberculose, LC3B, Xenofagia

ABSTRACT

Autophagy is a process of degradation and renewal of molecules important to homeostasis and also for pathogen containment, been called xenophagy. However, pathogens such as Mtb are able to evade xenophagy by acting in several stages like inhibits vesicle formation and lysosome acidification, important steps to pathogen elimination. In these work, we observed that knockout bacteria for an Mtb lectin sMTL-13 (Δ Rv1419) is able to induce lysosome accumulation in infected macrophages and this process would be related to autophagy, since in the absence of GBP proteins, important to autophagy induction, this accumulation is not observed. Besides that, has been shown that sMTL-13 can interact with cathepsin B, a lysosomal protease able to downregulate autophagy. Thereby, we hypothesize that cathepsin B interact with sMTL-13 and promote the negative regulation of autophagy and then downregulate lysosome accumulation. We could observe that sMTL-13 was not able to modulate autophagy when we evaluate LC3B conversion, but it could regulate at the transcriptional level. On the other hand, we could observe that, even though it's downregulated during infection, cathepsin B were able to increase lysosomal recruitment during infection, but It was not related to sMTL-13. However, we observed that the secretion of sMTL-13-dependent TNF- α is also dependent on cathepsin B. These data show that sMTL-3 does not regulate autophagy and thereby the lysosome accumulation is a consequence of the regulation of another pathway. And also, suggests that the control of sMTL-13 under TNF- α secretion is independent of the regulation of lysosome accumulation.

Key- words : Cathepsin B, sMTL-13, tuberculosis, LC3B, Xenophagy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da macroautofagia em eucariotos.

Figura 2 - Representação esquemática da xenofagia em Mtb.

Figura 3 - Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*.

Figura 4 - A regulação negativa do recrutamento de lisossomos pela sMTL-13 está relacionado com a autofagia.

Figura 5 - Catepsina B é regulada negativamente durante a infecção e não depende de sMTL-13.

Figura 6 - Atividade enzimática de Catepsina B.

Figura 7 - Influência de Catepsina B no crescimento intracelular de Mtb.

Figura 8 - Influência de catepsina B na autofagia durante a infecção por Mtb.

Figura 9 - Regulação da autofagia por sMTL-13.

Figura 10 - Expressão gênica de proteínas relacionadas com a autofagia.

Figura 11 - Influência de Catepsina B no recrutamento de lisossomos.

Figura 12 - Influência de Catepsina B na secreção de TNF- α durante a infecção por Mtb.

Figura 13 - Influência de GBP no recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb 2.

Figura 14 - Influência de Catepsina B no recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb 2.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
1.1.	AUTOFAGIA EM EUKARIOTOS	12
1.2.	XENOFAGIA.....	16
1.3.	Mycobacterium tuberculosis	18
1.4.	TUBERCULOSE E RESPOSTA IMUNOLÓGICA.....	21
2.	OBJETIVOS	26
2.1.	OBJETIVOS GERAIS	26
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.	METODOLOGIA	27
3.1.	OBTENÇÃO DE MACRÓFAGO DERIVADO DE MEDULA ÓSSEA (BMM). 27	27
3.2.	OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE L929	27
3.3.	CULTIVO DE MTB H37RV E Δ RV1419	28
3.4.	INFECÇÃO DE BMM POR H37RV E Δ RV1419.....	28
3.2.1.	Preparo de bactérias para infecção	28
3.2.2.	Marcação de Mtb com SYTO 24	29
3.2.3.	Tratamento com Ca074Me	29
3.2.4.	Infecção de macrófagos derivados de medula óssea	29
3.5.	IMUNOFLUORESCÊNCIA	30
3.6.	CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)	31
3.7.	ANÁLISE PROTEICA	31
3.2.5.	Extração de proteína	31
3.2.6.	Dosagem de proteína	32
3.2.7.	Gel de poliacrilamida	32
3.2.8.	Preparo das amostras	32
3.2.9.	Eletroforese	33
3.2.10.	Transferência	33
3.2.11.	Immunoblotting	33

3.2.12. Revelação	34
3.8. DOSAGEM DE CITOCINA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA....	34
3.9. ENSAIO DA ATIVIDADE DE CATEPSINA B.....	35
3.10. EXTRAÇÃO DE RNA E CONFECÇÃO DE cDNA.....	36
3.11. RNAseq.....	36
3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4. RESULTADOS	38
4.1. AS PROTEÍNAS LIGADORAS DE GUANILATO SÃO IMPORTANTES PARA O RECRUTAMENTO DE LAMP-1 DURANTE A INFECÇÃO POR Mtb Δ RV1419 ...	38
39	
4.2. A INFECÇÃO POR MTB REDUZ A ATIVIDADE DE CATEPSINA B EM MACRÓFAGOS.....	39
4.3. A CATEPSINA B NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NA SOBREVIVÊNCIA DE Mtb DURANTE A INFECÇÃO.....	41
4.4. CATEPSINA B NÃO INFLUENCIA NA AUTOFAGIA DURANTE A INFECÇÃO POR Mtb H37RV.....	42
4.5. A SMTL-13 NÃO MODULA AUTOFAGIA.....	43
4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A AUTOFAGIA ...	44
4.7. O RECRUTAMENTO DE LISOSSOMOS É INDEPENDENTE DE CATEPSINA B.....	46
4.8. CATEPSINA B ESTÁ ENVOLVIDA NA LIBERAÇÃO DE TNF- α DURANTE A INFECÇÃO POR Mtb.....	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	56
7. ANEXO	57
8. REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. AUTOFAGIA EM EUKARIOTOS

Na biologia celular, a autofagia é um processo evolutivamente conservado tendo como objetivo a degradação e renovação de moléculas. Além disso engloba outros três processos específicos: microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia. Estes processos envolvem toda uma maquinaria intracelular que se baseia em endereçamento de alvos para degradação no lisossomo. Os alvos deste processo podem variar desde organelas defeituosas até patógenos. Todas essas funções são importantes na manutenção da homeostase, diferenciação e defesa celular (CECCONI; LEVINE, 2009; GUO, BIN *et al.*, 2014; PARZYCH; KLIONSKY, 2013).

Primeiramente, a microautofagia é um processo que ocorre diretamente na membrana do lisossomo e podem ser divididos em cinco etapas. Inicialmente, ocorre a invaginação com formação do tubo autofágico, seguido da formação da vesícula, expansão, cisão e, por fim, degradação. Este processo possui alguns pontos em comum com a macroautofagia, como por exemplo, o envolvimento das proteínas relacionadas à autofagia (ATG, do inglês *autophagy related proteins*), como Atg5-Atg12 e Atg16. Além disso, pode ser regulado pelo alvo da rifamicina (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) de forma que é ativado em uma condição de privação de nutrientes. Ainda, a microautofagia pode ser direcionada a alvos específicos, como os peroxissomos, as mitocôndrias e membranas nucleares. Entre os 3 processos citados anteriormente, esse é o menos estudado(LI; LI; BAO, 2012)(BELLU *et al.*, 2001; CRESPO *et al.*, 2002; DAWALIBY; MAYER, 2010; EPPLE *et al.*, 2001; KIRISAKO *et al.*, 2000; KIŠŠOVA *et al.*, 2007; KLIONSKY *et al.*, 2012; SATTLER; MAYER, 2000; UTTERNWEILER *et al.*, 2007).

Além disso, o processo de autofagia mediada por chaperonas, diferente dos demais, faz o endereçamento de proteínas específicas e solúveis para os lisossomos sem a formação de uma vesícula. Tendo como diferenças o reconhecimento do alvo e a entrega ao lúmen lisossomo, a autofagia é considerada um processo altamente específico pois é mediada por chaperonas, como por exemplo, a proteína de choque térmico 90 (HSP90, do inglês *heat shock protein 90*) e a proteína cognata de choque

térmico 70 (HSC70, do inglês *heat shock cognate protein 70*). As chaperonas possuem como substrato proteínas que são marcadas por um domínio pentapeptídico KFERQ. Uma vez que as proteínas interagem com as chaperonas são desdobradas da conformação terciária e serão translocadas para os lisossomos com ancoramento das chaperonas e interação com a glicoproteína associada à membrana de lisossomos 2A (Lamp2A do inglês, *lysosome-associated membrane glycoprotein 2A*). O alvo das chaperonas pode incluir enzimas glicolíticas, fatores de transcrição e proteínas ligadoras de cálcio (ANIENTO *et al.*, 1993; CUERVO, 2010; CUERVO; DICE, 1996; DICE, 1990, 2007; LIU *et al.*, 2009; SALVADOR *et al.*, 2000).

Já a macroautofagia, por sua vez, é um processo que envolve a formação de uma vesícula de membrana dupla e tem como alvo desde organelas defeituosas até

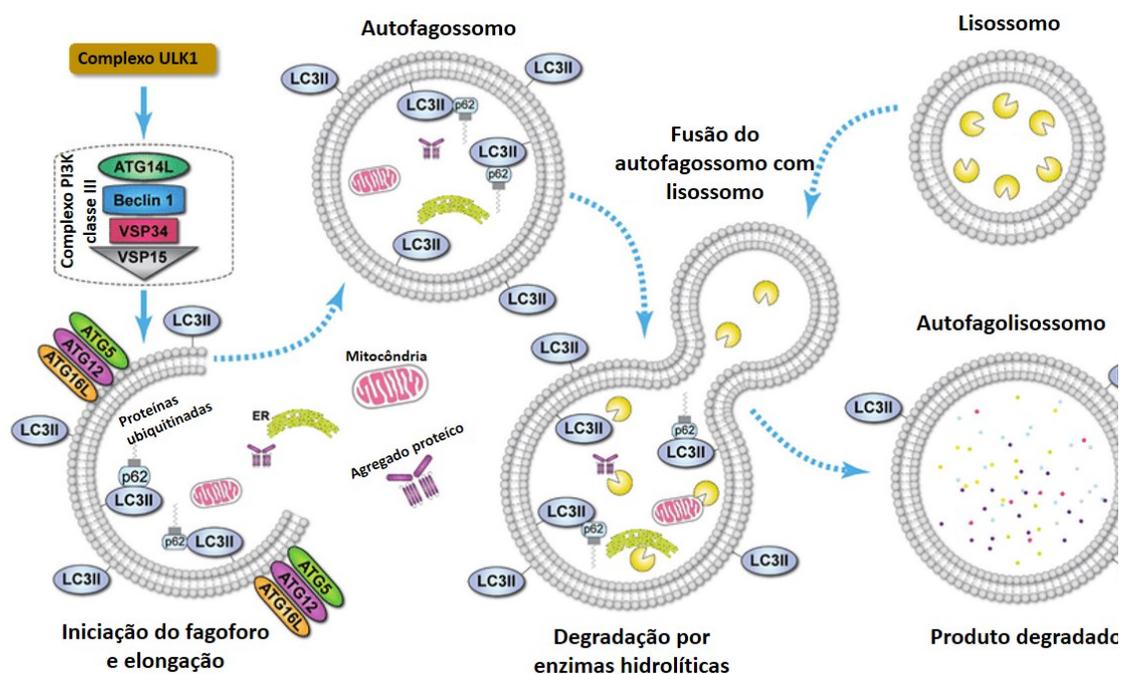


Figura 1 – Representação esquemática da macroautofagia em eucariotos. (Adaptado de Ndoye, et al., 2016)

patógenos. Além disso, este processo pode ser dividido em não seletivo e seletivo. O primeiro ocorre em situações de privação de nutrientes, em que a célula degrada organelas e moléculas triviais para fornecer nutrientes para funções básicas. Já o segundo, envolve o endereçamento de alvos específicos como mitocôndrias,

peroxissomos e patógenos, sendo chamados, respectivamente, de mitofagia, peroxifagia e xenofagia. Como processo, inicia-se com o reconhecimento do alvo, e em seguida, a formação de uma vesícula que pode variar de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. A respeito disso, acredita-se que em eucariotos a vesícula se origina do retículo endoplasmático. Uma vez que a vesícula é formada, será endereçada para o lisossomo para a degradação, como ocorre nos outros processos. Todo esse processo é dividido em etapas que podem ser reguladas, sendo elas: indução, nucleação, alongação, conclusão e fusão (ASHRAFI; SCHWARZ, 2013; DUNN *et al.*, 2005; ITAKURA; MIZUSHIMA, 2010; LEVINE, 2005; PARZYCH; KLIONSKY, 2014; SHINTANI; KLIONSKY, 2004; YORIMITSU; KLIONSKY, 2005).

A indução é iniciada quando uma proteína adaptadora, como sequestoma (ou p62) ou a proteína do ponto nuclear 52 (NDP52, do inglês *nuclear dot protein 52*), que funcionam como receptores autofágicos, identificam cargas ubiquitinadas. Quando isso acontece, é recrutado um complexo formado por Unc-51 semelhante a quinase ativadora de autofagia (ULK1, do inglês *Unc-51 like autophagy activating kinase 1*), Atg13 e a proteína de 200 kDa interactora da FAK (FIP200, do inglês *FAK interacting protein of 200kDa*). Esse complexo existe naturalmente na célula, mas é inibido por um outro complexo, chamado de mTORC1. Em condições fisiológicas mTOR fosforila o primeiro complexo e impede que a autofagia prossiga. No entanto, em situações de privação de nutrientes, mTORC1 é inibido e o complexo sofre desfosforilação e a autofagia progride para nucleação (HOSOKAWA *et al.*, 2009; JUNG *et al.*, 2009; VON MUHLINEN *et al.*, 2010; YU-SHIN SOU, SATOSHI WAGURI, JUN-ICHI IWATA, TAKASHI UENO, TSUTOMU FUJIMURA *et al.*, 2008).

Em seguida, a nucleação se inicia com o recrutamento de Atg14 e fosfatidilinositol-3-Kinase (PI3K) que gera PI3P (fosfatidilinositol-3-fosfato), que por sua vez, recruta outras PI3K, como PI3K3C e PI3K4R, e beclin 1. Esse processo pode ser regulado em algumas etapas, como por exemplo, na ligação de beclin-1, na qual ocorre ligação de uma segunda proteína chamada de proteína do linfoma de célula B (Bcl-2, do inglês *B-cell lymphoma protein 2*), anti-apoptótica, que impede a progressão (BURMAN; KTISTAKIS, 2010; FURUYA *et al.*, 2005; LIANG *et al.*, 1998).

O processo de alongação pode ocorrer por duas vias. A primeira com recrutamento do complexo formado por Atg12, Atg5 e Atg16L1, que é desvinculado quando o autofagossomo é formado. A segunda é o recrutamento da proteína

associada a microtúbulos (LC3, do inglês *microtubule-associated protein 3*). O LC3I é uma pré-proteína dispersa tanto no núcleo quanto no citoplasma e quando há o estímulo para autofagia é clivado por Atg4b, que expõe o sítio para lipidação por fosfatidiletanolamina (PE, do inglês *phosphatidylethanolamine*). Em seguida é recrutadas Atg7, Atg3 e Atg12 que formam o LC3II. A deficiência de Atg4 leva a um acúmulo de pré-autofagossomos não fechados, demonstrando a importância de LC3II para a alongação e fechamento da vesícula. Além disso, está relacionado indiretamente com a maturação do autofagossomo, uma vez que pode interagir com FYCO1, relacionado a migração para região perinuclear.(GENG; KLIONSKY, 2008; KABEYA *et al.*, 2000; MIZUSHIMA *et al.*, 2003; NAKATOGAWA *et al.*, 2012; WEIDBERG *et al.*, 2010)

Por fim, a conclusão e a fusão com os lisossomos é realizada por um processo de ancoramento do autofagossomo no lisossomo através do complexo de SNARE (do inglês *soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors*)) e das proteínas relacionadas a Rab (Rab, do inglês *Ras-related protein*), principalmente à Rab7 e os fatores de amarras (do inglês *tethering factors*).(GUO, WEN JIE *et al.*, 2010; GUTIERREZ, MAXIMILIANO G. *et al.*, 2004; JAGER, 2004; JIANG *et al.*, 2014; KIRISAKO *et al.*, 1999).

As proteínas Rabs, são as responsáveis pelo tráfego entre vesículas e geralmente estão associadas a uma vesícula. Por exemplo, a Rab5 está associado a endossomos e autofagossomos iniciais (ZEIGERER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2017) e a Rab 7, por sua vez, está associada à autofagossomos. A proteína Rab7 é uma das mais descritas no processo de fusão e possui diversos interactores, chamados de efetores que irão facilitar a fusão. A princípio o autofagossomo está disperso no citoplasma e os lisossomos estão na região perinuclear. Então para que ocorra a fusão é necessário que o autofagossomo migre para a região perinuclear. Algumas proteínas relacionadas a migração são as proteínas lisossomais interactoras de Rab (RILP, do inglês *Rab interacting lysosomal protein*), a proteína relacionada a oxisterol 1(ORP1L, do inglês *Oxysterol-binding protein related protein 1*) e dinamin que são proteínas efetoras de Rab7 e fazem esse transporte até a região perinuclear. Adicionando a isso, a Rab7 pode ser regulada por outras proteínas como UVRAG que regula positivamente Rab7 através da interação com VPS16 (GUTIERREZ, M. G.,

2004; JAGER, 2004; JORDENS *et al.*, 2001; PANKIV *et al.*, 2010; SMITH *et al.*, 2008a; WIJDEVEN *et al.*, 2016; ZEIGERER *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2017).

Uma vez que o autofagossomo atinge a região perinuclear, ocorre o processo de ancoramento na membrana do lisossomo que envolve o complexo SNARE e ainda Rab7. O complexo SNARE é composto por mais de 60 proteínas que, de forma geral, regulam a fusão de membranas. Essa ação se deve à interação entre os pares de SNARE entre as vesículas. No caso da fusão do autofagossomo com o lisossomo a sintaxina17 (Stx17), uma SNARE, interage com VAMP8 de lisossomos, o que leva ao ancoramento de uma vesícula na outra (ITAKURA; KISHI-ITAKURA; MIZUSHIMA, 2012; NAKAMURA; YOSHIMORI, 2017).

Por fim, os fatores de amarra facilitam a interação das vesículas e a fusão destas ao abrir caminho entre as membranas e permitir a formação dos complexos SNARE. Um exemplo é o complexo HOPS, que inclui proteínas como VPS33A, VPS16, VPS11, VPS18, VPS39 e VPS41, que são capazes de interagir com Stx17. Além disso, a depleção dessas proteínas resulta na interrupção do fluxo autofágico e acúmulo de fagossomos LC3 e Stx17 positivos, sugerindo que o complexo HOPS promove a fusão do autofagossomo com lisossomos através da interação com Rab7 (JIANG *et al.*, 2014).

1.2. XENOFAGIA

Durante a infecção por patógenos intracelulares é comum que o processo de autofagia esteja envolvido no controle da infecção, sendo chamado de xenofagia. No entanto, alguns patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Fransciella novicida* e *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) evoluíram para escapar deste sistema e sobrevivem no ambiente intracelular. (BACH *et al.*, 2008; CHANDRA; KUMAR, 2016; CHEN *et al.*, 2015; GOMES; DIKIC, 2014; QI *et al.*, 2016; YOSHIKAWA *et al.*, 2009).

A *L. monocytogenes* por exemplo, consegue prevenir a ubiquitinação de proteínas da superfície celular através da interação com MVP (proteína de salto principal, do inglês *major vault protein*). Além disso, as proteínas PlcA e PlcB da bactéria conseguem impedir a lipidação de LC3, de forma que a vesícula não feche. Já a *F. novicida* consegue reduzir a produção de lisossomos e autofagia, de modo geral, através da regulação positiva de uma protease presente em lisossomos, a catepsina B Outros exemplos são a *Shigella flexneri* que inativa Rab1 e impede a formação do

autofagossomo e a *Legionella pneumophila* quebrando a ligação entre LC3 e PE (CHOY *et al.*, 2012; DONG *et al.*, 2012; DORTET; MOSTOWY; COSSART, 2012; MITCHELL *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2016).

Mtb, por sua vez, possui mecanismos de escape muito bem elaborados e que podem subverter esse processo em várias etapas, como na fusão. Já é conhecido que o glicolípido ManLam da parede celular da bactéria é capaz de induzir MAPK p38, do hospedeiro, de forma a inibir a fusão do fagossomo com o lisossomo. Assim, a bactéria consegue evadir da degradação no lisossomo. Outros mecanismos já descritos são a indução de mTOR via IL-10 e impedir a acidificação de lisossomos ao inibir as bombas VATPases. Além disso, ESAT-6, proteína secretada pelo sistema ESX-1, impede a progressão de autofagossomos iniciais (Rab5 positivos) para tardios (Rab7 positivos) (Figura 2).(BACH *et al.*, 2008; CHANDRA; KUMAR, 2016; DHANDAYUTHAPANI *et al.*, 1995; DUAN *et al.*, 2016; PERSKVIST; ZHENG; STENDAHL, 2000; WONG *et al.*, 2011).

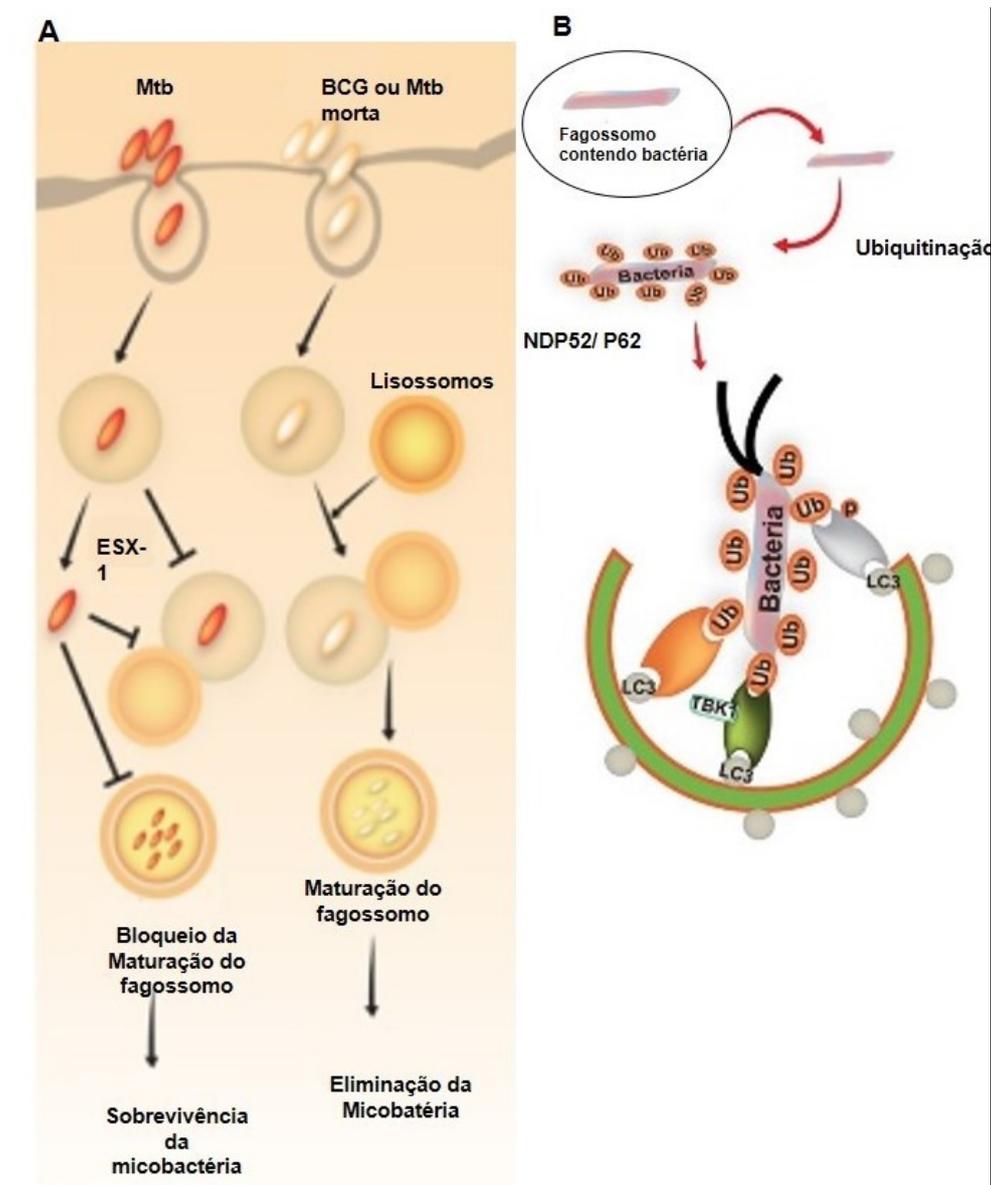


Figura 2 – Representação esquemática da xenofagia em *Mtb* – (A) Representação geral da xenofagia. **(B)** Representação dos “receptores” autofágicos. (Adaptado de JO, *et al.*, 2013)

1.3. Mycobacterium tuberculosis

Em 1982 Robert Koch descreveu o bacilo causador da tuberculose, denominado de Mtb. É chamado, também, de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) devido à parede celular que confere a capacidade de serem corados pela técnica de Ziehl Nilsen, a qual os bacilos são corados com fuscina a quente e resistem à descoloração por uma solução ácida (Brandt, Lloyd, 1954). A respeito das características microbiológicas, a parede celular é chamada de micolil-arabinogalactano-peptideoglicano ou mAGP. A parede é dividida em 3 partes. A primeira, logo acima da membrana plasmática é composta por peptideoglicano que é responsável por conferir a rigidez e resistência à pressão osmótica. É formada principalmente por resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNac) e ácido murâmico modificado (Mur). Logo acima, há uma camada de arabinogalactano e se une ao peptideoglicano através de ligação de fosfodiesterase. E em seguida, há a camada de ácidos graxos de cadeia longa (60 a 90 átomos de carbono) denominado ácido micólico (BRENNAN, 1995; BRIKEN *et al.*, 2004; COOK *et al.*, 2009; FORRELLAD *et al.*, 2013; SCHLESINGER; HULL; KAUFMAN, 1994).

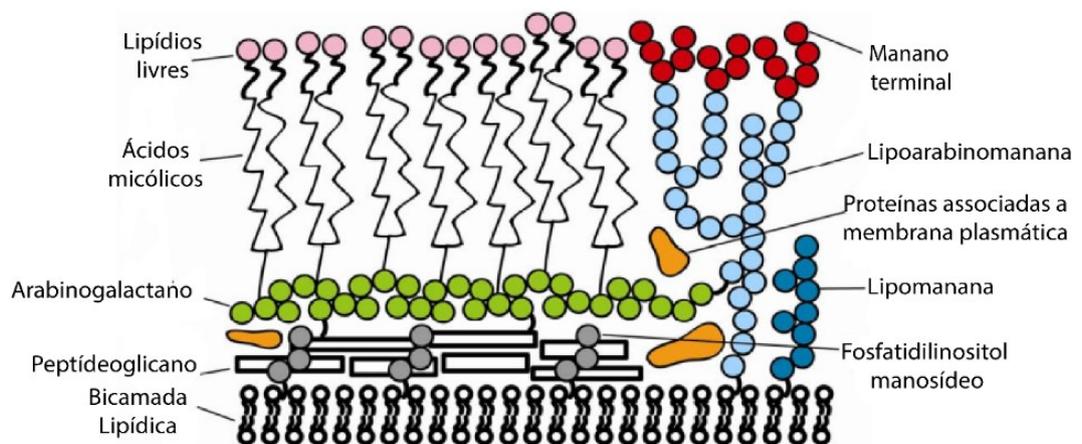


Figura 3 - Representação esquemática da parede celular do *Mycobacterium tuberculosis*. (Adaptado de PARK; BENDELAC, 2000).

A membrana plasmática de Mtb (Figura 3), por sua vez, possui lipídeos livres e proteínas, que são responsáveis pela virulência da bactéria como, por exemplo, os glicolipídeos MaLaM e fosfatidilinositol manosídeo (PIM) que são capazes de ativar receptores de manose como CD206 e induzir a fagocitose e diminuir a acidificação do

lisossomo e também a fusão do autofagossomo com o lisossomo. Outro lipídeo de membrana importante para Mtb é o LpqH, que é capaz de ativar TLR2 e induzir a secreção de citocinas pró-inflamatória. Além dessas moléculas presentes na parede celular, existem também proteínas que são secretadas pela bactéria. Esse conjunto de proteínas é chamado de proteínas do filtrado de cultura (CFP, do inglês *culture filtrate proteins*). A secreção dessas proteínas é feita por sistemas de secreção da bactéria que são responsáveis por translocar a proteína pela membrana plasmática e parede celular. Existem três sistemas bem descritos: Sec-transporte, Tat - transporte e ESX-1. Sendo o último um importante sistema para a virulência da bactéria. (ASTARIE-DEQUEKER *et al.*, 1999; BAFICA *et al.*, 2005; CHIEPPA *et al.*, 2003; FELTCHER; SULLIVAN; BRAUNSTEIN, 2010; JONES *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2005; MEANS *et al.*, 1999; QUEVAL; BROSCHE; SIMEONE, 2017; SCHLESINGER, 1996; SINGH *et al.*, 2006; SONNENBERG; BELISLE, 1997; TORRELLES; AZAD; SCHLESINGER, 2006)

Os dois primeiros são sistemas já descritos em outras bactérias e ambos se baseiam no reconhecimento de uma sequência peptídica N-terminal que permite a translocação pela membrana e posteriormente a clivagem deste sítio para liberação da proteína. O sistema Sec reconhece a sequência através da proteína SecA, que transloca para o sistema transmembrana Sec YEG que expõe na membrana. Em seguida, a proteína é clivada por LspA. Boa parte das proteínas que são secretadas são lipoproteínas e importantes para a virulência, como o LpqH. A ausência de LspA reduz a virulência da bactéria sem impedir a maturação do fagossomo, mostrando a importância desse sistema para a evolução da infecção. (LIGON; HAYDEN; BRAUNSTEIN, 2013; PAPANIKOU; KARAMANOU; ECONOMOU, 2007; PENNINI *et al.*, 2006; RAMPINI *et al.*, 2008)

O sistema Tat é similar ao Sec transporte e necessita de uma sequência sinal para secreção da proteína. É um sistema importante pois seus substratos são proteínas como a β -lactamase que, conforme demonstrado, se não for secretada, não confere resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Os sistemas Tat e Sec são considerados genes essenciais. Não é possível fazer a deleção de, por exemplo, SecA sem prover uma cópia, mostrando que a função se estende desde a infecção até na homeostase bacteriana (BRAUNSTEIN *et al.*, 2001; GUO, XINZHENG V. *et al.*, 2007; MARRICHI *et al.*, 2008; MCDONOUGH *et al.*, 2005; SASSETTI; RUBIN, 2003).

O ESX-1 é um sistema composto por proteínas que são codificadas pelo locus RD1 e consiste em um sistema de secreção que não utiliza o reconhecimento de sequências sinais já descritas anteriormente. No entanto, similar aos demais, secreta proteínas importantes para a virulência e já foi demonstrado que bactérias mutantes para o sistema ESX-1 são atenuadas durante a infecção em macrófagos e camundongos (ABDALLAH *et al.*, 2007; GUINN *et al.*, 2004; HSU *et al.*, 2003).

Durante o processo de infecção, a bactéria é fagocitada e consegue evadir da degradação no lisossomo ao escapar do autofagossomo para o citosol. Já foi descrito que o escape da bactéria é dependente do sistema ESX-1 (Smith, *et al.*, 2008). A ausência deste sistema leva a incapacidade da bactéria ir para o citosol. Corroborando isso, a bactéria BCG (Bacilo Calmette-Guerin) é deficiente para esse sistema e fica restrita às vesículas, sendo não patogênica. Dessa forma, duas proteínas têm sido descritas como importantes para esse processo, ESAT-6 e CFP-10. A ausência de apenas ESAT-6 também impede o escape para o citosol e a ativação de várias sinalizações intracelulares que contribuem para o escape do sistema imunológico, como a produção de IFN tipo I. Apesar disso, ainda não é bem esclarecido como o sistema ESX-1 de fato leva o escape da bactéria para o citosol e suas consequências para a patologia da tuberculose (HSU *et al.*, 2003; JAMWAL *et al.*, 2016; LEWIS *et al.*, 2003; PYM *et al.*, 2002; RENSHAW *et al.*, 2002; SMITH *et al.*, 2008b; VAN DER WEL *et al.*, 2007; WIENS; ERNST, 2016).

1.4. TUBERCULOSE E RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A tuberculose (TB) é uma das principais doenças infecciosas disseminadas globalmente, estando entre as 10 doenças que mais causam morte em todo mundo. Estima-se que, atualmente, 1,7 bilhões de pessoas estão infectadas com o bacilo e dentre estes, de 5 a 15% irão desenvolver doença na sua forma ativa. Em 2017, foram identificados 10,4 milhões de novos casos, além de 1,7 milhões de óbitos (WHO, 2018).

A transmissão da tuberculose ocorre pelo ar através da tosse de indivíduos com a doença ativa. Essas gotículas podem ser inaladas por indivíduos saudáveis e uma vez que a bactéria chega aos alvéolos, uma resposta imunológica começa pelas células

residentes como macrófagos alveolares. Inicialmente há uma intensa migração de células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Após alguns dias, ocorre a apresentação de antígenos, o que permite a seleção e expansão clonal de linfócitos antígeno-específicos. O recrutamento destas células, tanto da imunidade inata quanto adaptativa, gera uma estrutura chamada de granuloma que permite, na maioria das pessoas, a contenção do patógeno eliminando-o ou estabelecendo um estado de latência. No entanto, 10% dos indivíduos infectados não conseguem conter o potencial patogênico do Mtb e progridem para a forma ativa e manifestam a sintomatologia clínica da infecção (PETERS; ERNST, 2003; PIETERS, 2008; RUSSELL, 2007; WHO, 2018).

Os indivíduos com a forma latente da infecção apresentam positividade para os testes PPD ou tuberculina (TST, do inglês *tuberculin skin test*) e para o IGRA (do inglês, *Interferon – γ release assay*), no entanto não apresentam sintomatologia clínica. Já os indivíduos com a doença ativa, além da positividade para estes testes apresentam positividade para a radiografia de pulmão, mostrando as lesões granulomatosas, bem como para exames microbiológicos e moleculares. Como sintomatologia, apresentam febre noturna, perda de peso, tosse e hemoptise. Neste último caso, a bactéria consegue subverter a resposta imunológica e a progressão da doença para forma ativa depende de diversos fatores, bem como virulência da bactéria, resposta imunológica e comorbidades, como a infecção por HIV (ESMAIL *et al.*, 2014; FOGEL, 2015; NARASIMHAN *et al.*, 2013; PAI *et al.*, 2016; TOOR *et al.*, 2014).

Diante disso, algumas classes de proteínas como lectinas são utilizadas por patógenos durante processos infecciosos, e é importante para adesão célula a célula, apoptose e agregação. São proteínas que fazem reconhecimento e aderência a carboidratos. Um exemplo de lectina em Mtb bem descrita é a HBHA (hemaglutinina ligante de heparina), que promove ligação a carboidratos sulfonados e participa da disseminação da bactéria para outros sítios de infecção no hospedeiro (CUMMINGS; MC EVER, 2009; PETHE *et al.*, 2001).

Uma outra lectina (sMTL-13) de Mtb foi descrita pelo nosso grupo. Análises *in silico* e funcionais revelaram que esta proteína tem similaridade com a cadeia β da ricina e é codificada pelo gene Rv1419 de Mtb (NOGUEIRA, LUCAS *et al.*, 2010).

A ricina é uma toxina produzida por *Ricinus communis*. É composta por duas cadeias, α e β . a cadeia α responsável pelo efeito tóxico, que impede a síntese proteica em células de mamíferos. No entanto, o sucesso desta toxina depende da entrada na célula. Nesse sentido, a cadeia β é responsável pelo ancoramento na membrana plasmática ao interagir com carboidratos dessa sendo essencial para a translocação da cadeia α para o meio intracelular (MOSHIRI; HAMID; ETEMAD, 2016).

Considerando isso, até o presente momento o que se sabe é que sMTL-13 é secretada no CFP (NOGUEIRA *et al.*, 2012) e é capaz de induzir produção de citocinas como IL-6, IL-12 e induzir a produção de IFN- γ por linfócitos (MENEZES, 2012). Recentemente foi mostrado, pelo nosso grupo, que a ausência desse gene desregula o tráfego de vesículas intracelulares, de forma que ocorre redução na liberação de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrose factor alfa*) (dados não publicado). Somado a isso, em 72 horas pós infecção há aumento no recrutamento de lisossomos em macrófagos infectados pela bactéria deficiente para o gene Rv1419, chamada de Δ Rv1419, em relação à infecção pela bactéria selvagem (H37Rv). Esse conjunto de dados sugere que sMTL-13, além da função já predita de ancoragem na membrana plasmática, pode interferir com o tráfego de vesículas, bem como a secreção de citocinas de forma a impactar o progresso da infecção (dados não publicados).

O recrutamento de lisossomos durante infecções pode ocorrer em alguns momentos. Inicialmente quando ocorre a fagocitose, a vesícula formada precisa fundir-se com o lisossomo para que o conteúdo seja degradado. Em um segundo momento, no caso de Mtb, quando a bactéria já escapou para o citoplasma, a célula tenta responder induzindo xenofagia. Como no primeiro processo, é necessário que o autofagossomo se funda com o lisossomo para morte da bactéria. No entanto, já se sabe que Mtb escapa desse processo ao inibir a fusão de autofagossomos com lisossomos. Então o que se observa é que durante a infecção pela Mtb H37Rv não ocorre recrutamento de lisossomos. Porém, a infecção pela Mtb Δ Rv1419, induz recrutamento de lisossomos neste tempo (dados não publicados). Esse processo pode ser consequência da desregulação da autofagia. Além disso, em um experimento foi evidenciado, por microscopia eletrônica, o acúmulo de vesículas com

morfologia de lisossomos em tempos tardios de infecção pelo Mtb Δ Rv1419 (dados não publicados) (KÁPOSZTA *et al.*, 1999; RUSSEL, 2016; SHARMA *et al.*, 2018).

Um trabalho de 2018 realizou uma análise de interactoma de proteínas de Mtb com proteínas de macrófagos humanos. Em torno de 105 proteínas de Mtb que podem ser secretadas (predição *in silico*) foram expressas em células 293T e purificadas. E cada uma dessas proteínas foi incubada com um extrato de macrófagos U937 e foi feito um *pull down*. Essa técnica consiste em purificar a proteína conhecida, no caso a de Mtb, e avaliar quais proteínas do macrófago se ligaram às proteínas de Mtb. Esse conjunto de dados pode mostrar com qual processo celular as proteínas de Mtb podem estar relacionadas. Uma das proteínas de Mtb analisadas foi a sMTL-13 e o trabalho revelou que pode interagir com Catepsina B (PENN *et al.*, 2018).

A Catepsina B é uma enzima que pertence à família da papaína, que são cisteína proteases. Todas as enzimas dessa família são traduzidas na forma de zimógenos no retículo endoplasmático e são carregadas até o lisossomo onde são ativadas ou pelo pH ácido ou pela presença de glicosaminoglicano. Uma vez ativadas podem ser reguladas por inibidores endógenos como as cistatinas e as serpinas que se ligam ao substrato e impedem a degradação. A Catepsina B, em específico, possui algumas peculiaridades, como por exemplo, agir em pH neutro no citoplasma e, influenciar na atividade do inflamassoma, como também regular negativamente a produção de lisossomos e a autofagia durante a infecção por *Franciella novicida* (LAGE *et al.*, 2013; QI *et al.*, 2016; TURK, DUŠAN *et al.*, 1998; TURK, VITO *et al.*, 2012; TURK, VITO; TURK; AN TURK, 2001).

Além das funções intracelulares já citadas, na última década vêm sendo descritas algumas funções extracelulares das catepsinas, que vão além da ação proteolítica, como por exemplo, com a reabsorção óssea, o rearranjo da matrix extracelular, migração de leucócitos, bem como sinalização por TLR (Receptores semelhantes a toll, do inglês *toll like receptors*) e a regulação da apoptose. A catepsina B, em específico, pode ser liberada no citosol e induzir a ativação de inflamassoma, induzir apoptose, ser liberada no meio extracelular e agir em pH neutro. E ainda, recentemente, foi descrito a secreção por células imunes, correlacionando com a progressão de tumores e interagindo com inflamassoma e induzindo a atividade de caspase 1 independente da atividade proteolítica. (DE CASTRO; BUNT; WOUTERS, 2016; GUICCIARDI *et al.*, 2000; LAGE *et al.*, 2013; MATSUMOTO *et al.*, 2008; MORT;

RECKLIES; POOLE, 1984; RODRIGUEZ-FRANCO *et al.*, 2012; SOBOTIČ *et al.*, 2015; THOMAS, 1993; VASILJEVA *et al.*, 2006; VIZOVIŠEK; FONOVIĆ; TURK, 2019; YASUDA; KALETA; BRÖMME, 2005)

Então a partir disso, esse trabalho se propõe a estabelecer a relação da Catepsina B com o recrutamento de lisossomos, com a liberação de TNF- α , e a relação disso com a autofagia. E ainda, avaliar qual a influência de sMTL-13 neste processo. Tendo como hipótese principal que sMTL-13 regula positivamente a atividade de catepsina B e por consequência induz a liberação de TNF- α e impede a indução da autofagia.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o envolvimento da catepsina B na liberação de TNF- α e na relação da autofagia e recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb Δ Rv1419.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I.** Avaliar o envolvimento de SMTL-13 e catepsina B com a autofagia;
- II.** Avaliar o envolvimento de Catepsina B no recrutamento de lisossomos por Δ Rv1419;
- III.** Avaliar a atividade enzimática de Catepsina B durante a infecção por Mtb e a relação com a liberação de TNF- α dependente de SMTL-13.

3. METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGO DERIVADO DE MEDULA ÓSSEA (BMM)

Os camundongos C57BL/6 de 6 a 8 semanas de ambos os sexos foram eutanasiados, por deslocamento cervical. O projeto foi aprovada sob o protocolo 8278290818. Em um fluxo laminar, os membros posteriores foram removidos, dissecados e mantidos em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen) até o momento da remoção da medula. Ainda em fluxo laminar, em condições estéreis, as epífises da tíbia e do fêmur foram removidas usando um bisturi número 23. Com auxílio de uma agulha de insulina a medula óssea foi removida usando salina estéril. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 450 G por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O sedimento de células foi ressuspendido em 36 mL de DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco), 20% de sobrenadante de L929, 1 mM de piruvato de sódio (Sigma), 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 25 mM de HEPES (Gibco). A suspensão foi distribuída em placas de 6 poços, com 3 mL em cada poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após 5 dias de cultivo, foram adicionados mais 2 mL de DMEM suplementado até o 7º dia de cultivo. Geralmente, no 7º dia de cultivo, recuperam-se $1,5 \times 10^7$ de macrófagos. Este valor foi levado em consideração para calcular quantos animais seriam necessários para cada experimento.

3.2. OBTENÇÃO DE SOBRENADANTE DE L929

A linhagem de célula L929 é uma linhagem isolada de um camundongo macho de aproximadamente 100 dias. É uma linhagem que produz GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*), que é essencial para a diferenciação de macrófagos. A celular linhagem após ser descongelada, foi colocada em uma garrafa de 75 cm² contendo DMEM com 20% de SBF e foram incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ até atingir a confluência. Em seguida, foram coletadas após tripsinização (Tripsina 0,05%- Gibco) e centrifugadas e as células foram contadas em câmara de Neubauer em uma diluição de 1:10 em *Trypan Blue* (Gibco) A partir disso, 1×10^6 células foram transferidas para garrafas de 150 cm² contendo 20 mL de DMEM

completo. Após a aderência das células, foram adicionados mais 80 mL de DMEM completo e incubado nas mesmas condições por 7 dias. Ao final da semana, o sobrenadante foi coletado, filtrado e armazenado em tubos cônicos de 50mL a -20°C até o uso. Por fim foi adicionado, por fim, mais 100 mL de meio nas garrafas e incubado mais 1 semana. Ao final desse tempo é realizado o mesmo processo.

Foi feita marcação para macrófagos, nos lotes criados, usando as moléculas F4/80 e CD11b para serem analisados por citometria de fluxo com o objetivo de identificar a porcentagem de macrófagos obtidos por essa técnica e garantir a diferenciação dos macrófagos.

3.3. CULTIVO DE MTB H37RV E Δ RV1419

A obtenção da cepa de Mtb deficiente para o gene Rv1419 foi realizada por Nogueira e colaboradores (2012). O método utilizado foi descrito por Parish e Stoker (2000) e baseia-se na substituição alélica por recombinação homóloga.

A cultura de ambas as bactérias foram mantidas através de repiques semanais de amostras armazenadas a -20°C. Posteriormente, a suspensão bacteriana foi então semeada em meio sólido Löwestein-Jensen (LJ – Labocrin, Brasil) e incubadas em estufa a 37°C por 30 dias. Todos os experimentos usando ambas as bactérias foram feitos em cabine de segurança biológica com nível de biossegurança 2 (NB2), seguindo as normas de biossegurança estabelecidas, incluindo o uso de máscara N95 (3M), touca, jaleco e luvas descartáveis.

3.4. INFECÇÃO DE BMM POR H37RV E Δ RV1419

3.2.1. Preparo de bactérias para infecção

Para infecção, eram escolhidas culturas de bactérias em meio sólido LJ com aproximadamente 21 dias e as colônias retiradas com auxílio de um palito estéril. Posteriormente, as colônias eram transferidas para um tubo contendo pérolas de vidro. O tubo foi fechado e agitado em um vórtex para que houvesse a dissociação dos grumos bacterianos. Esperou-se 20 minutos para que o aerossol abaixasse. Após esse tempo foi adicionado 1 mL de salina e agitado novamente, esperando-se mais 20 minutos. Em seguida, foi colocado 3 mL de salina em um segundo tubo e da

suspensão bacteriana que foi agitada, retirou-se quantidade suficiente para que a segunda solução estivesse com o padrão de turbidez equivalente a 1 na escala McFarland equivalente a 3×10^8 bactérias. Esse processo foi feito separadamente, sendo a bactéria $\Delta Rv1419$ a primeira a ser preparada para evitar possível contaminação com a cepa H37Rv. De acordo com a escala 1 de McFarland indica que há 3×10^8 bactérias/mL na solução, foi feito o cálculo do volume da segunda solução a ser usada para a infecção objetivando-se alcançar o MOI (multiplicidade de infecção - do inglês, *multiplicity of infection*) para cada infecção,

3.2.2. Marcação de Mtb com SYTO 24

Para a marcação das bactérias com o corante SYTO 24, dilui-se o mesmo na proporção 1:10 em DMSO. Depois, utilizou-se 1 mL da suspensão bacteriana de cada cepa na concentração de 1 McFarland. Posteriormente, foram incubadas com SYTO 24 a 37°C por 30 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado 500 μ L de salina e foi centrifugado a 20.000 G por 40 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular suspenso em volume residual e adicionado 1 mL de salina.

3.2.3. Tratamento com Ca074Me

Para os experimentos que avaliaram a influência de catepsina B foi feito o pré-tratamento dos macrófagos por 2 horas com o fármaco Ca074Me (L-3-trans(propilcarbamil)oxirane-1-carbonil-isoleucil-L-proline metil ester - Sigma), inibidor seletivo de catepsina B, na concentração de 25 μ M. A droga foi diluída em DMSO a uma concentração de 10 mM, e armazenada a -80°C em alíquotas de no máximo 50 μ L. As alíquotas em uso foram alíquotadas novamente em 5 μ L para evitar descongelamentos sucessivos e armazenadas as -20°C.

3.2.4. Infecção de macrófagos derivados de medula óssea

Após os 7 dias da diferenciação da médula óssea em macrófagos, os poços foram lavados e as células removidas usando-se a tripsina 0,05%. As células coletadas foram centrifugadas a 450 g por 10 minutos. Em seguida foram contadas

diluindo-se 1:10 em Trypan Blue e usando uma câmara de Neubauer. O cálculo da quantidade de célula foi feito multiplicando-se o valor obtido na contagem pelo fator de diluição (10) e o fator de correção da câmara (10^4).

Para a adição das células nas placas foi respeitado a uma proporção de célula por volume de meio, com exceção da imunofluorescência. A cada 1×10^5 células foram colocado $100 \mu\text{L}$ de meio. De acordo com a quantidade de células usadas para cada grupo foi escolhido o tamanho da placa. Por exemplo, para experimentos com 2×10^5 células foram usados placas de 96 poços e para os experimentos com 1×10^6 células foram usadas placas de 12 poços. Após esse processo, as células foram incubadas na estufa durante uma noite.

Após esse período, para os respectivos experimentos, as células foram tratadas com Ca074Me ($25 \mu\text{M}$) por 2 horas. O volume usado foi o suficiente para cobrir as células. Os grupos não tratados também foram incubados com a mesma quantidade de meio sem o inibidor. Após as 2 horas, o meio foi removido e as células foram infectadas com o MOI de 1. Foi feita uma solução bacteriana com meio contendo a quantidade necessária para infecção.

3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para esta técnica foram usadas lamínulas em placas de 24 poços, contendo 1×10^5 células/ poço. Após a aderência, as células foram infectadas com bactéria marcada com SYTO 24 e após cada *time point* foi realizado o protocolo para marcação por α -lamp1.

Inicialmente, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS três vezes e as células foram fixadas com paraformaldeído 2% por 30 minutos. Para permeabilização, as células foram tratadas com Triton 0,2% por 5 minutos e o bloqueio foi feito com BSA 5% por 30 minutos. Após esse processo, foi incubado com o anticorpo primário diluído 1:100 em PBS por 1 hora e em seguida incubado com o anticorpo secundário, α -mouse Alexa 648 em diluição 1:3000 por 1 hora. Por fim, foi feito a marcação com DAPI ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 minutos. Entre todas as etapas, foi feito lavagem com PBS três vezes.

Para montagem das lâminas, as lamínulas foram removidas dos poços com auxílio de uma agulha e em seguida fixadas nas lâminas com *Prolong™ Gold* (Invitrogen) e esmalte transparente.

3.6. CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC)

Para avaliar a quantidade de bactéria intracelular foi feito o ensaio de unidades formadoras de colônias. Primeiramente, após cada tempo de infecção, os poços contendo 2×10^5 células foram lavados com salina e adicionado Saponina. Com auxílio da ponteira, agitando, as células foram lisadas em 200 μL de Saponina. Para o plaqueamento foi feita uma diluição seriada de ordem 10 para cada amostra. Em uma placa de diluição foram colocados 180 μL de Tween 80 0,05% em cada poço. Do lisado celular com saponina, foram retirados 20 μL e este foi adicionado à primeira diluição. Posteriormente, desse poço retirou-se 20 μL e passado para o próximo e assim por diante até a última diluição. O plaqueamento das bactérias foi feitos em meio Middlebrook 7H10 (Difco™ Becton Dickson, E.U.A), plaqueando 50 μL de cada diluição. O líquido foi espalhado com o auxílio de uma haste de plástico estéril. Após 28 dias de crescimento, as colônias foram contadas e feito um cálculo que corresponde a quantidade de unidade formadoras de colônias/ mL conforme o nº de colônias x volume x fator de diluição = UFC/mL.

3.7. ANÁLISE PROTEICA

3.2.5. Extração de proteína

Foi plaqueado 1×10^6 células em cada poço de uma placa de 12 poços. Após cada tratamento e/ou infecção, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C . Os poços foram lavados com salina e adicionado 500 μL de tripsina 0,05% e incubados por 5 minutos a 37°C . As células, então, foram removidas do poço e transferidas para um tubo de centrifugação contendo meio DMEM com 20% de SFB para inativação da tripsina. Em seguida, foi centrifugado a 450 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100 μL de tampão de lise mPER (Pierce) mais inibidor de protease 2 mM (Roche). As amostras foram agitadas e incubadas em gelo por 30 minutos e, neste período, a cada 10 minutos foram agitadas novamente. Após o período de incubação, foram centrifugadas a 19.000 g por 20 minutos e em seguida o sobrenadante foi coletada, uma amostra de 2 μL foi coletado para dosagem de proteína e a amostra foi armazenada a -20°C até o uso.

3.2.6. Dosagem de proteína

Para dosagem de proteína foi usado *Kit BCA protein Assay Kit* (Pierce). Foram incubados 10 μL de amostra em 200 μL do mix de reação, que é composto por 196 μL da solução A mais 4 μL da solução B para cada amostra. Em paralelo foi feita uma curva usando BSA (inLab) partindo de 2000 μg e realizando diluições seriadas até alcançar uma concentração de 31,25 e usando a solução de diluição do BSA como o zero. As amostras foram incubadas com o mix em uma placa de 96 poços por 30 minutos. Após esse período foi feita a leitura em um espectrofotômetro (Biotek) usando-se o comprimento de onda 540 nm. A obtenção das concentrações das amostras foi feita utilizando-se a curva feita com as diluições seriadas do BSA. Primeiro é feita uma regressão linear usando os valores de OD (densidade óptica - do inglês *optical density*) e das concentrações conhecidas. Se obtido um valor de r próximo de 1, os valores de OD das amostras são interpoladas utilizando-se a curva.

3.2.7. Gel de poliacrilamida

Para realizar a eletroforese em gel de poliacrilamida primeiro foi confeccionado o gel. O gel escolhido foi de 4/15%. Primeiro foi feito o gel de separação que foi de 15% de acrilamida. Consiste em 2,3 mL de água miliQ, 5 mL de mix de acrilamida 30%, 2,5 mL de Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 100 μL de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10%, 100 μL de persulfato de amônio (APS) 10%, e 4 μL de TEMED (N, N, N, N', N' - tetramethylethyenediamine, Sigma). A solução foi colocada no suporte e para remoção das bolhas foram adicionado 200 μL de isopropanol 70%. Após a polimerização da acrilamida, foi feito o segundo gel, o de entrada, sendo 4% de acrilamida. Consiste em: 2,1 mL de água miliQ, 500 μL de mix de acrilamida 30%, 380 μL de Tris-HCl 1 M pH 6,8, 30 μL de SDS 10%, 30 μL de APS 10%, 3 μL de TEMED. Após adicionar a solução foi colocado o pente com formato dos poços até polimerizar. Após polimerizar, removeu-se o pente e os poços foram lavados com água destilada para remoção das bolhas.

3.2.8. Preparo das amostras

Para cada corrida foram usados 25 µg de proteína. Após a dosagem da proteína o volume foi ajustado para que todas as amostras tenham a mesma quantidade e o mesmo volume. O respectivo volume para 20 µg de proteína foi pipetado e adicionado o tampão de amostra na diluição de 1:6. As amostras foram incubadas a 92°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas.

3.2.9. Eletroforese

O gel foi removido do suporte inicial e colocado em um segundo suporte que foi encaixado na cuba de eletroforese. A cuba interior foi preenchida com tampão de corrida (25 mM Tris, 190 mM Glicina e 0,1% de SDS) até a borda superior e a cuba externa foi preenchida com tampão de corrida até a metade. As amostras foram pipetadas nos respectivos poços, bem como o padrão de peso molecular (Prestained MW, Thermo Fisher). Em seguida, foi encaixado o sistema na fonte. Inicialmente, foi colocado 80 volts até as amostras saírem do gel de entrada e entrarem no gel de separação, e então foi aumentada a voltagem para 120 Volts.

3.2.10. Transferência

Após a corrida que dura aproximadamente 2 horas, o gel foi removido do sistema. O sistema de transferência foi semi-úmido, sendo usado o tampão de transferência (20 mM Tris, 190 mM de glicina) com 20% de metanol. O sistema foi montado seguindo a ordem: 5 esponjas molhadas no tampão sem bolhas, papel filtro molhados, gel, membrana de nitrocelulose (GE Health Care) ativada no tampão, papel filtro molhado, 5 esponjas molhadas no tampão e sem bolhas. O sistema foi fechado na cuba de transferência e foi adicionado mais tampão com 20% de metanol até a borda superior da cuba. Na parte de fora adicionou-se água. A corrida eletroforetica levou 2 horas a 25 miliamper

3.2.11. Immunoblotting

Após a transferência, o sistema foi desmontado e a membrana foi lavada uma vez no TBST (TBS – 20 mM de Tris e 15 0mM de NaCl – e 0,5% de Tween 20). Logo após

a membrana foi incubada por 5 minutos no Ponceau (0,001%) e lavada em água destilada para retirar o excesso e em seguida fotografada para documentar a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose. Uma vez evidenciado a transferência, foi removido o Ponceau usando-se TBST. Em seguida, a membrana foi incubada em 20 mL de solução de bloqueio (5% de leite desnatado em TBST) por 1 hora. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 x com TBST e incubada *overnight* no anticorpo primário. O anticorpo primário varia na quantidade foi diluído BSA 5%, diluído em TBST e a concentração variou de acordo com as recomendações do fabricante. Para LC3B (Cell Signaling) a diluição foi de 1:500 e β -actina(AbCam) 1:4000. Após a incubação overnight, a membrana foi lavada 3x em TBST e incubado no anticorpo secundário por uma hora. Para LC3B o secundário foi usado foi anti-rabbit (Cell Signaling) com diluição 1:4000, para a β -actina foi usado o anti-mouse (Cell signaling) com diluição 1:5000 e diluídos em 5% de leite TBST. Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes em TBST e 2 vezes em TBS. Todas as lavagens foram de 5 minutos cada.

3.2.12. Revelação

Uma vez lavada em TBS a membrana pôde ser revelada. A solução de revelação foi composta por 10 ml de ECL (0,1 M de Tris pH 8,6), 22 μ L de ácido cumárico (90 mM), 50 μ L de luminol (250 mM), 3 μ L de peróxido de hidrogênio 30%. Sendo adicionados nessa ordem e agitados. A membrana foi incubada por 90 segundos nessa solução e depois transferidas para o o cassete e levada para uma sala escura onde foi exposto por 15 minutos LC3B e 30 segundos para β -actina com filme de raio X (FujiFilm). A revelação do filme foi feito na máquina reveladora.

3.8. DOSAGEM DE CITOCINA POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA

Para a análise de TNF- α foi utilizado o kit de ELISA (Bioscience). O sobrenadante foi coletado após cada tempo de infecção e armazenado a -20°C até o uso. As placas onde foi realizado o ensaio foram sensibilizadas diluindo-se 1:250 o anticorpo de captura em coating buffer. Foram colocados 100 μ L em cada poço. A placa foi vedada com um plástico e incubado a 4°C *overnight*. Após, aproximadamente 12 horas, o anticorpo foi removido, lavado 5 vezes com PBS + Tween 20 a 0,05%. As amostras

foram bloqueadas para ligações inespecíficas por 1 hora com o diluente 1X. Em seguida foram lavadas e incubadas de novo. Para a curva de detecção, foi feita uma diluição seriada do padrão em *assay diluent* 1X que variava de 2000 pg/mL a 32,5 pg/mL de TNF α , tendo o *assay diluent* 1X como o branco. A placa foi novamente incubada a 4°C *overnight*.

Após o período de incubação, as amostras foram removidas, os poços lavados 5 vezes com PBS+Tween 20 0,05%. Foi adicionado o anticorpo de detecção diluído 1:250 em *assay diluent* e incubado por uma hora. Após esse tempo, foi lavado cinco vezes e incubado com o HRP por 30 minutos. Em seguida, foi lavado sete vezes com PBS+Tween 20 0,05% e incubado com o ABTS por 30 minutos. A leitura foi feita em 405 nm em espectrofotômetro (marca).

3.9. ENSAIO DA ATIVIDADE DE CATEPSINA B

Após cada tempo de infecção, as células foram removidas por tripsinização e centrifugadas a 450 g por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e adicionado 55 μ L de tampão de lise (BioVision). As amostras foram incubadas no gelo por 30 minutos, sendo agitadas em um vortex a cada 10 minutos. Após ao tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 19.000 g por 20 minutos e a 4°C. Então, o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C até o ensaio enzimático

Para avaliar a atividade da catepsina B foi usado o substrato cloridrato Z-Arg-Arg-7-amino-4-metilcoumarina (Z-RR-AMC-Sigma), que quando clivado gera o composto 7-AMC fluorescente, sendo feita a leitura da reação em uma placa de 96 poços preta opaca. Inicialmente, as amostras foram diluídas de acordo com o teste de padronização. A amostra foi incubada com outras duas soluções. A primeira é uma solução de L-cisteína (Sigma) 8 mM, pH 6.0 em 40°C. A segunda solução foi de Brij35 (Sigma) 0,1%. No mix em que foi encubado a amostra, foram colocados 20 μ L de amostra, 60 μ L de L-Cisteína e 80 μ L de Brij35. Esse mix, a 40°C foi homogeneizado e lido no fluorímetro, excitado no comprimento de onda de 348 nm e lido em 440 nm até obter uma leitura constante. Posteriormente, foram adicionados 60 μ L de substrato a 0,02 mM e homogeneizado. Logo em seguida, iniciou-se a leitura nas mesmas

condições descritas anteriormente e obteve-se uma curva de intensidade de fluorescência. A leitura foi feita a cada 5 minutos e por 20 minutos.

Para quantificação, não foi realizada uma curva padrão, mas um cálculo de fluorescência em relação à quantidade de proteína. A dosagem foi feita de acordo com o protocolo já descrito em 3.2.4.

Cálculo:

Área sob a curva / μ g de proteína

A área sob a curva foi obtida colocando-se as leituras a cada 5 minutos, variando de 0 a 20 no GraphPad prism 7.0 e feito o cálculo de área sob a curva.

3.10. EXTRAÇÃO DE RNA E CONFECÇÃO DE cDNA

O RNA total foi extraído de BMM (macrófagos derivados de médula óssea, do inglês *Bone marrow derived macrophages*) infectadas ou não com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 nos tempos de 6, 12 e 24 horas de infecção. A extração de RNA foi realizada utilizando o reagente Trizol (Thermo) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA em cada amostra foi estimada pela leitura de absorbância em 260 nm e 1 μ g de RNA foi aplicado para a reação de transcriptase reversa, utilizando o kit comercial High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

3.11. RNAseq

O sequenciamento foi feito na plataforma illumina. Após o sequenciamento foram removidos os adaptadores e as *reads* com qualidade menor que 20 com o Trimmomatic (0.36) (Bolger, et al., 2014). As sequências filtradas foram alinhadas ao genoma referência de *Mus musculus* (ensembl GRCm38.92) pelo STAR(2.6.0c) (Dobin, et al., 2013). A quantificação das *reads* mapeadas aos genes foi feita usando o pacote *featurecounts* (Liao, et al., 2014) do software *Subread* (1.6.1) (Liao, et al., 2013). Os genes com contagem menor que 2 *reads* mapeadas foram removidos. A análise de expressão diferencial foi feita usando os métodos baseados em modelo linear ou binomial negativo. Foram usados os pacotes de *edgeR* (3.10.0) (Robinson, et al., 2010) e *limma*(3.36.2) (Ritchie et al., 2015). O pacote TMM (Byrnes, 2016) foi usado para calcular os fatores de normalização entre as amostras, e depois foi usado

a função *voom* seguida da correção de *batch* com *ComBat* (sva 3.28.0) (Leek, et al., 2012). Os genes diferencialmente expressos (DEGs, do inglês, Differentially Expressed Genes) foram calculados pelo teste-t, teste-f e modelo bayesiano empírico. Os heatmaps dos genes de interesse foram criados usando o *pheatmap*(1.0.10) (Kolde, 2012).

3.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram processados utilizando-se o ANOVA de duas vias seguido de pós teste de Tukey. Para dosagens de proteína e ELISA foi usado a regressão linear e foram consideradas as curvas com r acima de 0,9. Todas as análises foram feitas no GraphPad Prism 7.

4. RESULTADOS

4.1. AS PROTEÍNAS LIGADORAS DE GUANILATO SÃO IMPORTANTES PARA O RECRUTAMENTO DE LAMP-1 DURANTE A INFECÇÃO POR Mtb Δ Rv1419

A infecção pela Mtb leva à inibição da autofagia e, concomitante, à redução do recrutamento de lisossomos. Dessa forma, para suportar a nossa hipótese que a sMTL-13 tem um papel regulatório na autofagia, utilizamos como ferramenta experimental a infecção em macrófagos deficientes para as proteínas GBP (proteínas ligadoras de guanilato, do inglês *Guanylate binding proteins*). Essas proteínas estão envolvidas na indução da autofagia ao recrutar ubiquitinas e poderem interagir com a p62, uma proteína adaptadora e iniciadora da autofagia. Assim, ao infectar os macrófagos deficientes para GBP, podemos avaliar se há envolvimento da autofagia através do recrutamento de lamp-1 durante a infecção por Mtb Δ Rv1419.

Desta forma, para abordar a influência da autofagia no recrutamento de lamp-1 durante a infecção, foi feita a infecção de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos selvagens e deficientes para GBP (cromossomo 3) com Mtb *H37Rv* e Mtb Δ Rv1419 por 72 horas. Para avaliar o recrutamento de lisossomos, realizamos a marcação para lamp-1 por imunofluorescência, possibilitando assim, observar a localização e a intensidade de vesículas nas células infectadas.

Esse conjunto de dados (Figura 4) mostra que a infecção em macrófagos deficientes para GBP pela Mtb Δ Rv1419 falha no recrutamento de lamp-1 72 horas após infecção. Isso sugere que a indução da autofagia é importante para o recrutamento de lisossomos por Mtb Δ Rv1419 em 72 horas de infecção.

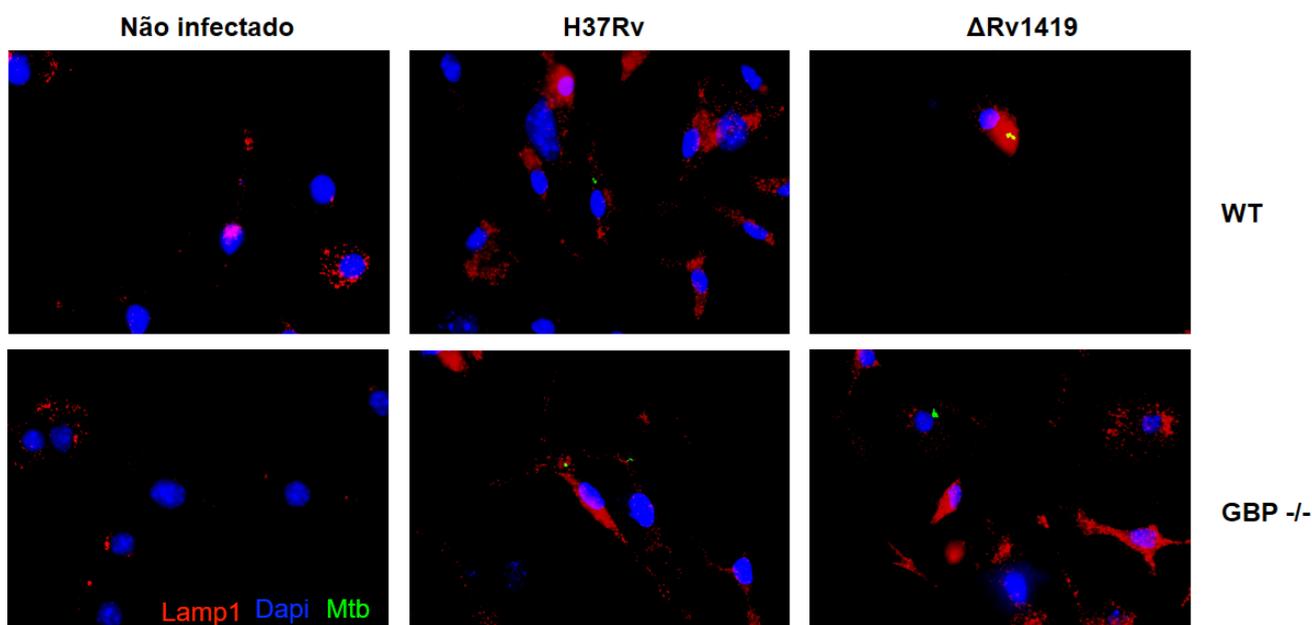


Figura 4 – A regulação negativa do recrutamento de lisossomos pela sMTL-13 está relacionado com a autofagia. Marcação feita por imunofluorescência, na qual o vermelha é a marcação para lamp1 em AlexaFluor 568. Em verde, bactéria marcada com Syto24 e em azul, núcleo marcado com DAPI. Fotos representativas de células selvagens e deficientes para proteínas GBP não expostas e expostas a *Mtb* (MOI1) por 72 horas.

4.2. A INFECÇÃO POR MTB REDUZ A ATIVIDADE DE CATEPSINA B EM MACRÓFAGOS

Pires e colaboradores (2016) observaram que sMTL-13 pode interagir com catepsina B humana. Ainda, foi observado que catepsina B pode regular negativamente a autofagia e o recrutamento de lisossomos durante a infecção por *F. novicida* (Qi *et al.*, 2016). Assim, visto que a ausência de sMTL-13 falha no recrutamento de lisossomos durante a infecção por *Mtb* (dados não publicados), nos questionamos se a catepsina B seria regulada durante a infecção por *Mtb* Δ Rv1419.

Para abordar essa pergunta, avaliamos a atividade da catepsina B em macrófagos infectados com *Mtb* H37Rv e *Mtb* Δ Rv1419 em diferentes tempos de infecção.

Nesse conjunto de experimentos, foi feito o pré-tratamento dos macrófagos com Ca074Me posteriormente foram expostos ou não à *Mtb*. Após cada tempo de infecção avaliou-se a atividade enzimática de Catepsina B no extrato celular (Figura 5) e no respectivo sobrenadante (Figura 6). Foi possível observar com esses resultados que a infecção reduziu a atividade da catepsina B na célula, mas esse fenótipo aparenta ser independente da presença da sMTL-13 em *Mtb* (Figura 5D). E analisando os sobrenadantes dessas células, não conseguiu-se observar diferença na atividade dessa enzima (Figura 6B). Como controle experimental, foi feito o pré-tratamento dessas células com CA074Me a 25 μ M por 2 horas e nos respectivos

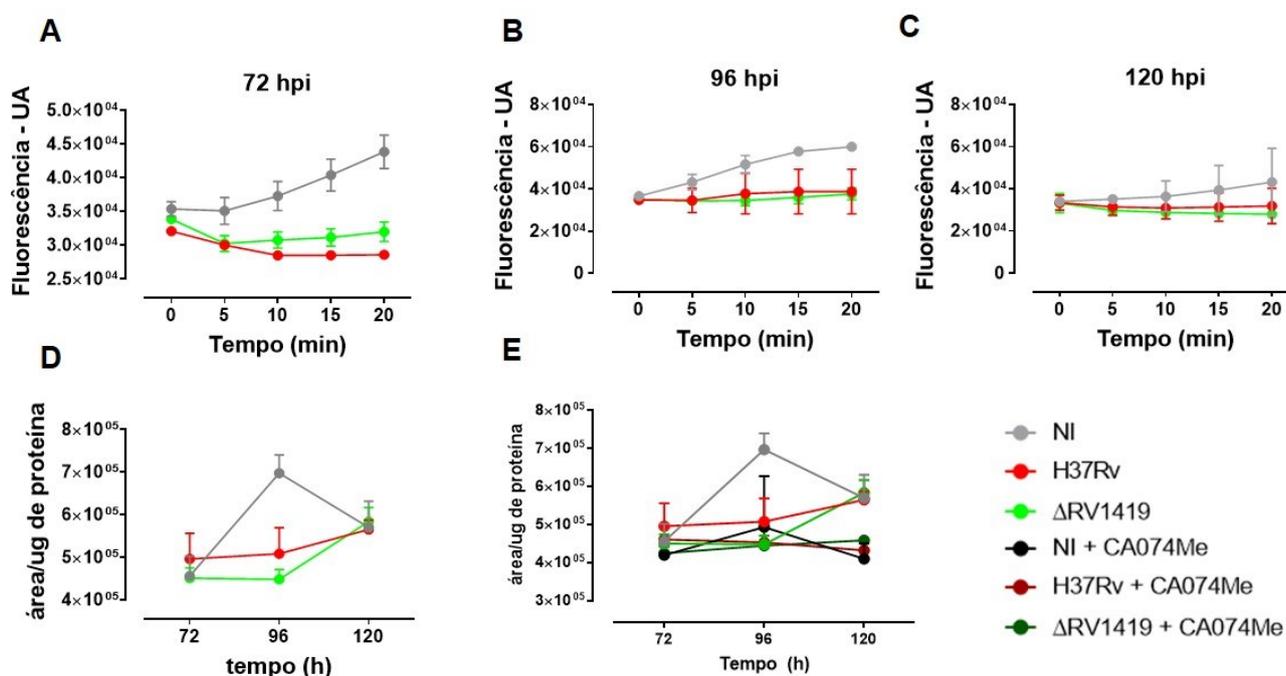


Figura 5 – Catepsina B é regulada negativamente durante a infecção e não depende de sMTL-13. Ensaio enzimático de Catepsina B mostrando o consumo de substrato pelo extrato celular exposto ou não a *Mtb* ao longo de 20 minutos. Em (A) 72 horas pós infecção (hpi), (B) 96 hpi e (C) 120 hpi. Resultados expressos em unidades arbitrárias (UA). (D) Gráfico representativo do consumo de substrato ao longo de 20 minutos de leitura normalizado por micrograma de proteína (E) Gráfico representativo do consumo de substrato de amostras tratadas ou não com Ca074Me (10 μ M) durante o ensaio *in vitro*. Dados representados por média e erro padrão da média (EPM).

tempos de infecção, foi avaliado se ainda havia inibição da catepsina. Os resultados obtidos (Figura 6A) mostram que o tratamento com o inibidor manteve a inibição da catepsina em até 120 horas.

Além disso, como controle interno da reação, foi feito tratamento de todas as amostras com Ca074Me a 10 μ M antes de incubar com o substrato (Figura 6A). E como resultado, pode-se constatar que ocorre uma redução da atividade da catepsina B nas amostras tratadas, indicando que a atividade enzimática observada anteriormente era específica para catepsina B.

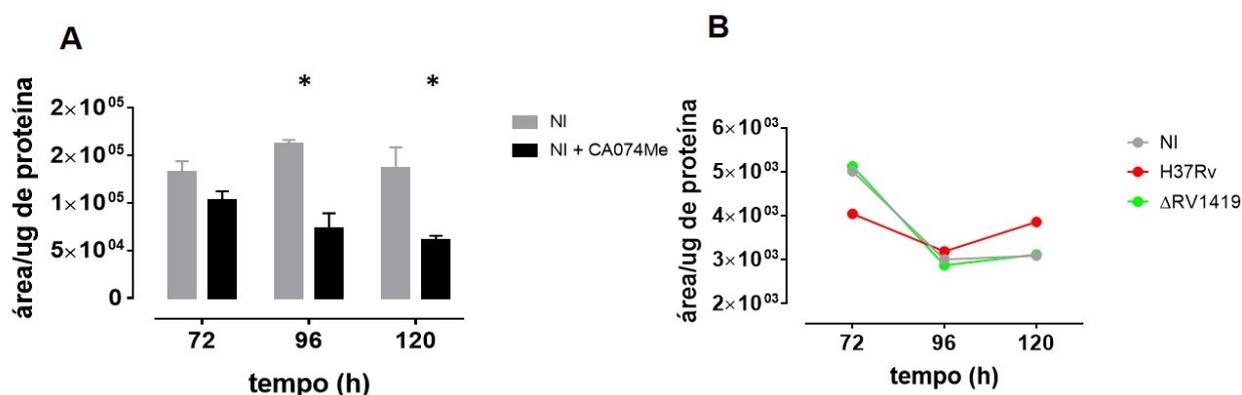


Figura 6 – Atividade enzimática de Catepsina B. (A) Gráfico representativo da área por microgramas de proteína de macrófagos não infectados, tratados ou não com Ca074Me em diferente tempos de cultura. (B) Gráfico representativo da atividade enzimática de catepsina B no sobrenadante de macrófagos que foram expostos ou não à *Mtb* (n =1). Dados representados por média e erro padrão da média (EPM). Estatística: Anova de duas vias seguido de pós teste de Tukey * p<0,05.

4.3. A CATEPSINA B NÃO ESTÁ ENVOLVIDA NA SOBREVIVÊNCIA DE *Mtb* DURANTE A INFECÇÃO.

Nosso próximo passo foi investigar se catepsina B influencia o crescimento intracelular de *Mtb*. Como essa é uma bactéria de crescimento intracelular e a sua replicação ocorre a cada 24 horas, espera-se observar o crescimento após 24 horas de infecção, sendo representado pelo aumento das unidades formadoras de colônia (UFC). O aumento das UFC com o tempo de infecção, geralmente, mostra o sucesso de *Mtb* como patógeno intracelular.

Como mostrado anteriormente (NOGUEIRA *et al.*, 2012), não há diferença entre o crescimento de *Mtb* H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos infectados (Figura 7A). Nesse contexto, pode-se observar que o bloqueio de catepsina B durante a infecção não afeta o crescimento de *Mtb* H37Rv (Figura 7B) e Δ Rv1419 (Figura 7C).

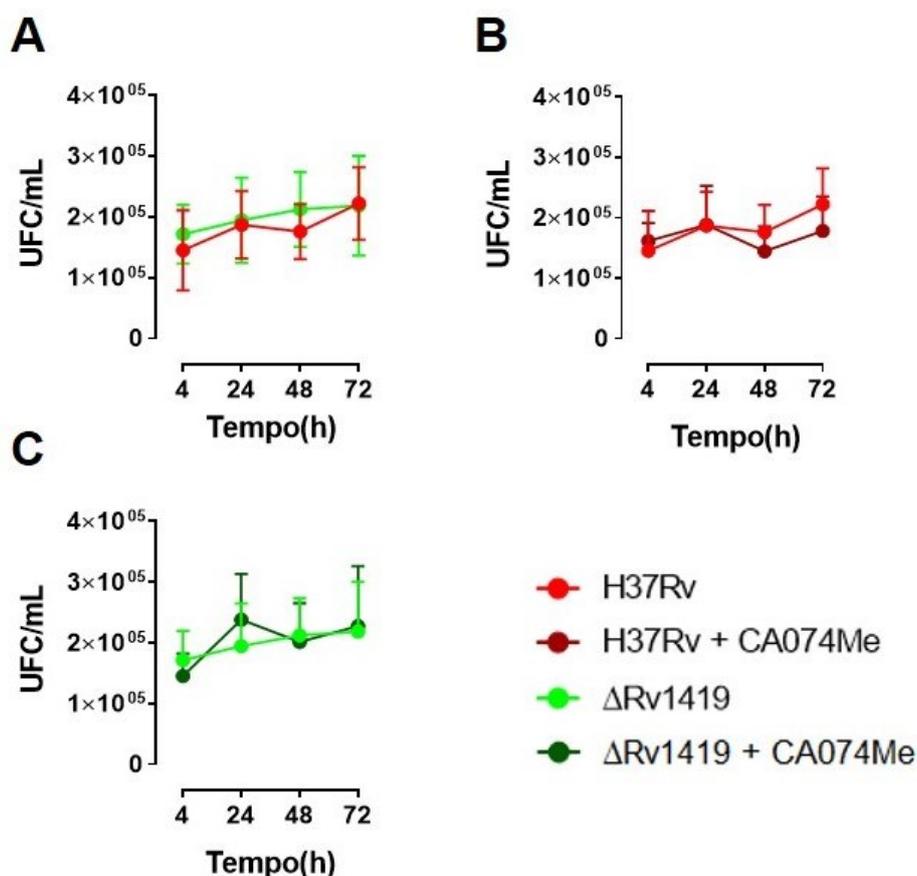


Figura 7 – Influência de Catepsina B no crescimento intracelular de *Mtb*. Gráfico de unidades formadoras de colônia (UFC) representando o crescimento intracelular de (A) *Mtb* H37Rv e Δ Rv1419 em macrófagos derivados de medula óssea (BMM). Gráficos de UFC mostrando a influência da Catepsina B no crescimento intracelular de *Mtb* (B) H37Rv e (C) Δ Rv1419 (MOI 1) em BMM. Gráficos representativos de 3 experimentos. Dados representados por média e EPM.

4.4. CATEPSINA B NÃO INFLUENCIA NA AUTOFAGIA DURANTE A INFECÇÃO POR *Mtb* H37RV

Como demonstrado no item 4.2, a catepsina B é modulada negativamente por *Mtb*. Assim nos questionamos se essa modulação, teria alguma consequência na

regulação da autofagia. Para responder a essa pergunta, foi realizado um pré tratamento com Ca074e (25 μ M) por duas horas e posteriormente feita a infecção em macrófagos com *Mtb* H37Rv. A seguir, avaliamos a conversão de LC3BI em LC3BII por western blot, 120 horas após infecção, visto que a conversão de LC3BI em LC3BII é usada como marcador da autofagia (KLIONSKY *et al.*, 2012). Com os dados obtidos (Figura 8), podemos observar que há uma redução de LC3BII durante a infecção, como esperado. Mas o tratamento com Ca074Me não afeta a quantidade de LC3BII, sugerindo que catepsina B não é capaz de regular a autofagia durante a infecção.

4.5. A SMTL-13 NÃO MODULA AUTOFAGIA

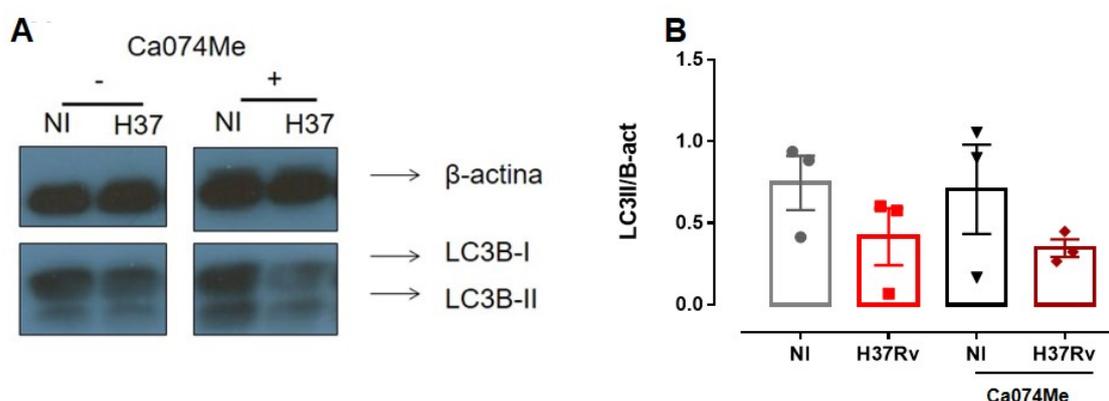


Figura 8 – Influência de Catepsina B na autofagia durante a infecção por *Mtb*. (A) Western-blot representativo de três experimentos para LC3B e β – actina, mostrando a conversão de LC3B em macrófagos expostos a *Mtb* (MOI 10) após 120 horas de infecção. (B) Gráfico da relação entre LC3II e a β – actina. Cada ponto é representativo de um experimento independente. O resultado está expresso em média por desvio médio padrão.

A autofagia, durante processos infecciosos, é um mecanismo de eliminação de patógenos intracelulares (SHARMA *et al.*, 2018). Como observamos anteriormente que há um envolvimento da autofagia no recrutamento de lamp-1 durante a infecção por *Mtb* Δ Rv1419, nosso próximo passo foi avaliar a influência de sMTL-13 na indução

da autofagia. Para isso, foi feita a infecção de macrófagos com *Mtb H37Rv* e *Mtb ΔRv1419* e avaliamos a conversão de LC3BI em LC3BII através da técnica de western Blot. Como resultado, esses dados (Figura 9) sugerem que sMTL-13 não participa na regulação negativa da autofagia durante a infecção por *Mtb*, visto que a infecção por *Mtb ΔRv1419* também consegue inibir a conversão de LC3BI para LC3II (Figura 9A).

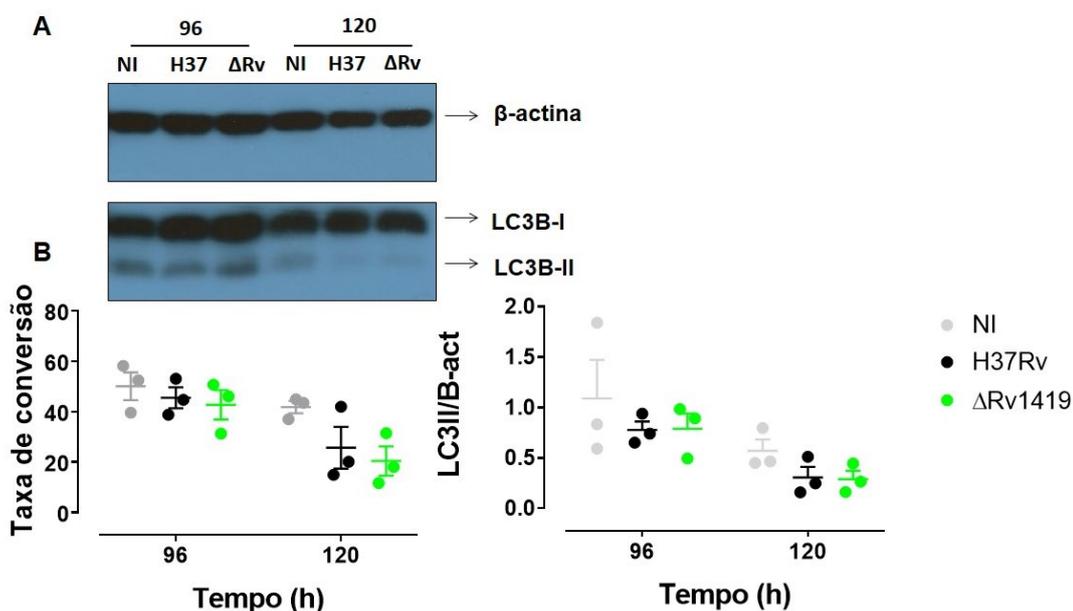


Figura 9 – Regulação da autofagia por sMTL-13. (A) Western-blot representativo de três experimentos para LC3B e β – actina, mostrando a conversão de LC3B em macrófagos expostos a *Mtb* (MOI 10) após 96 e 120 horas de infecção. (B) Gráfico representando a taxa de conversão (razão da área de LC3B-II pelo total de LC3B) e a relação entre LC3II e a β – actina. Cada ponto é representativo de um experimento independente. O resultado está expresso em média por desvio médio padrão.

4.6. EXPRESSÃO GÊNICA DE PROTEÍNAS ASSOCIADAS A AUTOFAGIA

Como observamos, a infecção por *Mtb ΔRv1419* necessita de proteínas GBP para recrutar lisossomos em 72 horas de infecção (Figura 4), mas que não está envolvida na conversão de LC3BI em LC3BII (Figura 9), nós questionamos se haveria

outros pontos de regulação que estariam desvinculados da conversão de LC3BI. Assim, com o transcriptoma de macrófagos infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, avaliamos os genes envolvidos tanto na xenofagia e seus reguladores quanto na autofagia mediada por chaperonas. Dessa forma, analisamos os genes de macrófagos infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 em diferentes tempos de infecção.

Com esse resultado (Figura 10), podemos observar que a infecção por Mtb regula negativamente a transcrição dos genes autofágicos nas primeiras 6 horas de infecção, no entanto, esse feito é revertido 24 horas após a infecção. Junto a isso, observamos que a ausência da sMTL-13 não apresenta envolvimento nessa transcrição. Essa análise sugere que há um estímulo para que a maquinaria autofágica seja mobilizada e para tal, um gene em específico chama a atenção por ter uma diferença entre a infecção por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, o NDP52, que NDP52 é uma proteína adaptadora que reconhece cargas ubiquitinadas e sinaliza para o complexo ULK1 iniciar a autofagia (BOYLE; RAVENHILL; RANDOW, 2019; LAZAROU *et al.*, 2015). A redução na ausência de sMTL-13 e sugere-se que essa proteína possa modular o início da autofagia. Os dados estão expressos em Z para baixo (-2) em relação à média do grupo (Figura 9).

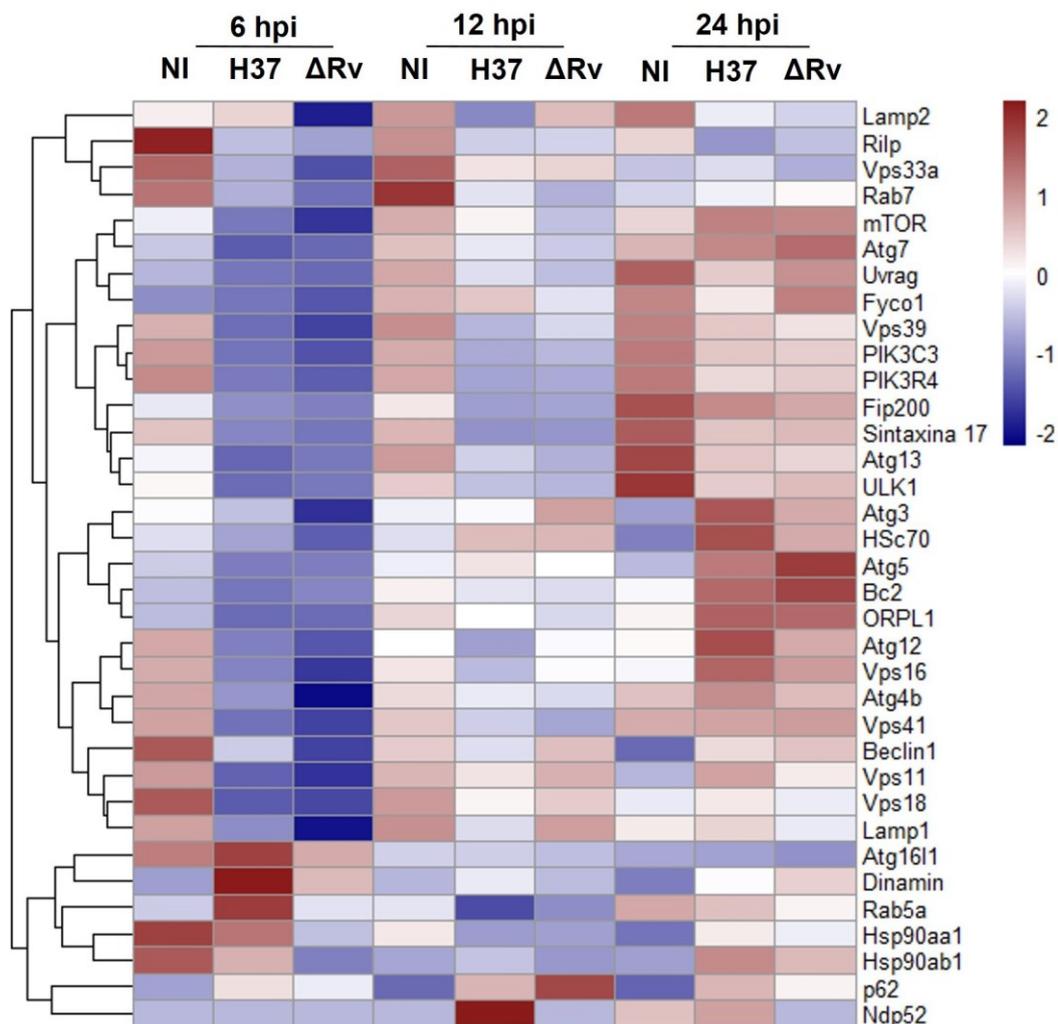


Figura 10 – Expressão gênica de proteínas relacionadas com a autofagia. Heatmap representativo da expressão gênica de genes relacionados a autofagia em 6,12 e 24 horas pós infecção por *Mtb* H37Rv e *Mtb* ΔRv1419 (MOI 10). Resultado expresso em Z score e representativo de 2 experimentos independentes.

4.7. O RECRUTAMENTO DE LISOSSOMOS É INDEPENDENTE DE CATEPSINA B

Uma vez que já foi demonstrado que a catepsina B pode atuar na regulação negativa da biogênese de lisossomos (QI *et al.*, 2016) e ainda pode interagir com SMTL-13 (PENN *et al.*, 2018), nos questionamos da possibilidade da catepsina B ser

responsável pela redução da intensidade de lamp-1, observado na infecção pela Mtb H37Rv.

Para responder a essa pergunta, os macrófagos foram pré-tratados com CA074Me por 2 horas e posteriormente foi feita a infecção com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 e avaliamos o recrutamento de lamp-1, sinalizando lisossomos, por imunofluorescência 120 horas após a infecção. Com esses resultados (Figura 11), podemos observar que as células infectadas por Mtb H37Rv e tratadas com o inibidor (CA074Me) possui menos intensidade de fluorescência que a infecção com células não tratadas. E, em paralelo, o mesmo fenótipo é observado na infecção por Mtb Δ Rv1419, onde ocorreu a redução da intensidade de fluorescência (Figura 11B). Esse conjunto de dados sugere que a Catepsina B é importante para o recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb H37Rv, sendo esse, independente de sMTL-13.

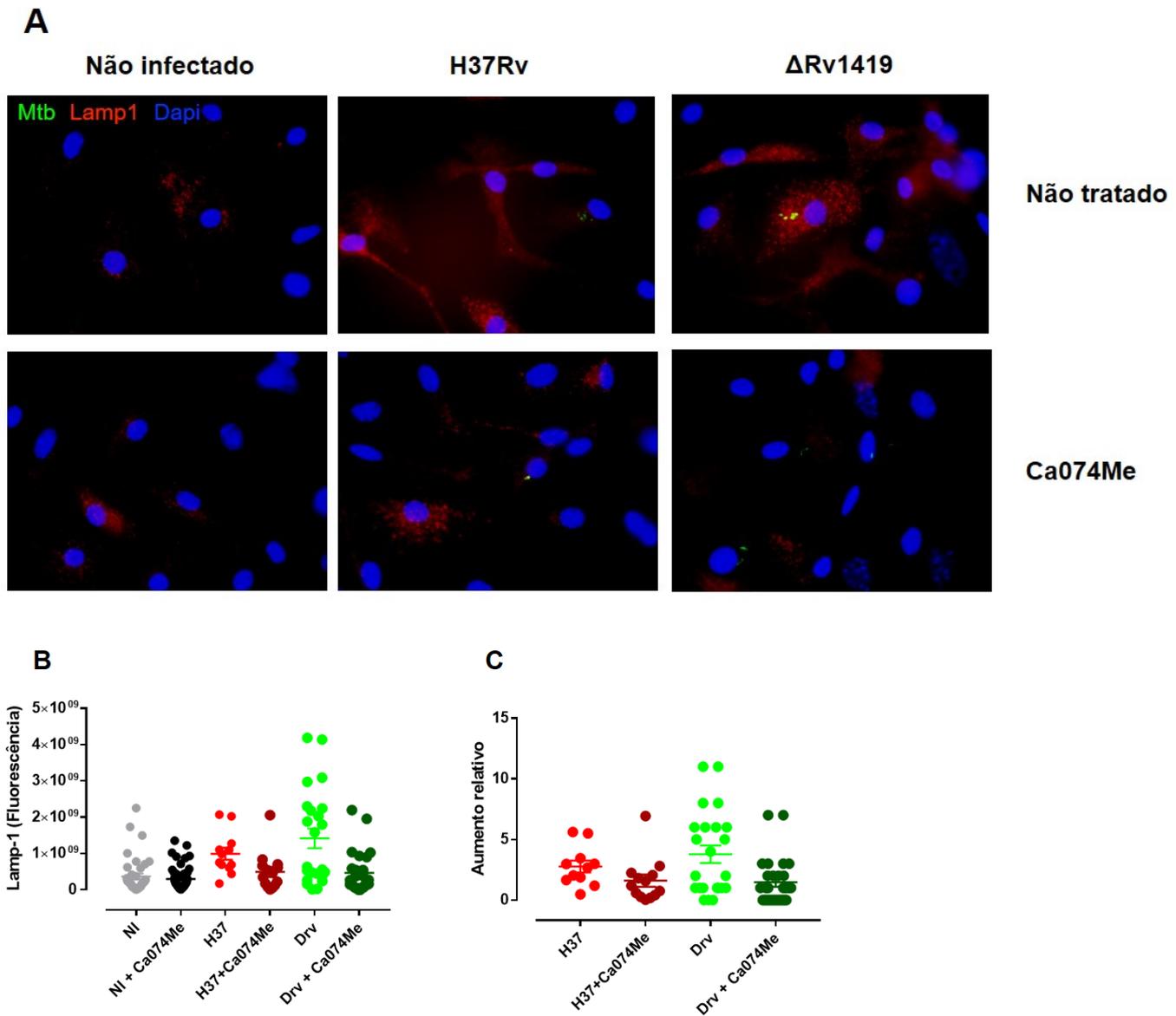


Figura 11 – Influência de Catepsina B no recrutamento de lisossomos. (A) Fotos representativas da imunofluorescência de macrófagos não expostos e expostos a *Mtb* (MOI 10) com ou sem pré tratamento com Ca074Me (25 μ M). Em vermelho está marcando Lamp-1 com AlexaFluor 568, em verde *Mtb* marcada com Syto24 e em azul, o núcleo marcado com Dapi. **(B)** Gráfico referente as quantificações da intensidade de Fluorescência no Software ImageJ de células infectadas. Cada ponto representa uma célula infectada. Quanto ao não infectado, foi contabilizado intensidade de Lamp-1 de todas as células. **(C)** Gráfico referente ao aumento relativo da intensidade de fluorescência nas células infectadas em relação ao não infectado. Foi feito uma média da intensidade das células não infectadas para comparação. Ambos estão representados por média com o desvio padrão médio.

4.8. CATEPSINA B ESTÁ ENVOLVIDA NA LIBERAÇÃO DE TNF- α DURANTE A INFECÇÃO POR *Mtb*

Resultados prévios, demonstraram que a secreção de TNF- α é prejudicada na ausência de sMTL-13 (Figura 12A), e junto, observamos que a atividade da catepsina B é reduzida durante a infecção. Dessa forma, surgiu a dúvida sobre a possível relação da secreção de TNF- α com a atividade da catepsina B. Nós observamos uma tendência de redução da liberação de TNF- α durante a infecção pela H37Rv com a utilização do inibidor e isso, não foi observado durante a infecção pela Δ Rv1419 (Figura 12A). Esses dados sugerem que a regulação na liberação do TNF- α pela sMTL-13 pode ser devido a uma interação com a catepsina B.

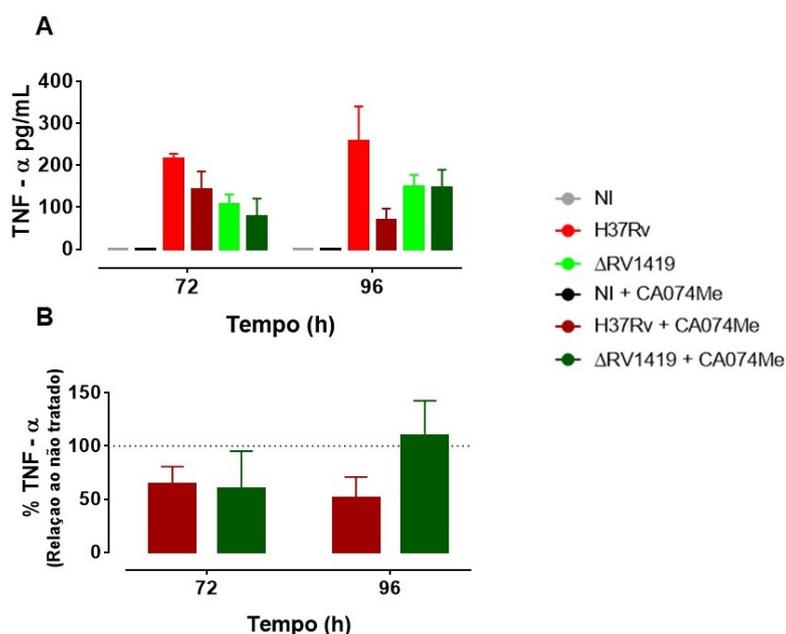


Figura 12 – Influência de Catepsina B na secreção de TNF- α durante a infecção por *Mtb*. (A) Gráfico representativo da secreção de TNF- α por macrófagos tratados ou não com CA074Me (25 μ M) e expostos a *Mtb* (MOI10) por 72 e 96 horas. (B) Gráficos representativo do mesmo experimento. Representado em porcentagem da amostra tratada em relação ao respectivo controle, mostrando o impacto do tratamento com CA074Me (25 μ M). Dados de 3 experimentos independentes e representados por média com o desvio padrão da média.

5. DISCUSSÃO

A xenofagia é responsável pela degradação de patógenos intracelulares, para manutenção da homeostasia celular. No entanto patógenos bem sucedidos como *Listeria monocytogenes* e *Shigella flexneri* são capazes de evadir dessa maquinaria (DONG *et al.*, 2012; DORTET; MOSTOWY; COSSART, 2012). Esse processo também ocorre durante a infecção por Mtb (ZARELLI; GIAI; COLUMBO, 2015). Dessa forma, durante a infecção de macrófagos, esse bacilo consegue evadir-se da resposta vesicular, indo para o citosol (Simeone, et al., 2015) e, como resultado, a célula inicia o processo de autofagia. No entanto é descrito que a bactéria pode inibir esse processo, ao induzir miR-30A, um miRNA capaz de regular negativamente Beclin e Atg5 (CHEN *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2012). Assim, como a formação do autofagossomo é prejudicada, não ocorrerá fusão com o lisossomo e consequentemente não há o recrutamento dessa vesícula.

O presente trabalho demonstrou que Mtb H37Rv falha em acumular lisossomos em 72 horas de infecção, representado por recrutamento de Lamp1. E a ausência das proteínas GBP, importantes na indução da autofagia (KIM *et al.*, 2011), não influenciam nesse acúmulo, visto que não há diferença no recrutamento de Lamp-1 durante a infecção de células selvagens e deficientes para GBP. Em contrapartida, como observado anteriormente, a deficiência de sMTL-13 induz o acúmulo de lisossomos que corrobora com os dados de Mascarin e colaboradores (dados não publicados). No entanto, o mecanismo pelo qual isso acontece ainda é desconhecido. E também, a ausência de GBP durante a infecção por Δ Rv1419 impede o acúmulo de lisossomos, sugerindo que este recrutamento pela Mtb Δ Rv1419 é um processo dependente da autofagia. Assim, no contexto da infecção por Mtb H37Rv, podemos dizer que as proteínas GBP não são importantes para a progressão da infecção.

Adicionalmente, foi observado por Penn e colaboradores (2018) que a sMTL-13 pode interagir com catepsina B, *in vitro*. A respeito dessa enzima, é descrito que catepsina B pertence à família das papaínas, sendo então uma endopeptidase com funções catalíticas e não catalíticas. Sua principal função é a degradação do conteúdo intra-lisossomal. Além disso, já foi demonstrado que a mesma está relacionada com a regulação da autofagia durante a infecção por *F. novicida* (QI, *et al.*, 2016). Na última década, a classe das catepsinas vem sendo associada ao sistema imunológico, como

por exemplo, na progressão do câncer de mama (SEVENICH *et al.*, 2010) e, principalmente, com o processamento de antígenos para apresentação para células T (MATSUNAGA *et al.*, 1993). Em vista disso, como macrófagos são células fagocíticas e apresentadoras de antígeno, questionou-se a catepsina B estaria implicada na regulação de eventos intracelulares durante a infecção por Mtb. Os resultados deste trabalho mostraram que a atividade da Catepsina B é reduzida durante a infecção por Mtb, ao comparar com macrófagos não infectados, porém esse efeito não apresenta influência da sMTL-13. Tais achados corroboram com dados obtidos por Pires e colaboradores (2016), no qual demonstraram que a atividade da Catepsina B em macrófagos humanos expostos ao Mtb é reduzida. Contudo, Amaral e colaboradores mostram que a atividade da Catepsina B é aumentada no pulmão de camundongos infectados por Mtb. Isso se deve a abordagem experimental, visto que Pires e colaboradores (2016) avaliaram a atividade apenas do extrato celular e Amaral e colaboradores (2016) avaliaram a atividade no tecido pulmonar, o que leva em consideração apenas a presença da enzima no meio extracelular. Também, foi observado que Catepsina B pode estar presente no meio extracelular durante tumores e pode estar correlacionada com a progressão da doença (PREMZL *et al.*, 2003; SEVENICH *et al.*, 2010).

Tendo em vista a possibilidade de uma atividade extracelular, hipotetizou-se que ocorreria o aumento da atividade de catepsina B no sobrenadante das células expostas a Mtb, comparada com as células não infectadas, corroborando com Pires e colaboradores (2016), de forma que a redução fosse devido a saída da catepsina B. Assim, ao se avaliar a atividade enzimática de catepsina B no sobrenadante dessas células, observamos que não há diferença na atividade enzimática entre o sobrenadante das células expostas ou não à Mtb. Por isso, não é possível concluir se há ou não saída da catepsina neste modelo. Mas podemos sugerir que ocorra a saída da catepsina B das células e que, neste modelo, podem ter sido inativada pelo pH no meio extracelular, impedindo a detecção desta diferença.

Em relação ao recrutamento de lamp-1 pela Mtb $\Delta Rv1419$, é possível que o acúmulo de lisossomos na ausência de sMTL-13 e a falha do acúmulo na presença do inibidor seja devido a um crescimento diferenciado entre as bactérias tratadas e não tratadas. Em vista disso, foi feito a contabilização das bactérias intracelulares em

macrófagos tratados ou não com a Ca074Me em diversos tempos de infecção. Como já observado por Nogueira e colaboradores (2012), não há diferença entre o crescimento da bactéria selvagem e deficiente para sMTL-13 (Δ Rv1419) durante a infecção com macrófagos. Foi possível observar também, que a catepsina B não influencia no crescimento de Mtb em macrófagos, o que vai contra o observado por Pires e colaboradores (2016). Isso pode ser devido ao modelo utilizado, visto que Pires e colaboradores utilizaram macrófagos humanos derivados do sangue periférico e o nosso modelo foi de macrófagos murinos derivados de medula óssea.

A fim de estabelecer se, durante a infecção por Mtb, a catepsina B regula a autofagia, infectamos macrófagos com Mtb H37Rv e avaliamos a conversão de LC3BI em LC3BII, pois é usada para avaliar a autofagia (KLIONSKY *et al.*, 2012). A conversão dessa molécula ocorre através da clivagem por Atg4 que expõe o sítio para lipidação por PE e isso acontece apenas sob um estímulo autofágico (KIRISAKO *et al.*, 1999; SATOO *et al.*, 2009). Nessa situação, observamos que ocorre regulação negativa da autofagia durante a infecção pela Mtb H37Rv sendo o esperado visto que a bactéria consegue prevenir a formação do autofagossomo. Entretanto, catepsina B não está envolvida neste processo, visto que não afeta a quantidade de LC3BII durante a infecção.

Apesar de não haver envolvimento da catepsina B na regulação da autofagia durante a infecção, ainda havia o questionamento se sMTL-13 apresentaria algum papel na regulação negativa da autofagia, durante a infecção por Mtb. Em princípio, para avaliar se poderia ocorrer uma regulação inicial, à nível transcricional, fez-se uma análise do RNAseq de macrófagos expostos a Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, em diferentes tempos de exposição. Como alvo dessa análise, foram escolhidos genes relacionados à maquinaria autofágica. Observamos que nas primeiras 6 horas de infecção, ocorre uma regulação negativa desses genes, o que pode estar relacionado com a fagocitose, visto que este processo utiliza organelas comuns à autofagia, como os lisossomos (DERETIC, 2008). Além disso, em 12 e 24 horas, não se observa regulação da transcrição dos genes entre a infecção por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, sugerindo que sMTL-13 não está envolvida neste processo, com exceção de um gene, o NDP52. É um receptor autofágico que reconhece cargas ubiquitinadas e sinaliza para o complexo ULK1 iniciar a autofagia (VON MUHLINEN *et al.*, 2010). Em razão disso, a regulação positiva na transcrição deste gene, na presença de sMTL-13, pode

sugerir que sMTL-13 é reconhecida pela célula e sinaliza uma via para contenção do patógeno, como a autofagia.

Apesar da catepsina B não interferir na autofagia, ainda não se estabeleceu qual a relação de sMTL-13 na regulação da autofagia. Para isso foi feita a marcação para LC3B em amostras de células expostas ou não à *Mtb H37Rv* e *Mtb ΔRv1419* em 96 e 120 horas de infecção. Podemos observar que há uma redução da conversão de LC3BI durante a infecção em 120 horas pós infecção em relação ao não infectado. A conversão de LC3BI nos macrófagos não estimulados pode ser devido ao tempo em que as células ficaram em cultura sem troca de meio e isso reforça mais ainda que *Mtb* é capaz de regular negativamente a autofagia. Todavia, não há diferença na conversão de LC3BI em LC3BII durante a infecção por *Mtb H37Rv* e *Mtb ΔRv1419*. Esses dados sugerem que a regulação da autofagia não está relacionada a sMTL-13 e que o recrutamento de lisossomos feito durante a infecção por *Mtb ΔRv1419* não está relacionada a xenofagia.

Apesar da literatura considerar a conversão de LC3B como marcador para autofagia, essa molécula está associada a um outro fenômeno, a fagocitose mediado por LC3 (LAP, do inglês *LC3 associated phagocytosis*) (HECKMANN; GREEN, 2019). Entretanto, no nosso modelo este fenômeno não foi considerado visto que foi avaliado em 120 horas após a infecção e o processo de fagocitose ocorre nas primeiras horas do contato da bactéria com a célula. Ainda, como as infecções foram feitas em MOI 1, considerado baixo, foi descartado a possibilidade de morte celular e uma possível reentrada da bactéria em outra célula. Assim, considerando-se essas informações, a redução da conversão de LC3B em 120 horas de infecção por *Mtb* é, sim, indicativo de inibição do início da autofagia.

A conversão de LC3BI em LC3BII indica que a formação do autofagossomo está sendo finalizada (MIZUSHIMA; TAMOTSU; LEVINE, 2010). Então, apesar de sMTL-13 poder ser reconhecida e induzir o aumento da transcrição de NDP52, existem outros mecanismos que impedem a progressão da autofagia (ANDERSSON *et al.*, 2016; CHANDRA; KUMAR, 2016), por isso não foi possível visualizar a conversão de LC3B durante a infecção. Entretanto, podemos sugerir que a macroautofagia não está diretamente relacionada com o recrutamento de lisossomos observados durante a infecção por *Mtb ΔRv1419*. Em contrapartida, já foi demonstrado que conteúdos

ubiquitinados podem ser endereçados para degradação diretamente no lisossomo, de forma dependente de chaperonas (KAUSHIK; CUERVO, 2008). Também, já foi demonstrado que Mtb sofre ubiquitinação (FRANCO *et al.*, 2017). Portanto, é possível sugerir que o controle feito por sMTL-13, no recrutamento de lisossomos, pode estar relacionado ao processo de autofagia mediado por chaperonas.

Conseguimos concluir que a catepsina B e a sMTL-13 não estão envolvidas na regulação negativa da autofagia durante a infecção por Mtb. No entanto, ainda há a possibilidade de catepsina B estar relacionada com o recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb Δ Rv1419. Então para estabelecer essa possível correlação, foi feita a infecção de macrófagos com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, pré tratados com Ca074Me, e avaliado o acúmulo de lisossomos através da marcação por lamp-1 em 120 horas após infecção. Com isso, podemos observar que a catepsina B aumenta o recrutamento de lisossomos durante a infecção. Logo, neste modelo, podemos sugerir que catepsina B e sMTL-13 não estão relacionadas.

O aumento de lisossomos induzido por catepsina B durante a infecção por Mtb não significa que o lisossomo está funcional, visto que já foi demonstrado que catepsina B pode inibir a atividade de TRPML1, um canal permeável a cálcio, presente na membrana do lisossomo e importante para a fusão com o fagossomo (DAYAM *et al.*, 2015; QI *et al.*, 2016). Além disso, foi mostrado que Mtb consegue impedir a acidificação de lisossomos, deixando-os disfuncional e impedindo a eliminação da bactéria. Assim, a presença de lisossomos não significa que está ocorrendo controle da infecção, pois os lisossomos presentes durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 podem não apresentar proteínas funcionais devido à não acidificação do lisossomo induzida por Mtb. Isso explicaria o porquê de não haver diferença no crescimento entre Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 (NOGUEIRA, 2012).

Apesar da catepsina B não estar relacionada com o recrutamento de lisossomos, poderia ainda estar relacionada com a redução da secreção de TNF- α durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 (MORALES, 2014), uma vez que já foi demonstrado que macrófagos estimulados com LPS possuem secreção de TNF- α dependente da atividade de catepsina B (HA *et al.*, 2008). Ao analisar o sobrenadante de células tratadas ou não com inibidor de catepsina B expostas ou não à Mtb conseguimos observar que a secreção de TNF- α dependente de sMTL-13 também depende de catepsina B. Com isso, é possível sugerir que catepsina B consegue

modular o tráfego de vesículas e, conseqüentemente, a secreção de TNF- α . É possível sugerir, também, que a regulação negativa que sMTL-13 faz sobre o acúmulo de lisossomos em tempos tardios de infecção não está relacionada com a secreção de TNF- α dependente de sMTL-13.

Mtb como um patógeno intracelular bem sucedido desenvolveu estratégias para evasão do sistema imunológico, desde mecanismos que modulam vias intracelulares, como a indução de IFN tipo I (DOMINGO-GONZALEZ *et al.*, 2016) e estratégias que facilitam a disseminação durante a infecção *in vivo* (PETHE *et al.*, 2001). Uma das estratégias desenvolvidas é a capacidade das bactérias sobreviverem no citoplasma, e, para isso, é necessário a inibição da autofagia.

O presente trabalho mostrou que a regulação negativa da autofagia durante a infecção por Mtb é independente de sMTL-13 e catepsina B. Ainda que a secreção de TNF- α dependente de sMTL-13 também depende de catepsina B. Como já foi demonstrado que, redução da secreção de TNF- α é devido a disfunção do tráfego vesicular (dados não publicados) é possível que Catepsina B tenha um papel regulatório neste tráfego. O presente trabalho não estabeleceu a correlação direta com o acúmulo de endossomos. Como a regulação negativa de lisossomos feito por sMTL-13 em tempos tardios de infecção é independente de catepsina B, sugerimos que a regulação do tráfego das vesículas é um processo independente da regulação do acúmulo de lisossomos em tempos tardios de infecção. Assim, sugerimos que sMTL-13 possui diversos papéis importantes durante a infecção, mas são necessários mais estudos.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou que o recrutamento de lisossomos durante a infecção por Mtb é dependente de catepsina B, mas não está relacionado com a regulação que sMTL-13 faz. E ainda, a liberação de TNF- α dependente de sMTL-13 tem participação de catepsina B. Esses dados sugerem que o controle que sMTL-13 faz sobre a liberação de TNF- α é independente do acúmulo de lisossomos.

7. ANEXO

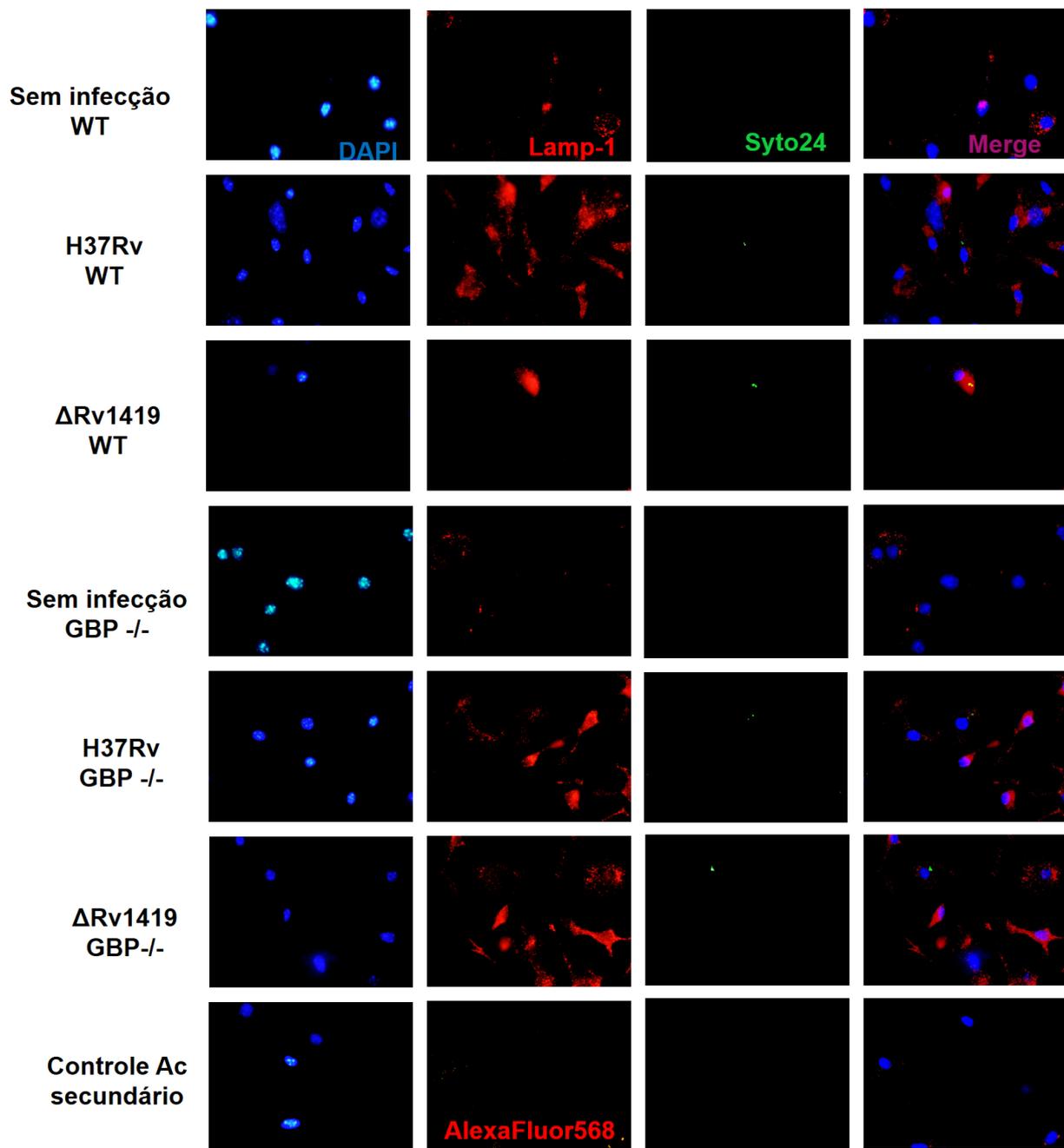


Figura 13 – Influência de GBP no recrutamento de lisossomos durante a infecção por *Mtb* 2. Fotos representativas de cada canal, em azul representando o Dapi para marcação de núcleo, em vermelho marcação de Lamp-1 com AlexaFluor568, em verde Syto24 representando a bactéria. A última coluna representa os merges das imagens feito no ImageJ.

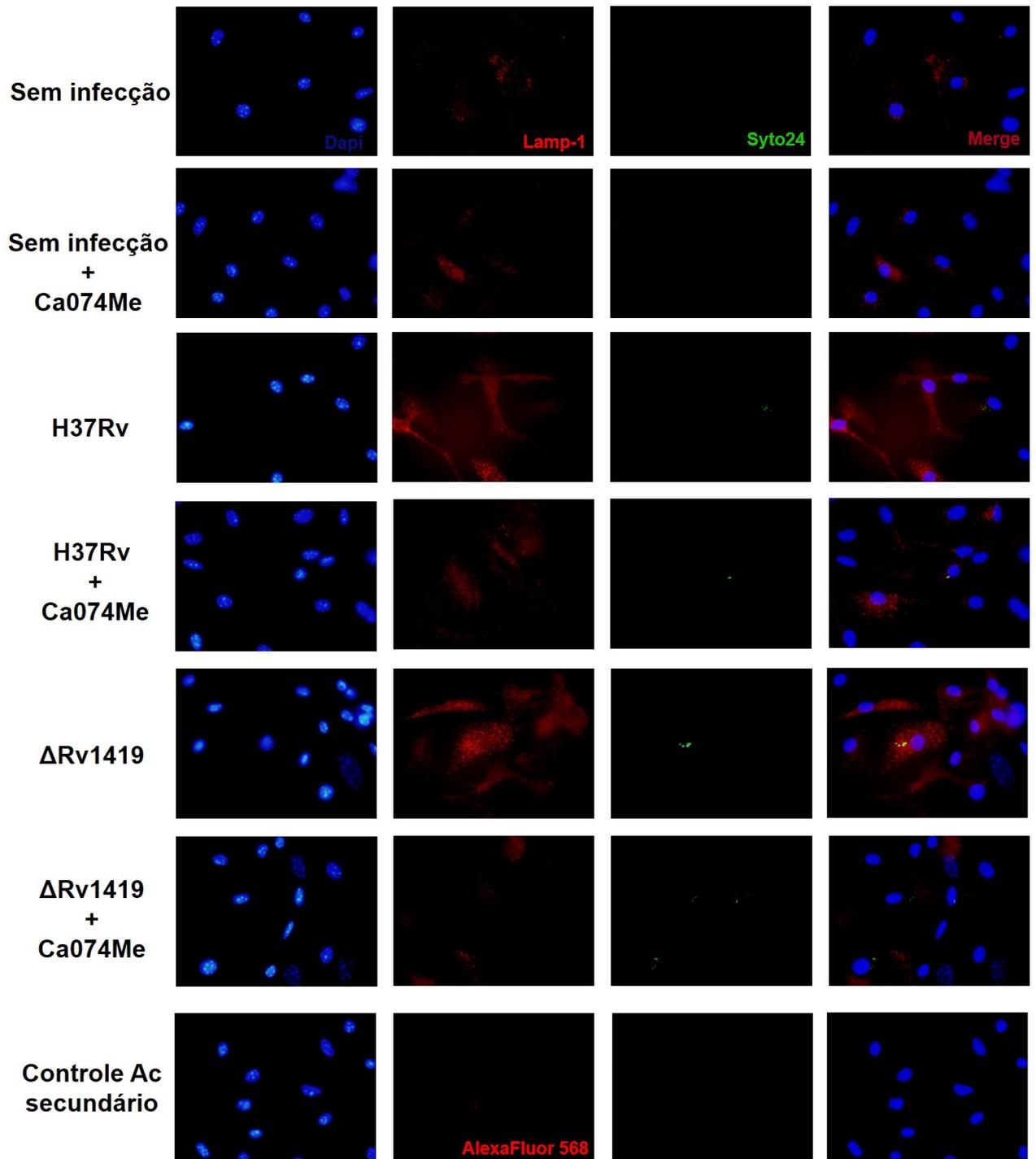


Figura 14 – Influência de Catepsina B no recrutamento de lisossomos durante a infecção por *Mtb* 2. Fotos representativas de cada canal, em azul representando o Dapi para marcação de núcleo, em vermelho marcação de Lamp-1 com AlexaFluor568, em verde Syto24 representando a bactéria. A última coluna representa os merges das imagens feito no ImageJ.

8. REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Abdallah M. *et al.* Type VII secretion — mycobacteria show the way. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 883–891, 1 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro1773>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

ANDERSSON, Anna-Maria *et al.* Autophagy induction targeting mTORC1 enhances *Mycobacterium tuberculosis* replication in HIV co-infected human macrophages. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 28171, 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/srep28171>>.

ANIENITO, Fernando *et al.* Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 14, p. 10463–10470, 1993.

ASHRAFI, G.; SCHWARZ, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, v. 20, n. 1, p. 31–42, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.81>>.

ASTARIE-DEQUEKER, C *et al.* The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infection and immunity*, v. 67, n. 2, p. 469–77, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9916047>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

BACH, Horacio *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* Virulence Is Mediated by PtpA Dephosphorylation of Human Vacuolar Protein Sorting 33B. *Cell Host and Microbe*, v. 3, n. 5, p. 316–322, 2008.

BAFICA, Andre *et al.* TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 202, n. 12, p. 1715–1724, 2005.

BELLU, Anna Rita *et al.* Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes. *FEMS Yeast Research*, v. 1, n. 1, p. 23–31, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702460>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

BOYLE, Keith B.; RAVENHILL, Benjamin J.; RANDOW, Felix. CALCOCO2/NDP52 initiates selective autophagy through recruitment of ULK and TBK1 kinase complexes. *Autophagy*, v. 0, n. 00, p. 1–2, 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2019.1628548>>.

BRAUNSTEIN, M. *et al.* Two Nonredundant SecA Homologues Function in Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 24, p. 6979–6990, 15 dez. 2001. Disponível em: <<http://jb.asm.org/cgi/doi/10.1128/JB.183.24.6979-6990.2001>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

BRENNAN, P. J. The Envelope of Mycobacteria. *Annual Review of Biochemistry*, v. 64, n. 1, p. 29–63, 1995.

BRIKEN, Volker *et al.* Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: From biogenesis to modulation of the immune response. *Molecular Microbiology*, v. 53, n. 2, p. 391–403, 2004.

BURMAN, Chloe; KTISTAKIS, Nicholas T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Letters*, v. 584, n. 7, p. 1302–1312, 2010.

CECCONI, Francesco; LEVINE, Beth. The Role of Autophagy in Mammalian Development. *Dev Cell.*, v. 15, n. 3, p. 344–357, 2009.

CHANDRA, Pallavi; KUMAR, Dhiraj. Selective autophagy gets more selective: Uncoupling of autophagy flux and xenophagy flux in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *Autophagy*, v. 12, n. 3, p. 608–609, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1139263>>.

CHEN, Zhi *et al.* Inhibition of autophagy by MiR-30A induced by Mycobacteria tuberculosis as a possible mechanism of immune escape in human macrophages. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, v. 68, n. 5, p. 420–424, 2015.

CHIEPPA, Marcello *et al.* Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *The Journal of Immunology*, v. 171, n. 9, p. 4552–4560, 1 nov. 2003. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.171.9.4552>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

CHOY, Augustine *et al.* The Legionella Effector RavZ Inhibits Host Autophagy Through Irreversible Atg8 Deconjugation. *Science*, v. 338, n. 6110, p. 10725–1076, 2012.

COOK, Gregory M. *et al.* Physiology of Mycobacteria. [S.l: s.n.], 2009. p. 81–319. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065291109055027>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

CRESPO, L *et al.* RTG1 , and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 10, p. 6784–6789, 2002.

CUERVO, Ana Maria. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, v. 21, n. 3, p. 142–150, 2010.

CUERVO, Ana Maria; DICE, J. Fred. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*, v. 273, n. 5274, p. 501–503, 1996.

CUMMINGS, RD; MC EVER, RP. C-type Lectins Essentials of Glycobiology 2 nd edition. *Essentials of Glycobiology 2 nd edition*. [S.l: s.n.], 2009. v. 2. .

DAWALIBY, Rosie; MAYER, Andreas. Microautophagy of the Nucleus

Coincides with a Vacuolar Diffusion Barrier at Nuclear-Vacuolar Junctions. *Molecular Biology of the Cell*, v. 21, p. 4173–4183, 2010. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E09>>. Acesso em: 28 jun. 2019.

DAYAM, Roya M. *et al.* The Phosphoinositide-Gated Lysosomal Ca²⁺ Channel, TRPML1, Is Required for Phagosome Maturation. *Traffic*, v. 16, n. 9, p. 1010–1026, 2015.

DE CASTRO, MAG; BUNT, G; WOUTERS, FS. Cathepsin B launches an apoptotic exit effort upon cell death-associated disruption of lysosomes. *Cell Death Discovery*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.12>>.

DERETIC, Vojo. Autophagosome and Phagosome. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. [S.l.: s.n.], 2008. v. 445. p. 1–10. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18425440>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

DHANDAYUTHAPANI, S. *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. *Molecular Microbiology*, v. 17, n. 5, p. 901–912, 1995.

DICE, Fred. Chaperone-mediated autophagy. *Landes Bioscience*, v. 3, p. 295–299, 2007.

DICE, Fred. Protein sequence motifs involved in recognition and targeting: a new series. *Trends in Biochemical Science*, v. 15, p. 305–309, 1990.

DOMINGO-GONZALEZ, Racquel *et al.* Cytokines and Chemokines in Mycobacterium tuberculosis infection. *Microbiology Spectrum*, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5205539/pdf/nihms836872.pdf>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

DONG, Na *et al.* Structurally distinct bacterial TBC-like GAPs link Arf GTPase

to Rab1 inactivation to counteract host defenses. *Cell*, v. 150, n. 5, p. 1029–1041, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.050>>.

DORTET, Laurent; MOSTOWY, Serge; COSSART, Pascale. Listeria and autophagy escape: Involvement of InlK, an internalin-like protein. *Autophagy*, v. 8, n. 1, p. 132–134, 2012.

DUAN, Liang *et al.* Mycobacterium tuberculosis EIS gene inhibits macrophage autophagy through up-regulation of IL-10 by increasing the acetylation of histone H3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 473, n. 4, p. 1229–1234, 13 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27079235>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

DUNN, William A. *et al.* Pexophagy: The Selective Autophagy of Peroxisomes. *Autophagy*, v. 1, n. 2, p. 75–83, 2005.

EPPLE, U. D. *et al.* Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 20, p. 5942–5955, 2001.

ESMAIL, H. *et al.* The ongoing challenge of latent tuberculosis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1645, p. 20130437–20130437, 12 maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24821923>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FELTCHER, Meghan E; SULLIVAN, Jonathan Tabb; BRAUNSTEIN, Miriam. Protein export systems of Mycobacterium tuberculosis: novel targets for drug development? *Future Microbiology*, v. 5, p. 1581–1597, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3034451/pdf/nihms268051.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2018.

FOGEL, Nicole. Tuberculosis: A disease without boundaries. *Tuberculosis*, v.

95, n. 5, p. 527–531, set. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198113>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FORRELLAD, Marina A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3–66, 27 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23076359>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FRANCO, Luis H *et al.* The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of *Mycobacterium tuberculosis* and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell host & microbe*, v. 21, n. 1, p. 59–72, 11 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28017659>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

FURUYA, Norihiko *et al.* The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*, v. 1, n. 1, p. 46–52, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16874027>>.

GENG, Jiefei; KLIONSKY, Daniel J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” Review Series. *EMBO Reports*, v. 9, n. 9, p. 859–864, 2008.

GOMES, Ligia C.; DIKIC, Ivan. Autophagy in antimicrobial immunity. *Molecular Cell*, v. 54, n. 2, p. 224–233, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.009>>.

GUICCIARDI, M. Eugenia *et al.* Cathepsin B contributes to TNF- α -mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *Journal of Clinical Investigation*, v. 106, n. 9, p. 1127–1137, 2000.

GUINN, Kristi M. *et al.* Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 359–370, 23 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14756778>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

GUO, Bin *et al.* O-GlcNAc-modification of SNAP-29 regulates autophagosome maturation. *Nature Cell Biology*, v. 16, n. 12, p. 1215–1226, 2014.

GUO, Xinzhen V. *et al.* Silencing Essential Protein Secretion in *Mycobacterium smegmatis* by Using Tetracycline Repressors. *Journal of Bacteriology*, v. 189, n. 13, p. 4614–4623, 1 jul. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17483222>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

GUO, Wen jie *et al.* ROS-mediated autophagy was involved in cancer cell death induced by novel copper(II) complex. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v. 62, n. 5, p. 577–582, 2010.

GUTIERREZ, M. G. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 13, p. 2687–2697, 2004.

GUTIERREZ, Maximiliano G. *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell*, v. 119, n. 6, p. 753–766, 2004.

HA, Soon-Duck *et al.* Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF-alpha-containing vesicles to the plasma membrane in macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 181, n. 1, p. 690–7, 1 jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578168>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

HECKMANN, Bradlee L.; GREEN, Douglas R. LC3-associated phagocytosis at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 132, n. 5, p. jcs222984, 1 mar. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30787029>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

HOSOKAWA, Nao *et al.* Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. April 1, p. 1981–1991, 2009.

HSU, T. *et al.* The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 21, p. 12420–12425, 2003.

ITAKURA, Eisuke; KISHI-ITAKURA, Chieko; MIZUSHIMA, Noboru. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, v. 151, n. 6, p. 1256–1269, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.001>>.

ITAKURA, Eisuke; MIZUSHIMA, Noboru. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, v. 6, n. 6, p. 764–776, 2010.

JAGER, S. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of Cell Science*, v. 117, n. 20, p. 4837–4848, 2004.

JAMWAL, Shilpa V. *et al.* Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism. *Scientific Reports*, v. 6, n. May 2015, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep23089>>.

JIANG, P. *et al.* The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular Biology of the Cell*, v. 25, n. 8, p. 1327–1337, 2014.

JONES, B W *et al.* Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *Journal of leukocyte biology*, v. 69, n. 6, p. 1036–44, jun. 2001.

JORDENS, Ingrid *et al.* The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors. *Current Biology*, v. 11, n. 21, p. 1680–1685, 2001.

JUNG, Chang Hwa *et al.* ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. April 1, p. 1992–2003, 2009.

KABEYA, Yukiko *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membrane after processing. *The EMBO Journal*, v. 19, n. 21, p. 5720–5728, 2000.

KANG, Peter B *et al.* The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *The Journal of experimental medicine*, v. 202, n. 7, p. 987–99, 3 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16203868>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KÁPOSZTA, R *et al.* Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *Journal of cell science*, v. 112 (Pt 1, n. 19, p. 3237–48, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504329>>.

KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. Chaperone-mediated autophagy. *Methods in Molecular Biology*, v. 445, p. 227–244, 2008.

KIM, B.-H. *et al.* A Family of IFN- γ -Inducible 65-kD GTPases Protects Against Bacterial Infection. *Science*, v. 332, n. 6030, p. 717–721, 6 maio 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21551061>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

KIRISAKO, Takayoshi *et al.* Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *Journal of Cell Biology*, v. 147, n. 2, p. 435–446, 1999.

KIRISAKO, Takayoshi *et al.* The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 2, p. 263–275, 2000.

KIŠŠOVA, Ingrid *et al.* Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy*, v. 3, n. 4, p. 329–336, 2007.

KLIONSKY, Daniel J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*, v. 8, n. 4, p. 445–544, 2012.

LAGE, S. L. *et al.* Cytosolic flagellin-induced lysosomal pathway regulates inflammasome-dependent and -independent macrophage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 110, n. 35, p. E3321–E3330, 2013.

LAZAROU, Michael *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, v. 524, n. 7565, p. 309–314, 2015.

LEVINE, Beth. Eating oneself and uninvited guests: Autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, v. 120, n. 2, p. 159–162, 2005.

LEWIS, Kaeryn N; *et al.* Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 187, n. 1, p. 117–123, 2003.

LI, Wen Wen; LI, Jian; BAO, Jin Ku. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 69, n. 7, p. 1125–1136, 2012.

LIANG, X H *et al.* Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *Journal of virology*, v. 72, n. 11, p. 8586–96, 1998.
Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9765397>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC110269>>.

LIGON, Lauren; HAYDEN, Jennifer; BRAUNSTEIN, Miriam. The Ins and out of *Mycobacterium tuberculosis* protein export. v. 71, n. 2, p. 233–236, 2013.

LIU, Heng *et al.* Degradation of regulator of calcineurin 1 (RCAN1) is mediated

by both chaperone-mediated autophagy and ubiquitin proteasome pathways. *The FASEB Journal*, v. 23, n. 10, p. 3383–3392, 2009.

MARRICHI, Matthew *et al.* Genetic Toggling of Alkaline Phosphatase Folding Reveals Signal Peptides for All Major Modes of Transport across the Inner Membrane of Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 50, p. 35223–35235, 12 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M802660200>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MATSUMOTO, Fumi *et al.* Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 367, n. 3, p. 693–699, 2008.

MATSUNAGA, Youichi *et al.* Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. *FEBS Letters*, v. 324, n. 3, p. 325–330, 1993.

MCDONOUGH, J. A. *et al.* The Twin-Arginine Translocation Pathway of *Mycobacterium smegmatis* Is Functional and Required for the Export of Mycobacterial β -Lactamases. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 22, p. 7667–7679, 15 nov. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16267291>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

MEANS, T K *et al.* The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 163, n. 12, p. 6748–55, dez. 1999.

MENEZES, Nicole. *Avaliação da imunogenicidade da SMTL-13, uma lectina secretada de Mycobacterium tuberculosis*. 2012. 80 f. Florianópolis, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/99321>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

MITCHELL, Gabriel *et al.* Avoidance of Autophagy Mediated by PlcA or ActA Is Required for *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, v. 83, n. 5, p. 2175–

2184, 2015.

MIZUSHIMA, Noboru *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *Journal of Cell Science*, v. 116, n. 9, p. 1679–1688, 2003.

MIZUSHIMA, Noboru; TAMOTSU, Yoshimori; LEVINE, Beth. Methods in Mammalian autophagy research. *Cell*, v. 140, n. 3, p. 313–326, 2010.

MORALES, Stefanny. *A LECTINA BACTERIANA sMTL-13 REGULA A MORTE CELULAR E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL EM MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO POR Florianópolis*. 2014. 2014.

MORT, John S.; RECKLIES, Anneliese D.; POOLE, A. Robin. Extracellular presence of the lysosomal proteinase cathepsin B in rheumatoid synovium and its activity at neutral pH. *Arthritis & Rheumatism*, v. 27, n. 5, p. 509–515, 1984.

MOSHIRI, Mohammad; HAMID, Fatemeh; ETEMAD, Leila. Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. *Reports of biochemistry & molecular biology*, v. 4, n. 2, p. 60–5, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27536698>%0A<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4986263>>.

NAKAMURA, Shuhei; YOSHIMORI, Tamotsu. New insights into autophagosome–lysosome fusion. *Journal of Cell Science*, v. 130, n. 7, p. 1209–1216, 2017.

NAKATOGAWA, Hitoshi *et al.* Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy*, v. 8, n. 2, 2012.

NARASIMHAN, Padmanesan *et al.* Risk Factors for Tuberculosis. v. 2013, p. 11, 2013. Disponível em: <<http://dx.>>. Acesso em: 21 set. 2018.

NOGUEIRA, Lucas *et al.* Mycobacterium tuberculosis Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 3, p. 744–753, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20017196>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

NOGUEIRA, Lucas de Lima. *Investigação do papel da proteínas codificada pelo gene Rv1419 de Mycobacterium tuberculosis durante a infecção: potencial diagnóstico e propriedades imunoregulatórias*. 2012. 88 f. 2012. Disponível em: <[http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas de agentes biologicos/Fichas/Bacterias/Mycobacterium tuberculosis.pdf](http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas_de_agentes_biologicos/Fichas/Bacterias/Mycobacterium_tuberculosis.pdf)>.

PAI, Madhukar *et al.* Tuberculosis. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 2, p. 16076, 27 out. 2016. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201676>>. Acesso em: 23 out. 2018.

PANKIV, Serhiy *et al.* FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end - Directed vesicle transport. *Journal of Cell Biology*, v. 188, n. 2, p. 253–269, 2010.

PAPANIKOU, Effrosyni; KARAMANOU, Spyridoula; ECONOMOU, Anastassios. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 11, p. 839–851, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938627>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

PARK, Se-Ho; BENDELAC, Albert. CD1-restricted T-cell responses and microbial infection. *Nature*, v. 406, n. 6797, p. 788–792, ago. 2000.

PARZYCH, Katherine R.; KLIONSKY, Daniel J. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 3, p. 460–473, 2013.

PARZYCH, Katherine R.; KLIONSKY, Daniel J. An Overview of Autophagy:

Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 20, n. 3, p. 460–473, 2014.

PENN, Bennett H. *et al.* An Mtb-Human Protein-Protein Interaction Map Identifies a Switch between Host Antiviral and Antibacterial Responses. *Molecular Cell*, v. 71, n. 4, p. 637- 648.e5, 16 ago. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276518305574?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 set. 2018.

PENNINI, Meghan E *et al.* Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 176, n. 7, p. 4323–30, 1 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547269>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

PERSKVIST, N.; ZHENG, L.; STENDAHL, O. Activation of Human Neutrophils by Mycobacterium tuberculosis H37Ra Involves Phospholipase C 2, Shc Adapter Protein, and p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 2, p. 959–965, 2000.

PETERS, Wendy; ERNST, Joel D. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Microbes and Infection*, v. 5, n. 2, p. 151–158, 1 fev. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1286457902000825?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

PETHE, Kevin *et al.* The heparin binding haemagglutinin of M. tuberculosis is required for extrapulmonary dissemination. *Nature*, v. 412, n. July, 2001.

PIETERS, Jean. Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell host & microbe*, v. 3, n. 6, p. 399–407, 12 jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18541216>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

PREMZL, Aleš *et al.* Intracellular and extracellular cathepsin B facilitate invasion of MCF-10A neoT cells through reconstituted extracellular matrix in vitro. *Experimental Cell Research*, v. 283, n. 2, p. 206–214, 2003.

PYM, Alexander S *et al.* Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular microbiology*, v. 46, n. 3, p. 709–17, nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12410828>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

QI, Xiaopeng *et al.* Cathepsin B modulates lysosomal biogenesis and host defense against *Francisella novicida* infection. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 213, n. 10, p. 2081–2097, 2016.

QUEVAL, Christophe J; BROSCH, Roland; SIMEONE, Roxane. The Macrophage: A Disputed Fortress in the Battle against *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in microbiology*, v. 8, p. 2284, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29218036>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

RAMPINI, Silvana K. *et al.* LspA inactivation in *Mycobacterium tuberculosis* results in attenuation without affecting phagosome maturation arrest. *Microbiology*, v. 154, n. 10, p. 2991–3001, 2008.

RENSHAW, Philip S. *et al.* Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6·CFP-10 complex. Implications for p. *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 24, p. 21598–21603, 2002.

RODRIGUEZ-FRANCO, Eillen J *et al.* Dysregulation of macrophage-secreted cathepsin B contributes to HIV-1-linked neuronal apoptosis. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e36571, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693552>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

RUSSEL, David. The ins and outs of the mycobacterium tuberculosis containing vacuole. v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2016.

RUSSELL, David G. Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, n. 1, p. 39–47, 11 jan. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrmicro1538>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

SALVADOR, Natalia *et al.* Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. v. 44, n. 207, 2000.

SASSETTI, C. M.; RUBIN, E. J. Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 22, p. 12989–12994, 28 out. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14569030>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SATOO, Kenji *et al.* The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO Journal*, v. 28, n. 9, p. 1341–1350, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.80>>.

SATTLER, Tanja; MAYER, Andreas. Cell-free reconstitution of microautophagic vacuole invagination and vesicle formation. *Journal of Cell Biology*, v. 151, n. 3, p. 529–538, 2000.

SCHLESINGER, L S. Entry of Mycobacterium tuberculosis into mononuclear phagocytes. *Current topics in microbiology and immunology*, v. 215, p. 71–96, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791710>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SCHLESINGER, L S; HULL, S R; KAUFMAN, T M. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of Mycobacterium tuberculosis to human macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, v. 152, n. 8, p. 4070–9, 1994. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8144972>>.

SEVENICH, L. *et al.* Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 6, p. 2497–2502, 2010.

SHARMA, Vartika *et al.* Selective Autophagy and Xenophagy in Infection and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, n. November, p. 1–17, 2018.

SHINTANI, Takahiro; KLIONSKY, Daniel J. Autophagy in health and disease : a double edged sword. *Science*, v. 306, n. 5698, p. 990–995, 2004.

SINGH, Christopher R. *et al.* Processing and Presentation of a Mycobacterial Antigen 85B Epitope by Murine Macrophages Is Dependent on the Phagosomal Acquisition of Vacuolar Proton ATPase and In Situ Activation of Cathepsin D. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 5, p. 3250–3259, 1 set. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16920965>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SMITH, Jennifer *et al.* Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in Mycobacterium marinum escape from the vacuole. *Infection and Immunity*, v. 76, n. 12, p. 5478–5487, 2008a.

SMITH, Jennifer *et al.* Evidence for Pore Formation in Host Cell Membranes by ESX-1-Secreted ESAT-6 and Its Role in Mycobacterium marinum Escape from the Vacuole. *INFECTION AND IMMUNITY*, v. 76, n. 12, p. 5478–5487, 2008b. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2583575/pdf/0614-08.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2018.

SOBOTIČ, Barbara *et al.* Proteomic Identification of Cysteine Cathepsin Substrates Shed from the Surface of Cancer Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 14, n. 8, p. 2213–2228, ago. 2015. Disponível em:

<<http://www.mcponline.org/lookup/doi/10.1074/mcp.M114.044628>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

SONNENBERG, Michael G.; BELISLE, John T. Definition of Mycobacterium tuberculosis culture filtrate proteins by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, N-terminal amino acid sequencing, and electrospray mass spectrometry. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 11, p. 4515–4524, 1997.

THOMAS, D. Brian. *Viruses and the cellular immune response*. [S.l.]: Marcel Dekker, 1993.

TOOR, Jaideep S. *et al.* Mycobacterium tuberculosis Modulates the Gene Interactions to Activate the HIV Replication and Faster Disease Progression in a Co-Infected Host. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, p. e106815, 8 set. 2014. Disponível em: <<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0106815>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

TORRELLES, Jordi B.; AZAD, Abul K.; SCHLESINGER, Larry S. Fine Discrimination in the Recognition of Individual Species of Phosphatidyl- myo -Inositol Mannosides from *Mycobacterium tuberculosis* by C-Type Lectin Pattern Recognition Receptors. *The Journal of Immunology*, v. 177, n. 3, p. 1805–1816, 1 ago. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16849491>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

TURK, Dušan *et al.* Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biological Chemistry*, v. 379, n. 2, p. 137–147, 1998.

TURK, Vito *et al.* Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v. 1824, n. 1, p. 68–88, 2012.

TURK, Vito; TURK, Boris; AN TURK, Dus Ī. Lysosomal cysteine proteases : facts and opportunities. v. 20, n. 17, 2001.

UTTERNWEILER, Andreas *et al.* The Vacuolar Transporter chaperone (VT) Complex is required for Microautophagy. *Molecular Biology of the cell*, v. 75, n. January, p. 106–138, 2007.

VAN DER WEL, Nicole *et al.* M. tuberculosis and M. leprae Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell*, v. 129, n. 7, p. 1287–1298, 2007.

VASILJEVA, Olga *et al.* Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer. *Cancer Research*, v. 66, n. 10, p. 5242–5250, 2006.

VIZOVIŠEK, Matej; FONOVIĆ, Marko; TURK, Boris. Cysteine cathepsins in extracellular matrix remodeling: Extracellular matrix degradation and beyond. *Matrix Biology*, v. 75–76, p. 141–159, 2019.

VON MUHLINEN, Natalia *et al.* NDP52, a novel autophagy receptor for ubiquitin-decorated cytosolic bacteria. *Autophagy*, v. 6, n. 2, p. 288–289, 2010.

WEIDBERG, Hilla *et al.* LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO Journal*, v. 29, n. 11, p. 1792–1802, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2010.74>>.

WHO | Tuberculosis (TB). WHO, 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/tb/en/>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

WIENS, Kirsten E.; ERNST, Joel D. The Mechanism for Type I Interferon Induction by Mycobacterium tuberculosis is Bacterial Strain-Dependent. *PLoS Pathogens*, v. 12, n. 8, p. e1005809, 8 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27500737>>. Acesso em: 4 jun. 2018.

WIJDEVEN, Ruud H. *et al.* Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites

control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nature Communications*, v. 7, n. May, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms11808>>.

WONG, D. *et al.* Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 48, p. 19371–19376, 29 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22087003>>. Acesso em: 16 jul. 2019.

YASUDA, Yoshiyuki; KALETA, Jadwiga; BRÖMME, Dieter. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: Rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, n. 7, p. 973–993, 2005.

YORIMITSU, T; KLIONSKY, DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell death and differentiation*, v. 12, p. 1542–1552, 2005.

YOSHIKAWA, Yuko *et al.* Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 10, p. 1233–1240, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncb1967>>.

YU-SHIN SOU, SATOSHI WAGURI, JUN-ICHI IWATA, TAKASHI UENO, TSUTOMU FUJIMURA, Taichi Hara *et al.* The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 4762–4775, p. 1981–1991, 2008.

ZARELLI, V. E; GIAI, C; COLUMBO, M. I. Interaction of Mycobacterium tuberculosis with the Host Cells: A Focus in the Molecular Mechanism Involved in Trafficking and Autophagy. *SM Journals*, n. Tuberculosis, p. 1–14, 2015.

ZEIGERER, Anja *et al.* Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, v. 485, n. 7399, p. 465–470, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature11133>>.

ZHOU, Fan *et al.* A Rab5 GTPase module is important for autophagosome. *PLoS Genetics*, v. 13, n. 9, p. 1–24, 2017.

ZOU, Zhenyou *et al.* MicroRNA-30a sensitizes tumor cells to cis-platinum via suppressing beclin 1-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 6, p. 4148–4156, 2012.