



**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Farmacologia**

sMTL-13 de *Mycobacterium tuberculosis* regula a
secreção de TNF- α e a homeostasia lisossomal
durante a infecção

**Lucas Zanon Mascarin
Orientador: Prof. Dr. André Báfica**

**Florianópolis
2019**

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós Graduação em Farmacologia
Laboratório de Imunobiologia**

**sMTL-13 de *Mycobacterium tuberculosis* regula a
secreção de TNF- α e a homeostasia lisossomal
durante a infecção**

**Tese submetida ao programa
de pós graduação em Farmacologia pela
Universidade Federal de Santa Catarina
para obtenção do grau
de doutor 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.

Mascarin, Lucas Z.
sMTL-13 de Mycobacterium tuberculosis regula a secreção
de TNF e a homeostasia lisossomal durante a infecção /
Lucas Z. Mascarin ; orientador, André Báfica, 2019.
146 p.

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

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. infecção pela Mycobacterium
tuberculosis. 3. Modulação das vias lisossomais. 4.
modulação da secreção de TNF pela sMTL-13 de Mtb. I. Báfica,
André. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Lucas Zanon Mascarin

sMTL-13 de *Mycobacterium tuberculosis* regula a secreção de TNF- α e a homeostasia lisossomal durante a infecção

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

Prof. Dr. Leonardo Travasso
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.(a) Dr.(a) Patricia Stoco
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Juliano Ferreira
Universidade Federal de Santa Catarina

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

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

Prof.(a) Dr.(a) André Báfica
Orientador

Florianópolis, 2019

Agradecimentos

Uma tese, um trabalho sólido ou um simples “*brain storm*”, não são construídos sozinhos. Assim, tenho a satisfação de listar pessoas que fizeram com que esse trabalho fosse construído com seriedade, foco e com muita honestidade.

Ao meu orientador Dr. André Báfica, agradeço pelas oportunidades, os ensinamentos, as diretrizes e o senso crítico no qual foi me passado, me tornando um profissional capacitado e determinado nos meus objetivos. Posso dizer que cresci muito nesse período de doutorado e o orientador tem uma participação direta em todo esse processo.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Leonardo Travasso, Dr. Juliano Ferreira, Dra Patricia Stoco e Dr. Alfeu Zanotto, Dr. José Henrique M. Oliveira, o meu muito obrigado pela leitura e colaboração para a finalização desse trabalho.

Mais do que bons colegas, o Lidi me proporcionou grandes amigos, nos quais tenho o orgulho de levar comigo independentemente do rumo que tomar a minha a carreira. Em especial a um grupo denominado “jantar do adeus” no qual de diferentes maneiras, delinearam essa minha jornada. Ao Dr. Daniel Mendes, um amigo, um parceiro, que esteve ao meu lado e me auxiliou nos mais difíceis momentos dessa jornada. Os conselhos, apoio, organização e direcionamento são gestos no qual você me determinou e foram fundamentais para chegar até aqui. A Carolina Eto, uma amiga de uma década no qual me abriu as primeiras portas no laboratório, e muito além disto, desde a iniciação científica, esteve junto e sendo fundamental a todos os momentos. E não menos importante a Dr Livia Yamashiro, minha primeira mentora no lab e hoje uma grande amiga que mesmo longe mantém a nossa alegria e a nossa determinação sempre elevada, com esse sorriso todo, o meu muito obrigado.

Um laboratório como esse não é feito de poucos personagens, então gostaria de expandir o meu agradecimento a todos que passaram por ele e me auxiliaram, seja experimentalmente ou pessoalmente, fazendo que cada momento difícil tenha o seu valor. Em especial duas pessoas que geraram os meus primeiros conselhos, que provavelmente vão continuar gerando grandes discussões por muito tempo, a Dr. Cristina Lorenzini e o Mrs Daniel Patrício. Junto uma pessoa quieta e tranquila chamada Dr. Murilo Delgobo me ensinou que obstáculos são pequenos quando você procura um objetivo. Pessoas diferenciadas mudam o ambiente e a obstinação de vocês três contagiam as pessoas ao lado de vocês, obrigado por me proporcionar isso.

Depois de anos crescendo em um ambiente, bons amigos são as melhores recompensas que eu posso levar, assim gostaria de agradecer a cada um que fizeram esses anos de departamento serem valiosos. Amigos esses que se expandem de professores diferenciados, alunos sonhadores e obstinados, a funcionários fantásticos que apesar de toda a dificuldade estão ali a cada dia trazendo um sorriso no rosto.

Não diferente de todos esses, deixo por último meu agradecimento para o meu conceito de base sólida. Primeiro a uma mulher de um coração enorme que me deu um apoio mental e emocional na reta final desse trabalho, na qual foi um dos momentos mais crítico, onde além do apoio e dos empurrões, esteve ao meu lado sorrindo e me mantendo firme, Ari, obrigado de coração. Por último e mais importante de todos, a minha família no qual eu dedico todo esse trabalho, minha mãe Rosimeire e meu pai Paulo, que além de todo apoio financeiro, emocional, estrutural, são pessoas dispostas para mudar o mundo se eu precisar de ajuda. Com todo orgulho e de coração, posso cumprir a promessa que fiz para a minha avó a 15 anos atrás e dizer que me tornei um doutor e eu devo tudo isso a vocês dois. Obrigado!!

Por fim, meus agradecimentos as agencias de fomento CAPES e CNPq.

“If you don’t believe it yet, man, go home”

Doug Pederson 2017
Philadelphia Eagles coach

RESUMO

O *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) desenvolveu estratégias diferentes para fugir do sistema imunológico do hospedeiro e sobreviver no ambiente intracelular. Nosso grupo identificou anteriormente uma lectina micobacteriana de 13 kDa (sMTL-13), codificada pelo gene Rv1419, que está ancorado na parede celular de Mtb. Resultados prévios demonstraram que essa lectina, tem como característica de interagir com carboidratos da superfície celular, interferindo na resposta inflamatória gerada pela célula hospedeira. Neste contexto, hipotetizamos que a Mtb utiliza a sMTL-13 para modular a secreção de TNF- α durante a infecção. Estudos *in vivo* empregando um modelo murino de infecção por Mtb mostraram o aumento da sobrevivência do animal durante a infecção pela Mtb Δ Rv1419, sem alterar o crescimento bacteriano em diferentes tecidos. Junto a isto, o Mtb Δ Rv1419 apresenta um menor processo inflamatório, devido a diminuição de TNF- α nos pulmões infectados. Corroborando com esses dados, macrófagos expostos a Mtb Δ Rv1419 apresentaram menor liberação de TNF- α quando comparados aos infectados com Mtb WT, sem interferir na liberação de outras citocinas como a IL-6. Esse efeito parece ser determinado pelo processo de transporte/liberação do TNF- α , uma vez que a síntese intracelular de TNF- α e ambas as proteínas da membrana, TNFR e Adam17, enzima que cliva esta citocina da membrana da célula, não mostrou alterações na expressão ou na função durante a infecção *in vitro*. Já com base nas análises por citometria de fluxo e imunofluorescência, foi observado que o Mtb Δ Rv1419 apresentou diminuição da ligação a macrófagos, o que foi associada com a disfunção vesicular durante a infecção. Essa disfunção está associada à exocitose da célula infectada, representada pelo acúmulo lisossomos tardios como também do acúmulo do receptor de transferrina, um marcador para a endossomo de reciclagem responsável pelo transporte de TNF- α para a membrana plasmática. Estes resultados foram confirmados por análise transcricional de vias endossomais enriquecidas a partir de amostras de macrófagos expostos a Mtb WT e Δ Rv1419. Juntos, nossos resultados demonstram que o sMTL-13 regula diversas funções celulares, favorecendo o desenvolvimento a instalação do processo

inflamatório tecidual através da manutenção da homeostasia endossomal e do favorecimento da liberação de TNF- α por macrófagos.

Palavra chave: *Mycobacterium tuberculosis*, TNF- α , Endossomo de reciclagem, Lisossomo, sMTL-13.

ABSTRACT

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) has developed different strategies for evading the host immune system and surviving in the intracellular environment. Our group previously identified a 13 kDa mycobacterial lectin (sMTL-13), encoded by the Rv1419 gene, which is anchored to the Mtb cell wall. Previous results have shown that this lectin has the characteristic of interacting with cell surface carbohydrates, interfering with the inflammatory response generated by the host cell. In this context, we hypothesized that Mtb uses sMTL-13 to modulate TNF- α secretion during infection. In vivo studies employing a murine model of Mtb infection showed increased survival of the animal during Mtb Δ Rv1419 infection without altering bacterial growth in different tissues. In addition, Mtb Δ Rv1419 showed a lowest inflammatory process resulting from decreased TNF- α in infected lungs. Corroborating with these data, macrophages exposed to Mtb Δ Rv1419 showed lower TNF- α release when compared to those infected with Mtb WT, without interfering with the release of other cytokines such as IL-6. This effect appears to be unique to the TNF- α transport / release process, once the intracellular synthesis of TNF- α and both membrane proteins TNFR and Adam17, the enzyme that cleaves this cell membrane cytokine, showed no changes in expression or function during *in vitro* infection. Based on flow cytometry and immunofluorescence analyzes, it was observed that Mtb Δ Rv1419 showed decreased binding to macrophages, which was related with vesicular dysfunction during infection. This dysfunction is associated with exocytosis of the infected cell, represented by late lysosome accumulation as well as transferrin receptor accumulation, a marker for the recycling endosome responsible for transporting TNF- α to the plasma membrane. These results were confirmed by transcriptional analysis of enriched endosomal pathways from macrophage samples exposed to Mtb WT and Δ Rv1419. Together, our results showed that sMTL-13 regulates several cellular functions, favoring the development of the tissue inflammatory process by maintaining endosomal homeostasis and favoring the release of TNF- α by macrophages

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, TNF- α , recycling, endosome, lysosome, sMTL-13.

LISTA DE SIGLAS

TB - Tuberculose

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

CCL2 – *Chemokine (C-C motif) ligand 2*

CCL12 - *Chemokine (C-C motif) ligand 12*

CCL19 - *Chemokine (C-C motif) ligand 19*

TNF- α – Fator de necrose tumoral

HIV – Vírus da imunodeficiência

COX – Ciclooxigenase

IFN – Interferon

TNFR1 – Receptor para fator de necrose tumoral tipo 1

TNFR2 – Receptor para fator de necrose tumoral tipo 2

ROS – Especie reativa de oxigênio

IV/ESX – Sistema de secreção do tipo 4

ESX-1 – *ESX-1 secretion system protein EccD1*

ESX-3 - *ESX-3 secretion system protein EccA3*

ESX-5 - *ESX-5 secretion system protein EccC5*

ESAT-6 - *Erly secretory antigenic 6 kDa*

CFP-10 - *culture filtrate protein 10*

HBHA - Hemaglutinina ligante de heparina

sMTL-13 – *Secretion mycobacterium tuberculosis lectin 13 kDa*

FcR – Receptores para imunoglobulina

TLR – *Toll like receptor*

PRR - Receptores de reconhecimento de padrões

PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos

MAPKs - *Mitogen-activated protein kinases*

NF- κ B - fator nuclear kappa B

DNA – ácido deoxiribonucleico

CR3 – Receptor para proteína C3 - sistema complemento

CR1 - Receptor para proteína C1q - sistema complemento

CR4 - Receptor para proteína C4b - sistema complemento

mDia1 - *Mammalian diaphanous-related formin 1*

cdc42 - *Cell division control protein 42 homolog*
Rac1 - *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*
ITAM - *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*
Syk - *Spleen tyrosine kinase*
WASPs - *Wiskott-Aldrich syndrome protein*
Rab5 - *Ras-related protein Rab-5A*
PI3K - *Fosfatidil inositol 3-cinase*
SNAREs - *Soluble NSF attachment receptor*
LAMP1 - *Lysosomal-associated membrane protein 1*
Vamp - *Vesicle-associated membrane protein*
ER – Endossomo de reciclagem
EEA1 – Rab5 efetora
Rab4 - *Ras-related protein Rab-4*
TfR – Receptor de transferrina
TGN - *Trans golgi network*
IL-6 – Interleucina – 6
ADAM17 - *Enzima conversora de TNF- α*
RIPK1 - *Receptor interacting protein kinase-1*
LUBAC - *Ligase linear ubiquitin chain assembly complex*
TAK1 - *TGFB- activated kinase 1*
IKK - *Inhibitor of kappa B kinase complex*
TRADD - *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein*
RIPK1 - *Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*
sTNF – TNF- α solúvel
mTNF - TNF- α de membrana
TRAF2 - *TNF receptor-associated factor 2*
Timp – Inibidor de metaloproteinase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento da <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	23
Figura 2 Representação esquemática das famílias de receptores associados à fagocitose presente na membrana celular de macrófagos.	32
Figura 3 Representação esquemática das vias edossomais de macrófagos, abordando a formação de lisossomos e as vias de endossomos de reciclagem após a fagocitose.....	40
Figura 4 Figura esquemática do balanço do TNF durante as diferentes fases da infecção pela Mtb.	46
Figura 5 Estratégia de Gate para citometria de fluxo.....	58
Figura 6 A ausência da sMTL-13 aumenta a sobrevivência de camundongos infectados por Mtb.....	70
Figura 7 A presença da sMTL-13 de Mtb não interfere no crescimento bacteriano em órgãos de camundongos infectados.	71
Figura 8 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 reduz o infiltrado celular em pulmão de camundongos infectados.	72
Figura 9 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 reduz a expressão de TNF- α em pulmão de camundongos infectados.....	73
Figura 10 BMM expostos à Mtb Δ Rv1419 apresentam menor liberação de TNF- α durante a infecção....	74
Figura 11 A infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv induzem a mesma transcrição de TNF- α intracelular.	75
Figura 12 A ausência de sMTL-13 de Mtb não interfere na expressão e na função da Adam17 de macrófagos durante a infecção.....	76
Figura 13 A ausência da sMTL-13 de <i>M. tuberculosis</i> não interfere na expressão do receptor para TNF- α	77
Figura 14 A sMTL-13 aumenta a liberação de TNF mediada por LPS.	79
Figura 15 Modelamento estrutural da sMTL-13 de Mtb.....	80
Figura 16 A presença da sMTL-13 de Mtb favorece a internalização da bactéria pelos macrófagos.....	81
Figura 17 A presença da sMTL-13 de Mtb modifica a assinatura gênica da via endossomal de BMM infectos.....	82
Figura 18 O recrutamento de Rab5 é semelhante durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv. ...	84
Figura 19 A sMTL-13 de Mtb não intervém na expressão de de Rab7 intracelulares após infecção.	85
Figura 20 O recrutamento de Rab7 é semelhante durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv. ...	86
Figura 21 A infecção por Mtb Δ Rv1419 aumenta estruturas similares a lisossomos intracelulares.	87
Figura 22 A infecção por Mtb Δ Rv1419 aumenta a expressão de Lamp1 em macrófagos.	88
Figura 23 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 aumenta o recrutamento de lisossomos tardios em macrófagos.	89
Figura 24 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 induz o acúmulo intracelular de lamp1.....	90
Figura 25 A sMTL-13 de Mtb induz o recrutamento de lisossomos durante a fagocitose.	91

Figura 26 A sMTL-13 isolada não induz o recrutamento de lamp1	92
Figura 27 A <i>Mtb</i> Δ Rv1419 induz acúmulo de endossomo de reciclagem durante a infecção.	94

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1. TUBERCULOSE	22
1.2. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	26
1.3. RECEPTORES FAGOCÍTICOS	30
1.4. M. TUBERCULOSIS E A FAGOCITOSE CELULAR	36
1.5. VESÍCULAS DE RECICLAGEM	39
1.6. O TNF- α NA TUBERCULOSE	41
2. HIPÓTESE	47
3. OBJETIVOS	48
3.1. OBJETIVO GERAL	48
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. REAGENTES	49
4.2. ANIMAIS	49
4.3. CULTIVO DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS	50
4.4. INFECÇÃO IN VIVO E CURVA DE MORTALIDADE	50
4.5. CRESCIMENTO BACTERIANO EM TECIDO	51
4.6. HISTOLOGIA DE PULMÃO	51
4.7. IMUNOHISTOQUÍMICA	52
4.8. MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA	52
4.9. SOBRENADANTE DE L929	53
4.10. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR M. TUBERCULOSIS	54
4.11. ENSAIO DE BLOQUEIO DA SMTL-13 POR D-GALACTOSE	54
4.12. COLORAÇÃO DE M. TUBERCULOSIS POR SYTO24	55
4.13. ENSAIO DE INTERAÇÃO CÉLULA-BACTÉRIA	55
4.14. CITOMETRIA DE FLUXO	56
4.14.1. Análise de proteína intracelular por citometria de fluxo	58
4.15. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	58
4.16. ENSAIO DE POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA	59
4.16.1. Ensaio de polimerização por citometria de fluxo	60
4.16.2. Ensaio de polimerização por microscopia de fluorescência	60
4.17. WESTERN BLOT	60
4.17.1. Extração diferencial para proteínas de membrana	62
4.17.2. Coloração por gel de prata	62
4.18. MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO ELETRÔNICA	63
4.19. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA PARA ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM	64
4.20. ELISA	64
4.21. EXTRAÇÃO DE RNA E QPCR	65
4.22. PULL DOWN DA SMTL-13 COM PROTEÍNAS DE MACRÓFAGOS POR FPLC	66
4.23. ESPECTROMETRIA DE MASSA	67
4.24. ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMAS DE MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS COM M. TUBERCULOSIS	67
4.25. ALINHAMENTO SMTL-13	68
5. RESULTADOS	69
5.1. A SMTL-13 NA MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FAVORECE A MORTALIDADE DE ANIMAIS INFECTADOS	70

5.2.	A SMTL-13 DE MTB NÃO INTERFERE NA CINÉTICA DE CRESCIMENTO BACTERIANO <i>IN VIVO</i>	71
5.3.	A SMTL-13 DE MTB FAVORECE A INSTALAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO EM PULMÕES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS	71
5.4.	A SMTL-13 NA MTB PROMOVE A LIBERAÇÃO DE TNF-A EM MACRÓFAGOS INFECTADOS	73
5.5.	A MTB Δ RV1419 NÃO ALTERA A ATIVIDADE DA ADAM17 DURANTE A INFECÇÃO	76
5.6.	A SMTL-13 DE MTB FAVORECE A LIBERAÇÃO RÁPIDA DE TNF- α POR MACRÓFAGOS.....	78
5.7.	A SMTL-13 DE MTB APRESENTA UM SITIO DE INTERAÇÃO COM A GALACTOSE.....	79
5.8.	A SMTL-13 DE MTB FAVORECE A FAGOCITOSE AO PROMOVER O RECONHECIMENTO INICIAL DO BACILO	80
5.9.	A INFECÇÃO POR MTB H37RV E MTB Δ RV1419 APRESENTAM DIFERENTES ASSINATURAS GÊNICAS PARA PROTEÍNAS ENDOSSOMAIS DE MACRÓFAGOS	81
5.10.	A SMTL-13 DE MTB NÃO INTERFERE NA MATUREZAÇÃO DE ENDOSSOMOS DE MACRÓFAGOS DURANTE A FAGOCITOSE	83
5.11.	A SMTL-13 MTB PROMOVE A HOMEOSTASIA LISSOSSOMAL EM MACRÓFAGOS INFECTADOS	86
5.12.	A SMTL-13 DE MTB PROMOVE O RECRUTAMENTO DE LISSOSSOMOS DURANTE A FAGOCITOSE ..	91
5.13.	A SMTL-13 DE MTB ESTIMULA A EXOCITOSE DE ENDOSSOMOS DE RECICLAGEM DE MACRÓFAGOS INFECTADOS.....	92
6.	DISCUSSÃO	95
7.	CONCLUSÃO	113
8.	REFÊRENCIAS	114
9.	ANEXO.....	133
9.1.	(AN-1) A SMTL-13 DE MTB LIGA-SE A DIFERENTES PROTEÍNAS INTRACELULARES E EXTRACELULARES DE MACRÓFAGOS.....	134
9.2.	(AN-2) - O PROCESSO DE POLIMERIZAÇÃO DE ACTINA MEDIADA PELA <i>M. TUBERCULOSIS</i> É INDEPENDENTE DA PRESENÇA DA SMTL-13.....	136
9.3.	(AN-3) - A INFECÇÃO POR MTB Δ RV1419 INDUZ O RECRUTAMENTO DE RAB5 SEMELHANTE A INFECÇÃO POR MTB H37RV	139
9.4.	(AN-4) - A INFECÇÃO POR MTB Δ RV1419 INDUZ PRODUÇÃO E RECRUTAMENTO DE RAB7 EM MACRÓFAGO SEMELHANTE A INFECÇÃO POR MTB H37RV	141
9.5.	(AN-5) - A INFECÇÃO POR MTB Δ RV1419 INDUZ O ACUMULO DE LISSOSSOMOS INTRACELULARES DE MACRÓFAGOS 72H APÓS INFECÇÃO	143
9.6.	(AN-6 E 7) - SMTL-13 DE MTB INDUZ O RECRUTAMENTO DE LAMP1 DURANTE A FAGOCITOSE	145

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Tuberculose*

A tuberculose (TB) é uma das doenças mais conhecidas e disseminadas pelo mundo, na qual se estima atingir mais de 6 (seis) milhões de novos casos por ano (WHO 2018). A TB está entre as doenças mais antigas descritas pela humanidade, com as primeiras evidências encontradas em múmias do antigo Egito, com mais de 5 mil anos de idade (Donoghue 2009). Apesar disso, a compreensão da patogênese da doença começou no início do século 19 através de estudos de René Laennec, sendo que a transmissão da TB foi descrita em 1865 por Jean-Antoine Villemin. No entanto, apenas em 1882, o médico alemão Robert Kock descreveu o agente etiológico, o qual foi denominando como *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), também conhecido como o bacilo de Kock (Daniel, 2006, Barberis, Bragazzi et al. 2017).

A TB é uma doença infecciosa que acomete principalmente os pulmões, sendo as vias aéreas a principal porta de entrada para o patógeno. Uma vez inalado, o Mtb presente em gotículas de água expelida por portadores da doença ativa, atinge as vias aéreas do novo hospedeiro, até alcançar as suas porções alveolares (Kaufmann, Dorhoi 2013) . Os macrófagos residentes nos pulmões são considerados a primeira linha de defesa do organismo contra Mtb, os quais reconhecem e fagocitam o bacilo (Shinnick, 1996). Uma vez internalizado, o bacilo evade das primeiras ações dos macrófagos, estabelecendo-se inicialmente no citoplasma dessa célula e iniciando o seu desenvolvimento. Ao escapar da primeira linha de defesa, o bacilo atinge o interstício pulmonar, onde outras células como monócitos e células dendríticas são infectadas. Essas células dendríticas migram para linfonodos drenantes, onde antígenos da bactéria são apresentadas para os linfócitos T imaturos, iniciando assim uma nova resposta contra o Mtb (Churchyard, Kim et al. 2017, Shinnick, T. M. 1996).

Além de promover uma ativação celular nos linfonodos drenantes, a infecção pela Mtb também estimula a produção de diferentes mediadores

quimiotáticos, tais como: CCL2, CCL12 (Co, Hogan et al. 2004), CCL19 e TNF- α (Khader, Rangel-Moreno et al. 2009). Esses mediadores são responsáveis pela quimiotaxia de outras células do sistema imunológico para o foco da infecção, sendo estas células os linfócitos, monócitos, neutrófilos, células NK além de mais macrófagos e células dendríticas (Symon, McKay et al. 1972, Silva Miranda, Breiman et al. 2012). Tal recrutamento celular resulta no aumento do processo inflamatório local, além de formar uma estrutura complexa e organizada com função de conter o patógeno, denominada de granuloma (Shah et al., 2016). O granuloma é um dos sinais patológicos mais representativos da infecção, sendo caracterizado como uma estrutura ativa, por apresentar uma renovação celular contínua, além de uma persistente sinalização para as demais células do organismo (Ulrichs, Kaufmann 2006). Dessa forma, o granuloma funciona como um microambiente onde células do sistema imune atuam contendo a ação da Mtb, controlando e prevenindo a disseminação da infecção (Guler, Simsek et al. 2012). Por outro lado, acredita-se que em caso de falha do organismo ao conter a infecção, sendo essa por uma susceptibilidade individual ou uma imunodeficiência do portador, essa estrutura entra em estado necrótico, vindo assim a servir como um nicho para o crescimento e o desenvolvimento do bacilo (Guler, Simsek et al. 2012; SHAH et al., 2016).

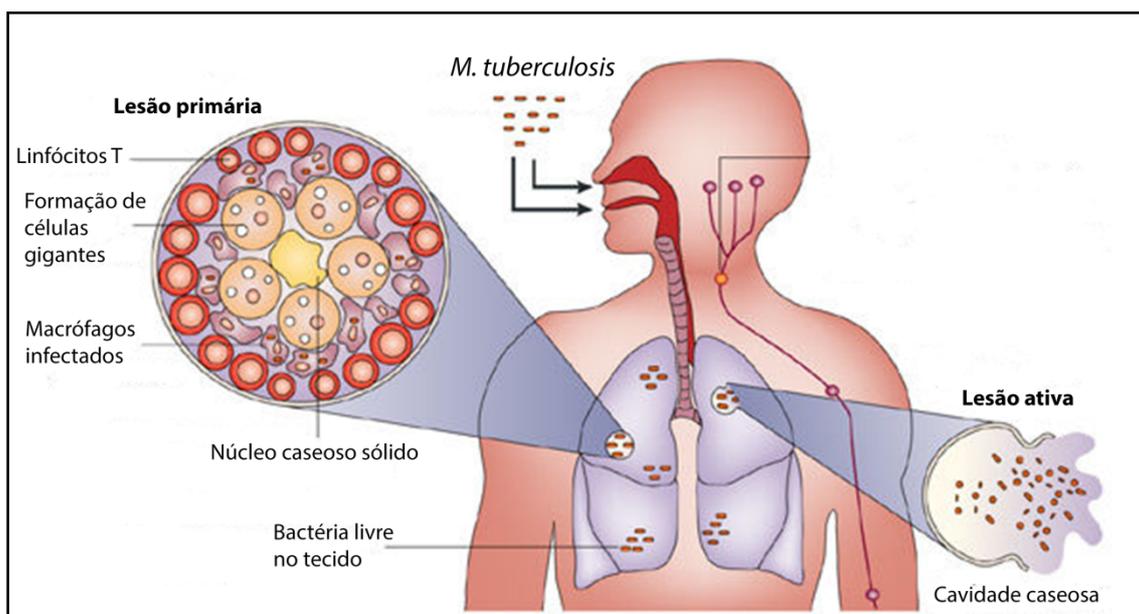


Figura 1 Representação esquemática do ciclo de desenvolvimento da *Mycobacterium tuberculosis*. Adaptado de (Stewart, Robertson et al. 2003).

Após a formação do granuloma, a progressão da TB pode ocorrer de três formas distintas, sendo: 1º a eliminação completa do bacilo, 2º o controle da proliferação bacteriana, ou 3º a progressão e o crescimento da Mtb (Lin et al., 2018; Saunders, Frank et al. 2002; Saunders and Britton 2007). A eliminação do bacilo ocorre através do combate celular, sendo um exemplo a fagocitose promovida por macrófagos. Essa pode ocorrer naturalmente, quando a célula consegue eliminar a bactéria, através dos seus mecanismos celulares ou com auxílio de medicamentos direcionados para o tratamento da TB (WHO 2018). Os fármacos para o tratamento de TB, isoniazida, rifampicina, pirazinamida e entambutol (WHO 2018), podem inibir o crescimento bacteriano diretamente, como também podem fragilizam a parede do bacilo, através da inibição da síntese dos ácidos nucleicos pela isoniazida, favorecendo assim a morte da bactéria após a fagocitose, através da ação de vesículas ácidas presente nas células (Gangadharam, Harold et al. 1963).

Em muitos dos casos de infecção por Mtb, o granuloma não elimina totalmente o bacilo, mas ao mesmo tempo, esse bacilo se estabiliza e apesar de manter o seu estado metabólico a bactéria não se replica, resultando em um bacilo latente dentro do granuloma, podendo assim se manter nesse granuloma por anos. Esse estágio é denominado como TB latente, na qual não apresenta características clínicas da doença, como também não resulta na transmissão ou qualquer outro sintoma decorrente da presença do bacilo no pulmão do organismo (Kiazyk, Ball 2017, Lee, Koo et al. 2019).

Já a tuberculose ativa, conhecida pelo estado infectante da TB, induz um processo de necrose celular no pulmão, tornando o granuloma um nicho propício ao crescimento e a proliferação bacteriana (Rhoades, Frank et al. 1997). Esse processo pode ocorrer a partir do estágio inicial de infecção, como também, pode iniciar tardiamente a partir do desenvolvimento de uma tuberculose latente para seu estado ativo (Capuano, Croix et al. 2003), sendo pouco conhecido os mecanismos pelo qual a bactéria passa do estágio latente para o estágio ativo. No entanto, sabe-se que o comprometimento do sistema imune do hospedeiro por co-infecções, como infecção pelo vírus do HIV, reduz a eficiência imunológica e prejudica o controle bacteriano dentro do granuloma (Pawlowski, Jansson et al. 2012).

Uma vez estabelecido um processo contínuo de desenvolvimento, o *Mtb* pode completar o ciclo de infecção da TB (Bloom and Murray 1992). Na mesma linha de raciocínio, para estabilizar a patologia como ativa e com toda a sintomatologia da doença, onde se inclui a capacidade de transmissão do bacilo, o granuloma precisa estar ou ter iniciado um estado de necrótico. No entanto, apesar de ser o principal motivo que promove a inflamação pulmonar e consequentemente favorecendo a tosse do hospedeiro, a necrose celular também possibilita a disseminação da bactéria para regiões extrapulmonares. Uma vez que esta atinja a corrente sanguínea, ela pode se estabelecer em outros órgãos, levando a novos ciclos de formação do granuloma (Guler, Simsek et al. 2012).

Durante o desenvolvimento da doença, o granuloma pode apresentar variações histopatológicas, observando diferentes conformações na estrutura celular, como também variações dentre as respostas celulares contra o bacilo. Nesse contexto, as variações estruturais podem ser classificadas como: granuloma sólido, granuloma necrótico e granuloma caseoso. O granuloma sólido é a primeira estrutura formada após a entrada do patógeno no tecido pulmonar, tendo como característica principal a contenção do bacilo, e sendo responsável pelo bloqueio da proliferação bacteriana. Nesse momento, o granuloma apresenta uma assinatura gênica considerada anti-inflamatória, visto que a expressão de proteínas e citocinas pró-inflamatória, tais como TNF- α e IFN, se mantêm baixas. Já as estruturas necróticas e caseosas, estão relacionadas com a progressão da doença, visto que nelas, observam-se características comuns de estrutura e resposta frente ao organismo. O granuloma necrótico recebe esse nome, por apresentar em seu centro, um acúmulo de material necrótico e debris celulares, e por sua vez, esse evolui para um material caseoso, ou seja, um material liquefeito e com a presença de cavidades. Este tipo de granuloma, apresenta um perfil contrário da estrutura sólida, visto que a assinatura prioritária é de um perfil inflamatório, como exemplo do aumento da produção de leucotrieno B₄, um lipídio pró-inflamatória associada à produção de TNF- α (Marakalala, Raju et al. 2016).

Desta forma, é possível observar que as citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias apresentam um balanço fundamental durante a infecção

bacteriana. O TNF- α , por exemplo, apresenta inicialmente uma função antimicrobiana, durante o granuloma sólido, uma vez que a ativação dos seus receptores (TNFR) presentes na membrana celular de macrófagos, resultam na produção intracelular de ROS, que apresentam uma ação tóxica para o bacilo internalizado. Por outro lado, o avanço da patologia leva a uma quebra no balaço da produção de TNF- α , resultando no aumento e no acúmulo dessas citocinas no granuloma, resultando em dano tecidual, na formação do granuloma caseoso e conseqüentemente, favorecendo ainda mais o desenvolvimento do bacilo (Gengenbacher, Kaufmann 2012).

1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

O bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) é uma bactéria do gênero *Mycobacterium*, assim como o *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti* e *Mycobacterium Canetti* (Caleffi-Ferracioli 2018, Shrestha 2003). Estes bacilos são caracterizados como uma bactéria Gram positiva álcool ácido resistente, por apresentarem composições e complexidades na sua parede bacteriana que se assemelham as bactérias Gram positivas tradicionais, embora a coloração de Gram não seja efetiva para sua marcação (Hinson, Bradsher et al. 1981, Trifiro, Bourgault et al. 1990).

Apesar de algumas semelhanças com outras classes de bactérias, a Mtb apresenta uma parede celular singular, devido a sua alta complexidade. Essa parede é composta por uma membrana plasmática e uma parede celular, contendo dentre outras biomoléculas, os ácidos micólicos, glicoproteínas, arabinogalactanas e lipomananas, estabelecendo assim, uma estrutura ampla e de difícil acesso ao meio intracelular da bactéria (Barry, Lee et al. 1998). Já abaixo da camada mais externa, encontra-se uma região conhecida como porção de permeabilidade, visto que nela, estão inseridas proteínas formadoras de poros, que permitem a translocação de proteínas através da membrana (Cole, Brosch et al. 1998).

Dentre as estruturas presente nesta parede celular, é importante ressaltar a presença de proteínas difundidas na membrana, que apresentam relevância para a patogenia da doença. A exemplo, observa-se a lipomanana,

a lipoarabinomanana, além de proteínas ancoradas na parede, que atuam junto as demais proteínas como uma estrutura protetora. Essa estrutura, favorece o desenvolvimento bacteriano em ambientes adversos, como em contato com o granuloma, no processo de reconhecimento, ou no meio intracelular de macrófagos (Fukuda, Matsumura et al. 2013).

As proteínas de membrana da Mtb, podem ser divididas em dois grandes grupos, aquelas que são secretadas e aquelas que ficam ancoradas na parede celular (Gomez, Johnson et al. 2000). Dentre as proteínas secretadas, encontra-se um concentrado proteico, que inclui dezenas de proteínas atuantes como fatores de virulência (Converse, Cox 2005), as quais atuam no processo de internalização da bactéria e na ativação da célula hospedeira (Backert and Meyer 2006). Destas destacam-se as proteínas dependentes do sistema de secreção do tipo IV/ESX, a exemplo das famílias ESX-1, ESX-3 e 5, no qual se destaca os substratos como ESAT-6 ("Early secretory antigenic 6 kDa") e CFP-10 ("culture filtrate protein 10") da família ESX-1 (Sorensen, Nagai et al. 1995). Destes, o ESAT-6 apresenta dentre as suas funções, atuar na modulação da imunidade inata do hospedeiro, como um dos principais antígenos imunogênicos da Mtb (Champion, Cox 2007). A sua ação pode ser observada no escape da bactéria do sistema imune de macrófagos, uma vez que essa molécula secretada atua auxiliando a lise celular e favorecer a saída da bactéria (Gao, Guo et al. 2004). Essa proteína também participa da ruptura de membrana de fagossomos e lisossomos, evitando a fusão vesicular e facilita a evasão do bacilo dessas vesículas para o meio intracelular, levando assim a melhor replicação do patógeno (Conrad, Osman et al. 2017). Já o CFP-10, apresenta isoladamente uma característica de inibir a acidificação de fagossomos e lisossomos. Além de uma ação isolada, essa também se encontra em forma de complexo, associada ao ESAT-6. Esse complexo apresenta uma ação eficiente no escape de vesículas, como também atua na liberação da bactéria para o meio externo, promovendo a necrose celular (Welin, Bjornsdottir et al. 2015).

A virulência da Mtb também esta associada a outras proteínas, que não estão presente dentre os fatores secretados, mas ancorados na sua membrana (Brennan, Nikaido 1995). Dentre essas proteínas membranares, chama-se a atenção a lipoarabinomanana, uma glicoproteína estrutural para a membrana

do bacilo (Chan, Fan et al. 1991). Além de ser fundamental na estrutura da bactéria, essa glicoproteína também atua na resistência contra a célula do hospedeiro, promovendo à bactéria a capacidade de evadir de ambientes ácidos e a sobreviver a tratamentos farmacológicos (Vergne, Chua et al. 2003). Desta forma, demonstraram que esta proteína é fundamental para a integridade da membrana do bacilo, uma vez que a mutação dessa classe proteica, resulta na maior sensibilidade à antibióticos β -lactâmico (McDonough, Hacker et al. 2005). Esta mutação também resulta em uma maior suscetibilidade do bacilo a morte durante a fagocitose, devido esta glicoproteína auxiliar na inibição da acidificação de vesículas (Kaur, Obregon-Henao et al. 2008, Fukuda, Matsumura et al. 2013, Vergne, Gilleron et al. 2014).

Além de atuarem na ativação celular, outros grupos de proteínas membranares de Mtb, também estão envolvidos na capacidade do patógeno de interagir com moléculas de superfícies de macrófagos, e dentre essas, encontram-se as lectinas (Zhu, Ng et al. 2006). Essa classe de proteína, que está amplamente distribuída na superfície de diferentes grupos de patógenos, tem como característica a interação com carboidratos localizados na superfície de células do sistema imune, favorecendo assim o reconhecimento e a indução da fagocitose desses organismos. Dentre outros patógenos, que apresentam lectinas na sua superfície, destacam-se o vírus Influenza com a “hemaglutinin”, protozoários como a *Entamoeba histolytica*, a qual apresenta uma lectina heterodimérica de 260-kDa. Já em bactérias, observa-se a *Escherichia coli*, que possui filamentos na sua superfície, que pode ser reconhecida por receptores de manose (Nizet, Varki e Aebi, 2015). Diferente dos patógenos citados, pouca informação já foi relatada, sobre a presença ou função de lectinas na parede celular da Mtb. Das onze lectinas que já foram preditas nesse bacilo, apenas uma foi bem descrita até então, a qual é denominada como hemaglutinina ligante de heparina (HBHA) (Menozzi, Rouse et al. 1996). O reconhecimento da HBHA de Mtb favorece a disseminação do bacilo extrapulmonar, uma vez que essa proteína apresenta a característica de se ligar a moléculas de carboidratos sulfonados. Estes carboidratos por sua vez, possuem alta distribuição na superfície de células epiteliais e, assim, conferem

a importância da lectina na imunopatogênese da doença (Raze et al., 2018; Menozzi, Reddy et al. 2006).

Dentre as lectinas preditas em Mtb, uma lectina de 13 kDa denominada como sMTL-13, chama a atenção por apresentar uma similaridade com a cadeia β da toxina ricina (Nogueira, Cardoso et al. 2010, Kolbe, Veleti et al. 2019). A ricina, por sua vez, é uma lectina vegetal que ao entrar em contato com células de mamífero, atua como uma toxina. Esta, apresenta sua estrutura dividida em duas partes, denominadas como cadeias α e β . A cadeia α , também conhecida como a porção tóxica dessa molécula, tem como característica inibir as funções ribossômicas da célula. Por outro lado, a cadeia β tem características semelhantes às lectinas, ou seja, apresentando uma alta afinidade por carboidratos, e dessa forma, ao se ligar com esses açúcares na superfície da célula favorece a passagem da cadeia α para a região citoplasmática, podendo assim atuar diretamente nos ribossomos (Xu, Yuan et al. 2013).

Apesar de ter o seu gene parcialmente conservado dentre outras espécies de *Mycobacterium*, como a *M. marinum* e a *M. ulcerans*, o que indicaria um possível ancestral comum para essa proteína secretada, foi demonstrado que a proteína sMTL-1 que faz com que o bacilo secrete essa proteína no filtrado proteico celular (CFP), no entanto, a análise de diferentes porções da bactéria também demonstrou a presença da lectina na parede celular, favorecendo assim uma possível atividade durante a infecção (Nogueira, Cardoso et al. 2010).

Por apresentar uma alta similaridade com a ricina, foi levantado a hipótese que a sMTL-13 poderia apresentar funções semelhantes à da ricina, quando presentes na superfície da Mtb. Desta forma, estudos funcionais utilizando uma bactéria mutante codificada pelo gene Rv1419, demonstraram *in vitro*, que a ausência dessa lectina leva a uma menor capacidade de ligação da bactéria com a superfície de células hospedeiras (Morales S.L.V. 2014). Essa falha no reconhecimento leva a uma menor resposta pela célula infectada, demonstrando assim, uma grande importância dessa proteína no desenvolvimento da patologia, como também no desenvolvimento da resposta imune (Souza N.M. 2012). Isso é coerente com análises *in vivo*, onde foi

observada a presença dessa proteína em biopsia de pulmão infectado, caracterizando assim como uma possível proteína alvo na infecção pela Mtb (Nogueira, Cardoso et al. 2010).

1.3. Receptores fagocíticos

Dentre as diversas atividades promovidas pelo sistema imunológico, a fagocitose celular é um processo fundamental não apenas para a internalização e eliminação de produtos (Jonsson, Musher et al. 1985), como também por atuar em atividades homeostáticas do organismo (Gottlieb, Topaz et al. 2012). O reconhecimento e a sinalização celular, ocorrem em todas as células presentes no sistema imune, onde cada uma apresenta uma característica própria devido aos diferentes tipos e frequências de receptores em sua superfície (Uings, Farrow 2000). No entanto, apenas uma fração dessas células induz, através da sinalização de membrana, o processo de fagocitose e internalização do organismo alvo. A exemplo de neutrófilos, macrófagos e células dendríticas, essas células utilizam uma gama de receptores para estimular o prolongamento de membrana, na qual resulta na incorporação e na internalização do produto reconhecido (Ruiz-Alcaraz et al., 2018).

Descrita pela primeira vez por Ilya Mechnikov, há mais de 100 anos, a fagocitose celular foi um dos achados que levaram ao prêmio Nobel de medicina de 1908. A fagocitose é um processo de internalização de partículas com mais de 0,5 μm realizada por células do sistema imune (Uribe-Querol and Rosales 2017). Estas células por sua vez, podem ser classificadas como profissionais (macrófagos e células dendríticas), ou como não profissionais (células epiteliais, endoteliais e fibroblastos) que realizam o processo de fagocitose na presença de microrganismos (Rabinovitch 1995).

A fagocitose é resultante da múltipla polimerização de filamentos de actina presentes na membrana, o que possibilita a proliferação da mesma e o envelopamento da partícula a ser degradada. Após o reconhecimento de partículas, a célula sofre um processo de envelopamento pela membrana celular, denominado de copo fagocítico (do inglês *phagocytic cup*) e na

sequência, essa nova estrutura é liberada para o meio intracelular, formando uma vesícula denominada fagossomo (Schlam, Bagshaw et al. 2015). Esta vesícula passará por processos subsequentes de maturação, até a formação do fagolisossomo, uma estrutura ácida, com diferentes tipos de proteases que vão atuar na degradação proteica (Poteryaev et al., 2010). Por fim, essa estrutura sofre uma nova fusão, agora com a membrana celular, para a liberação desse conteúdo para o meio extracelular, onde esse processo denomina-se como exocitose (Poteryaev et al., 2010; Shakya et al., 2018).

Além de estarem associadas à fagocitose, as proteínas de membrana também denominadas como receptores, podem ser divididos em grupos conforme suas funções (Ruiz-Alcaraz et al., 2018). Deste observa-se os receptores de proteínas opsonizantes, que incluem receptores para anticorpos (FcR) (Huber, Lynch et al. 2001), que por sua vez são subdivididos em classes de ação inibitória ou excitatórias. Encontram-se também receptores reconhecedores de padrões, onde se incluem os da família Toll (TLR) (Blander, Medzhitov 2004), além de proteínas sinalizadoras para sistemas adjacentes, como o sistema complemento e os de lectinas (Zelensky, Gready 2005), os quais atuam reconhecendo moléculas de carboidratos, presentes na parede celular de microrganismos (Fig 2).

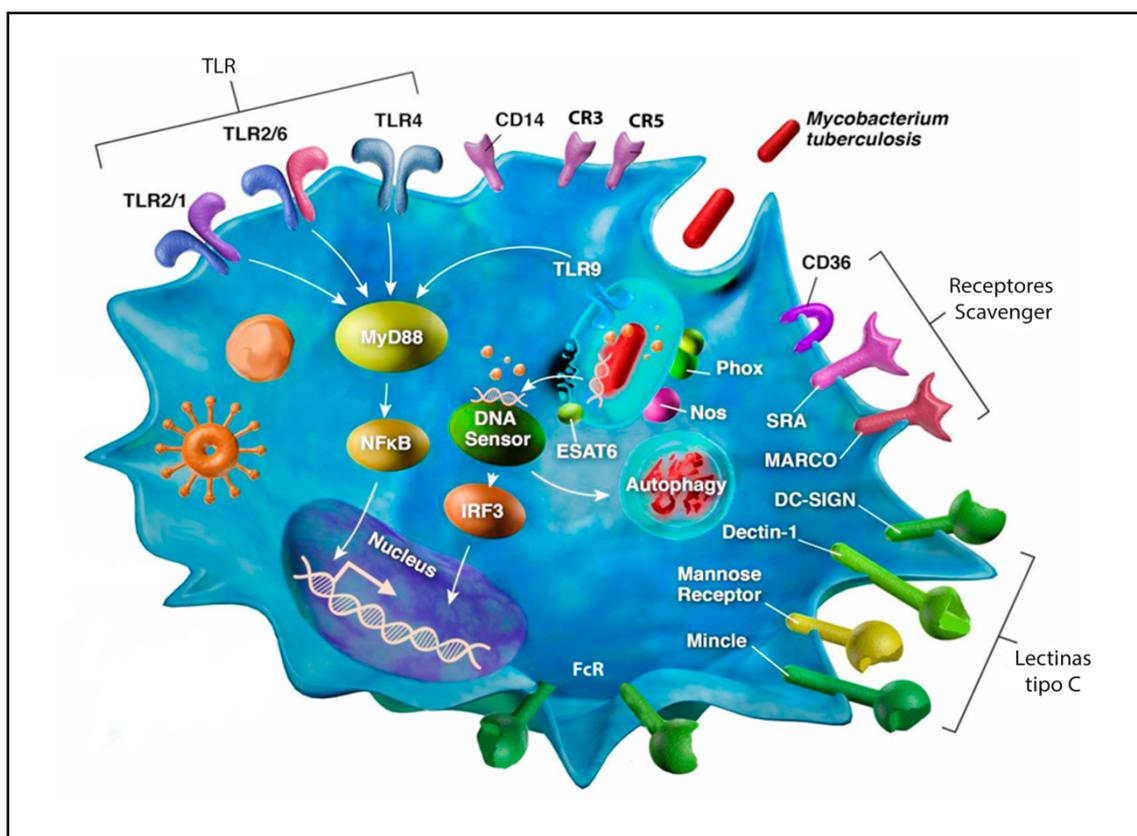


Figura 2 Representação esquemática das famílias de receptores associados à fagocitose presente na membrana celular de macrófagos. Adaptado de (Stamm, Collins e Shiloh, 2015)

A família melhor elucidada dentre as classes de proteínas relacionadas à fagocitose, são os receptores de reconhecimento de padrões (*pattern recognition receptors*, PRR). Muitos organismos como bactérias, fungos e parasitas, apresentam estruturas bioquímicas (carboidratos, lipídios e proteínas) que não são encontrados em mamíferos e, por sua vez, essas são denominadas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (do inglês *pathogen-associated molecular pattern*). Ao entrar em contato com a célula, os PAMPs solúveis, ou presentes na superfície dos patógenos, são reconhecidos pelos sítios ativos desses receptores, resultando na mudança conformacional do mesmo. Por sua vez, esse reconhecimento leva ao estado ativo dos receptores, resultando assim na indução de sinais secundários intracelulares e, conseqüentemente, em um aumento da atividade celular (Botos, Segal e Davies, 2011; Latz et al., 2007). A modulação desta classe de receptores, não necessariamente resulta em uma resposta direta da fagocitose,

mas leva a uma ativação secundária, que essa sim resulta na modulação de membrana para a formação do copo fagocítico. Apesar destes receptores estarem presentes em diferentes estruturas celulares, na membrana celular (TLR2 e 4) e em endossomos (TLR 3, 7, 8 e 9), sua ativação culmina na ativação de proteínas cinases (MAPKs) e NF- κ B (do inglês fator nuclear kappa B), que por sua vez resulta em uma resposta inflamatória. Concomitantemente a produção de citocinas, essa ativação também resulta na transcrição de receptores diretos da fagocitose (Edelson e Unanue, 2002).

Dentre as diferentes classes destes receptores, as que mais atuam no reconhecimento da Mtb são os TLR2, TLR4 e 9 (Chen, Sheu et al. 2015; Faridgohar, Nikoueinejad, 2017; Bafica, Scanga et al. 2005). Para ocorrer esse reconhecimento, diferentes moléculas presentes no bacilo tornam-se alvos, sendo essas, moléculas ativas ou inibitórias. Dessa forma, observa-se que proteínas, como a ESAT-6, além de biomoléculas estruturais como ácidos micólicos, conseguem ativar TLR2 na superfície celular, resultando na produção de citocinas e peróxido de hidrogênio (Chen, Sheu et al. 2015, Faridgohar, Nikoueinejad 2017). Já o TLR9, por estar presente apenas em vesículas como os endossomos, não atuam diretamente promovendo a fagocitose, mas são rapidamente ativados por DNA de Mtb, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (Bafica, Scanga et al. 2005). Por outro lado, o TLR4 podem participar do reconhecimento desse bacilo de formas diferentes, uma vez que proteínas MaLan e a lectina como HBHA podem atuar como agonistas desse receptor (Jung, Jeong et al. 2011). Além disto, o phosphatidylinositol pode atuar inibindo a atividade de TLR4 via Myd88, resultando por exemplo na menor produção de óxido nítrico pelas células fagocíticas (Morita, Patterson et al. 2004, Doz, Rose et al. 2009).

Além de gerar uma resposta celular, produção de citocinas e peróxidos, a ativação dos receptores TLR também levam à estimulação de outros receptores de membrana, que atuam de forma direta na fagocitose (Sendide, Reiner et al. 2005). No entanto, esses receptores estão presentes constitutivamente em células fagocíticas. Um exemplo é o CR3, um receptor do sistema complemento altamente expresso em macrófago, que atua no reconhecimento de fragmentos C3 (Le Cabec, Carreno et al. 2002). O sistema complemento por sua vez, é um conjunto proteico que consiste em dezenas de

proteínas presentes no plasma sanguíneo que ao encontrar a superfície de bactérias, interagem com elas através de ligações covalentes com a parede celular, caracterizando assim a opsonização bacteriana (Ricklin, Reis et al. 2016). Essa ligação na parede bacteriana desencadeia uma cascata de ativação e hidrólises proteicas, que ao final, resulta na formação de um poro nessa superfície, podendo assim, expor o meio intracelular do patógeno, levando o organismo a morte (Abeer M. Abd El-Aziza, 2018; Hovland et al., 2015). Uma vez presente na parede do patógeno, várias dessas proteínas podem interagir com receptores próprios presentes na superfície do macrófago, favorecendo o seu reconhecimento e induzindo a fagocitose. Essa ligação, pode ocorrer em diferentes etapas da cadeia do sistema complemento, assim, proteínas ali depositadas como o complexo, C3 e iC3b (Tosi, Zakem et al. 1990) podem ser reconhecidas pelos seus respectivos receptores CR1, CR3 e CR4, presentes na superfície de células fagocíticas (Ricklin, Reis et al. 2016) (Lukácsi et al., 2017; Munawara et al., 2017)

Os receptores do sistema complemento classificados como β 2-integrinas, além de atuarem no reconhecimento e na ligação patógeno-célula hospedeira, também geram uma sinalização intracelular (Josefsson, Gebhard et al. 2005). A ligação entre iC3b e o CR3 por exemplo, inicia uma sinalização direta através das Rho GTPases presentes no citosol, induzindo assim o acúmulo de mDia1 (mammalian diaphanous-related formin 1) (Tzircotis, Braga et al. 2011). Essa é uma proteína da família Formin, que atua como alvo das Rho (cdc42 e as Rac1), resultando na formação dos prolongamentos de membrana denominados como filopodia e lamellipodia (Isogai, van der Kammen et al. 2015). Estas por sua vez, são prolongamentos ou projeções da membrana plasmática, decorrentes do recrutamento de microtubulos e da constante polimerização de F-actina, o qual favorece o processo de fagocitose (Colucci-Guyon et al., 2005; Lewkowicz et al., 2008; Lukácsi et al., 2017).

Semelhante aos receptores do sistema complemento, os FcR são proteínas de membrana que também agem ativando diretamente esse processo de internalização (Kang, Park et al. 2012). Esse receptor ao serem ativados por anticorpos atuam mediando diferentes promotores intracelulares, os quais interferem no processo de polimerizações de actina da membrana celular, conforme o tipo de promotor presente no receptor (Jaumouille, Farkash

et al. 2014). Os FcRs, por sua vez, são subdivididos em diferentes subclasses de receptores, que apresentam diferentes respostas ao serem ativados na superfície celular. Dos subtipos existentes, os Fc γ R são as estruturas mais associadas com o processo de fagocitose, sendo esses subdivididos em Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB e Fc γ RIII (Fitzer-Attas et al., 2000). Destes receptores, três atuam com um papel direto no estímulo da fagocitose mediada por anticorpos (Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIII), onde suas porções transmembranar, estão acopladas a um domínio intracelular denominado como ITAM (do inglês immunoreceptor tyrosine-based activation motif), e esse, quando ativados, acoplam-se a proteína Syk (proteína tirosina quinase) presente no citoplasma. Ao aciona-la, esta cascata de sinalização resultara na polimerização e remodelamento de pequenos filamentos de actina (Hayes et al., 2016; Nimmerjahn e Ravetch, 2008; Schreiber et al., 1989).

Dentre diversos mecanismos proteicos presente na superfície celular, que atuam diretamente no processo de internalização, os receptores para complemento e os receptores para anticorpos estão entre os mecanismos mais ativos durante as infecções por patógenos. É de conhecimento que durante a infecção por Mtb, ambos os sistemas atuam ativamente opsonizando o patógeno, aumentando assim, a eficiência no qual esse patógeno vai ser internalizado por macrófagos (Largent, Walton et al. 1984, Astarie-Dequeker, N'Diaye et al. 1999). No entanto, essa opsonização não necessariamente representa uma melhor capacidade de internalização do bacilo, tornando muitas vezes, necessárias outras vias em associação. Outras proteínas como as lectinas, podem intensificar a ligação celular concomitante a outras classes de receptores, ativando mecanismos intracelulares semelhantes para ocorrer a polimerização de actina (Kolbe, Veleti et al. 2019). Apesar da importância de anticorpos e do sistema complemento na biologia da infecção in vivo, o reconhecimento de proteínas como as lectinas durante fagocitose são fundamentais para o estudo em modelos isolados, como por exemplo a cultura celular, visto que esse microambiente pode não apresentar essas proteínas opsonizantes.

1.4. *M. tuberculosis* e a fagocitose celular

Ainda que cada receptor apresente variações de sinalização, para formação da lamellipodia e do copo fagocítico, o processo de polimerização de actina necessita de um estímulo via receptores para resultar na fagocitose (Li et al., 2018). Para este processamento, de forma homeostática ou durante a infecção, a célula promove uma polimerização nos filamentos de actina que é mediada por um conjunto de proteínas (May and Machesky 2001). Dentre elas, chama a atenção dois grupos de proteínas primordiais, denominadas WASPs - WEVE, da família de proteínas WASP (do inglês Wiskott-Aldrich syndrome protein), que atuam mediando a ligação de Cdc42 e da proteína Rac1 a um único complexo, o qual vai resultar no acoplamento e prolongamento de fibras de actina (Machesky, Mullins et al. 1999). Essa via de ativação, também está envolvida no processo de despolimerização da membrana, levando a liberação da vesícula formada para o meio intracelular (Hong-Geller and Cerione 2000). A despolarização é fundamental para o funcionamento entre vesículas no citoplasma, a exemplo da fusão entre o fagossomo e lisossomo, como também entre o fagolisossomos com a membrana celular, levando assim a exocitose da célula (Olazabal et al., 2002; Tsuboi e Meerloo, 2007; Yamazaki et al., 2018).

Depois de finalizado o processo de encapsulamento do fagossomo, o produto a ser neutralizado e degradado, sofrerá influências conforme o estágio de maturação vesicular onde se encontra essa estrutura (Podinovskaia and Spang 2018). Como primeiro estágio, ocorre a formação do endossomos / fagossomos imaturos, que são estruturas circulares formadas por proteínas pré-estabelecidas. Estas estruturas recrutam e ativam proteínas como a Rab5 e outras GTPases. Essas proteínas têm como função, o recrutamento de estruturas fundamentais como a Rab5-GEF e a Rabex-5 e, por sua vez, leva a ativação destes conjuntos de proteínas na membrana do endossomo, que resultam em continuas fusões vesiculares (Balderhaar and Ungermann 2013). A ativação da Rab5 é fundamental para o ancoramento de outras estruturas como a Vps34, uma PI3K (fosfatidil inositol 3-cinase), que resulta no recrutamento de múltiplos efetores como o antígeno endossomal 1 e proteínas da família SNAREs (soluble NSF attachment receptor) (Karunakaran, Sasser et

al. 2012). Por sua vez, estas são proteínas que ancoram nas membranas dos endossomos primários, tendo como função principal fazer o reconhecimento e ligação proteica, para favorecer a fusão entre as estruturas de membrana (Langemeyer, Fröhlich e Ungermann, 2018; Levin, Grinstein e Canton, 2016).

O lisossomo é a vesícula fundamental para degradar produtos direcionados pela fagocitose (Wong, Gregory et al. 2017). Esta é uma vesícula ácida e composta por lipases e proteases no seu lúmen, apresentando estruturas específicas na sua membrana (Muller, Dennemarker et al. 2012). Nelas encontram-se proteínas estruturais como LAMP1 e LAMP2, bombas de prótons (V-ATPase), responsáveis pela acidificação da vesícula, como também proteínas de fusão como as Rabs e proteínas da família Vamp, além de proteínas sinalizadoras itinerantes, nas quais se ancoram a membrana conforme o estágio de maturação dessa vesícula (Ba et al., 2018; Levin, Grinstein e Canton, 2016; Xu e Ren, 2015).

Alguns patógenos inibem a eficiência do processo de internalização e eliminação realizada pelos fagócitos. Assim, diversos patógenos de desenvolvimento intracelular, após serem internalizados, escapam do processo de degradação proteica (Jamwal, Mehrotra et al. 2016). Uma vez que estes precisam estar no citoplasma da célula e utilizar desse micro ambiente para se desenvolver, é fundamental que esses possam manipular o processo de fagocitose, e interferir na maturação do fagossomo (Michelet et al., 2018). A *Mtb*, como modelo de estudo, apresenta diferentes formas de evadir da resposta celular, onde esse processo ocorre desde o primeiro reconhecimento na membrana da célula, até o último estágio de degradação de proteína no citoplasma (Queval, Song et al. 2017). Essa evasão, como mencionado, ocorre inicialmente na inibição de proteínas de membrana, como por exemplo na modulação atividade dos receptores TLR (Pathak, Basu et al. 2007). No entanto, é no meio intracelular que a maioria dos processos ocorre. Uma vez internalizada, o bacilo passa a inibir o recrutamento de proteínas da família Rab, o que proporciona uma falha na capacidade de fusão dos endossomos com os fagossomos, formados após a fagocitose (Chandra, Ghanwat et al. 2015). Esta inibição também atua no pH lisossomal, reduzindo a atividade das bombas V-aptase, além de inibir o processo de autofagia, favorecendo necrose

celular e conseqüentemente, a saída e a disseminação do patógeno (Gutierrez et al., 2004; Michelet et al., 2018; Siqueira, Ribeiro e Travassos, 2018)

Após a maturação e estabilização das vesículas lisossomais, dois caminhos podem ser direcionados no processo de internalização desse bacilo, sendo a primeira, a degradação e a exocitose do organismo (Thorne, Oliver et al. 1976), já a segunda, em contrapartida, pode ocorrer a estabilização do patógeno no citoplasma celular (Chandra, Ghanwat et al. 2015). Para isso, muitas vezes evadindo das diferentes ações da célula, como ao controlar o pH vesicular, o bacilo atua desestabilizando a membrana do fagolisossomo, favorecendo assim o seu escape (Jamwal, Mehrotra et al. 2016), onde esse vai poder se desenvolver e se multiplicar (van der Wel, Hava et al. 2007). Por outro lado, muitas vezes a célula consegue eliminar o bacilo, seja pela ajuda de fármacos, ingeridos por portadores em tratamento, ou através da sua própria atividade (WHO 2018). Dessa forma, o baixo pH, além da grande quantidade de lisozimas, lipases e proteases presentes no fagolisossomo, resultará na degradação proteica do produto internalizado e esse, será liberado para o meio extracelular através do processo de exocitose (Thorne, Oliver et al. 1976). Essa liberação por sua vez, consiste na fusão do fagolisossomo com a membrana celular (Porat-Shliom, Milberg et al. 2013). Para ocorrer esse processo, de maneira diferente da fagocitose, irá ocorrer uma despolarização dos filamentos de actina, favorecendo a ligação e a abertura da vesícula fundida a membrana celular, liberando assim o produto interno para o meio externo (Olivares, Gonzalez-Jamett et al. 2014).

As constantes fusões dessas vesículas com a membrana da célula, são caracterizadas por proteínas acessórias de lisossomos, que se tornam presentes na membrana celular, tendo como exemplos as proteínas denominadas Lamp (Lewis, Green et al. 1985). Além disso, estas fusões demonstram-se fundamentais para manter a homeostasia celular, mantendo assim o tamanho e a estrutura da membrana após subseqüentes internalizações (Gauthier, Rossier et al. 2009). Além dessa manutenção, esse processo auxilia a célula durante a fagocitose do patógeno, assim como no reparo da membrana celular (Encarnacao, Espada et al. 2016). Dessa forma, para acelerar o aumento da membrana celular na formação do copo fagocítico, como no reparo simples dessa estrutura, a célula recruta vesículas e algumas

organelas para fundir a sua membrana, gerando assim, um prolongamento rápido e eficiente (Weiss and Schaible 2015, Pu, Guardia et al. 2016, Wong, Gregory et al. 2017).

1.5. Vesículas de reciclagem

Concomitante ao processo de fagocitose, outros sistemas vesiculares como os endossomos de reciclagem (ER), são continuamente produzidos. Essas vesículas facilitam a formação do copo fagocítico, fazem o transporte intracelular, além de melhorar ações efectoras de citocinas (Salzman and Maxfield 1989).

Os ER são vesículas derivadas de fagossomos ou endossomos maduros, provenientes da fagocitose ou de processos autofágicos respectivamente (Imai, Hao et al. 2016). Essas estruturas têm como finalidade reciclar proteínas presentes nessas vesículas, para retorna-las para a membrana celular (Cox, Lee et al. 2000), como também, são utilizadas pela célula como mecanismo de transporte proteico, a exemplo de algumas citocinas, para serem então encaminhadas até a membrana da célula e sequencialmente liberadas para o meio externo (Manderson, Kay et al. 2007). Os ER são classificados conforme a velocidade e complexidade de reciclagem que envolve essas vesículas, podendo assim, ser denominados como ER rápido ou lento (Sheff, Daro et al. 1999, Grant and Donaldson 2009, Yudowski, Puthenveedu et al. 2009).

A diferença de classificação dessas duas estruturas ocorre devido ao tempo que leva para a sua formação, como também o trajeto no qual essa vesícula passa, possuindo assim funções diferentes conforme a necessidade da célula (Grant, Donaldson 2009). Apesar de pouco elucidada, é de conhecimento que os ER denominados rápidos, são vesículas formadas pouco tempo após a internalização do fagossomo, possuindo como função principal, reciclar proteínas de membrana, rapidamente de volta para a membrana celular em 2 a 3 minutos após a formação do fagossomo e, por não apresentarem estruturas clássicas de endossomos maduros com EEA1 e PI3P (Yudowski, Puthenveedu et al. 2009). Além disso, essas vesículas são mediadas por proteínas denominadas como Rab, sendo aqui predominantemente a proteína

Rab4 (Yudowski, Puthenveedu et al. 2009) e Rab35 (Kouranti, Sachse et al. 2006), sendo essas proteínas, fatores que possibilitam a análise e a caracterização dessas estruturas (Grant and Donaldson 2009).

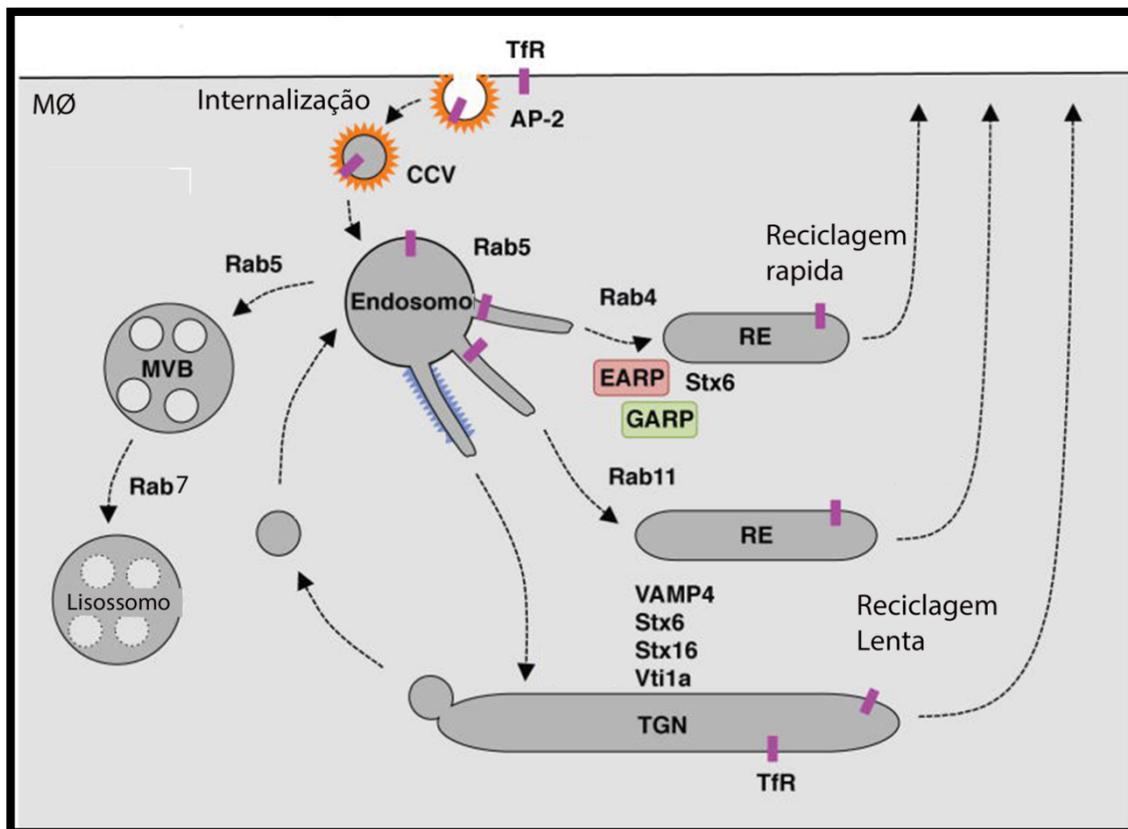


Figura 3 Representação esquemática das vias edossomais de macrófagos, abordando a formação de lisossomos e as vias de endossomos de reciclagem após a fagocitose. Adaptado de (Schindler, Chen et al. 2015).

Já o ER lento, recebe esse nome por ser formado de uma estrutura vesicular mais madura, ou seja, em uma etapa anterior a fusão do fagossomo com os lisossomos, onde o seu interior já apresenta uma característica ligeiramente ácida (Takahashi, Kubo et al. 2012). Essa estrutura apresenta características peculiares, sendo uma delas, a presença do receptor de transferrina (TfR), uma molécula que carrega íons de ferro para o interior da célula, que em macrófagos, apresenta em torno de 95% das suas moléculas recicladas para a membrana, tornando-se um alvo para estudos de ER. Além dessa característica, esse tipo vesicular tem como proteína mediadora principal a Rab 11, sendo que próximo a membrana recebe a modulação das GTPase CDC42 e Rac1 (Kobayashi and Fukuda 2013, Stanley, Wong et al. 2014).

Apesar de ter funções semelhantes ao ER rápido, o ER lento apresenta uma grande importância na célula, pois suas funções vão além de uma simples reciclagem para a membrana. Essa é descrita por apresentar um trajeto mais complexo até a saída da célula e, este fato, está relacionado com a função dessa vesícula em atuar no transporte proteico, uma vez que essa carrega citocinas do complexo de Golgi até a membrana plasmática da célula (Manderson, Kay et al. 2007). Por ser direcionado pela Rab11, essa vesícula, depois de desvinculada do endossomo maduro, associa-se com as proteínas do sistema de liberação do Golgi, denominadas como proteínas TGN (trans golgi network) (Sobajima, Yoshimura et al. 2018). As proteínas do TNG consistem em um conjunto dinâmico de microtúbulos e vesículas, localizadas na face trans do complexo de golgi, no qual tem como função, a interconexão com endossomos e sistema de envelopamento de glicoproteínas e glicolipídios para o seu direcionamento até a membrana plasmática (Stanley, Wong et al. 2014). Nesse momento, o ER recebem proteínas solúveis e proteínas que se ancoram a sua membrana, como por exemplo IL-6 e TNF- α , assim pode direcioná-las até a membrana celular e liberar estas citocinas para atuarem em seus respectivos receptores (Manderson, Kay et al. 2007, Stanley, Wong et al. 2014).

1.6. O TNF- α na tuberculose

O TNF- α apresenta um papel crítico na resposta imune inata e adaptativa, frente a diferentes patologias, como também na atividade homeostática de diferentes células do organismo (Old 1985, Grivennikov, Kuprash et al. 2006). Descrito primeiramente em macrófagos (Green, Dobrjansky et al. 1977), essa proteína pode, além de ativar, ser produzida por diferentes células do sistema imune (Cuturi, Murphy et al. 1987). Apesar de estar presente em diferentes patologias, o TNF- α pode sofrer diferentes regulações, sendo essas transcricionais, pós-transcricionais, translacionais e pós-translacionais (Falvo, Tsytsykova et al. 2010).

Para a produção de TNF- α , um estímulo inicial precisa ser gerado, e esse, pode ser decorrente da ativação de um receptor, como os da família TLR

(Beutler, Krochin et al. 1986), de receptores para citocinas como a IFN- γ (Collart, Belin et al. 1986) e do próprio TNF- α (Spriggs, Imamura et al. 1987). Essas sinalizações, levam a ativação e modulação de proteínas e fatores transcricionais, na qual ligam-se a região promotora de 200 pb do gene no TNF- α , induzindo a sua transcrição (Shakhov, Collart et al. 1990). Dentre os diferentes estímulos gerado pela instalação do processo inflamatório, a Mtb induz a produção dessa citocina, através da ativação de diferentes receptores, como mencionado anteriormente. Apesar das diferentes formas de induzir esse estímulo, a infecção pela Mtb, resulta no recrutamento de fatores transcricionais específicos para a região promotora do TNF- α , gerando uma elevada e continua expressão do RNA e conseqüentemente a grande transcrição desta proteína (Barthel, Tsytsykova et al. 2003).

Uma vez produzido, o TNF- α é estocado no complexo de Golgi, até que ER associem-se as proteínas do TGN, favorecendo assim a transferência dessa citocina, para dentro da vesícula transportadora (Shurety, Merino-Trigo et al. 2000). O TNF- α tem como característica, apresentar uma calda transmembranar, ou seja, essa citocina possui uma proteína acessória de 212 amino ácidos, na qual à sustenta e à torna estável na membrana da célula (mTNF) (Manderson, Kay et al. 2007). Na membrana, ele é liberado como trímero solúvel (sTNF) através da clivagem da sua porção transmembrana (Kriegler, Perez et al. 1988), por uma metaloproteinase denominada como ADAM17 (Enzima conversora de TNF- α), o que a torna diferente de outras citocinas solúveis como IL-6, a qual é liberada diretamente na exocitose vesicular (Algood, Lin et al. 2004, Hirayama, Awano et al. 2017).

Quando descoberto, o TNF- α transmembranar era considerada uma pró-citocina, por ser uma proteína transitória na membrana celular (Kriegler, Perez et al. 1988). No entanto, já é de conhecimento que esta proteína apresenta estabilidade prolongada na superfície da célula, ou seja, não é necessariamente uma proteína passageira uma vez que esta atua diretamente em receptores presente em células adjacentes (Parry, Sebbag et al. 1997, Dibbs, Diwan et al. 2003, Diwan, Dibbs et al. 2004). Estando solúvel ou na forma transmembranar, o TNF- α tem como capacidade ativar seus respectivos receptores. Apesar de serem proteínas similares, existem receptores seletivos

para cada uma das formas, onde estes receptores são denominados como TNFR1 (ou TNFRp55) e TNFR2 (também denominado como TNFRp75) (Rossol, Meusch et al. 2007). Esses receptores possuem afinidades diferentes conforme o tipo de TNF- α presente. Nesse caso, o receptor do tipo 1 apresenta alta afinidade pela proteína solúvel, enquanto o do tipo 2, esta mais associado a proteína ancorada na membrana celular (Grell, Wajant et al. 1998) e, conseqüentemente, o estímulo de cada tipo de receptor, resulta em uma resposta diferente (Wajant, Siegmund 2019). Dessa forma, a ativação do receptor do tipo 1, leva a um primeiro estágio excitatório da célula, resultando na produção de radicais de peróxido, gerando proliferação de células pró inflamatórias, ou até levando à uma resposta mais agressiva, como ativar vias de morte celular (apoptose e necrose celular). Dessa forma, a ativação dessa proteína, leva ao acoplamento de outras duas estruturas TRADD (“TNFR1-associated death domain”) e a RIPK1 (“Receptor interacting protein kinase-1”) (Devin, Lin et al. 2001). Uma vez acopladas, essa nova estrutura vai direcionar a célula para um estágio pró-inflamatório. Isso ocorre devido ao recrutamento de um complexo proteico onde incluem-se proteínas como a LUBAC (“ligase linear ubiquitin chain assembly complex”), TAK1 (TGFB- activated kinase 1) e a IKK (inhibitor of kappa B kinase complex) como revisado por Wajant e colaboradores (2011), favorecendo assim, a ativação da via clássica do NF κ B e a sua translocação para o núcleo. Com o tempo de estímulo, o primeiro complexo formado pelo receptor junto com as proteínas, TRADD e RIPK1 é internalizado. Enquanto que o receptor é reciclado, o complexo junta-se com proteínas RIPK3 e a caspase 8, assim, dependendo do estado celular e de estímulos adjacentes, essa célula pode ser endereçada a apoptose ou a necroptose (Wajant and Scheurich 2011, Brenner, Blaser et al. 2015, Fritsch, Zingler et al. 2017).

Apesar de ambos os receptores terem estruturas semelhantes, o fato de apresentarem estabilidade para tipos diferentes de ligantes (sTNF e mTNF), essa característica às tornam moléculas funcionalmente diferentes uma da outra (Dibbs, Diwan et al. 2003, Diwan, Dibbs et al. 2004). O receptor do tipo 2, diferente do tipo 1, está mais relacionada a proliferação celular e não ao estímulo direto da morte dessas células (Balcewicz-Sablinska, Keane et al. 1998, Wajant and Siegmund 2019; PIMENTEL-MUIÑOS et al., 1999). Por outro

lado, a ativação concomitante dos receptores do tipo 1 e 2, resulta na regulação ativa do receptor do tipo 1. Dentre a sinalização proveniente desse complexo formado, a coestimulação desses receptores, aumentam a liberação e a degradação da proteína TRAF2. A TRAF2 por sua vez, é caracterizada no receptor do tipo 1, por levar a ativação da cascata do NF κ b (Siegmund, Kums et al. 2016), como também ao ser desacoplada do sistema, resulta na liberação do TRADD o que induz o recrutamento da caspase 8 para esse complexo, levando assim a indução da morte celular (Fotin-Mleczeck, Henkler et al. 2002).

Durante o processo de produção e liberação do TNF- α , algumas etapas podem ser moduladas pela célula. Um tipo de interferência na ação dessa citocina, ocorre quando a célula entra em estado de hipóxia. Nessa circunstância, independente do estímulo, a célula para de liberar o TNF- α produzido para o meio externo, o qual passa então a ser direcionado para lisossomos e degradado por proteases presente nessa vesícula (Lahat, Rahat et al. 2008). Por outro lado, quando direcionado para a membrana celular, o TNF- α será ancorado na membrana celular, e para se tornar solúvel, necessita ser clivado pela ADAM17 (Hirayama, Awano et al. 2017). Já essa metaloproteinase, apresenta sua atividade enzimática regulada por reguladores endógenos denominadas Timp, que por sua vez atuam evitando a liberação do TNF- α em um estado basal da célula, como também agem evitando a exacerbação do processo inflamatório durante a infecção (Schubert, Collins et al. 2019).

Tanto a contenção quanto a rápida liberação do TNF- α estão presentes em diferentes células que possuem a capacidade de produzir essa citocina (Cruz, Frank et al. 2004). Dentre essas, os mastócitos apresentam a rápida liberação dessa proteína por apresentarem grandes quantidades de TNF- α naturalmente estocados em vesículas (Olszewski, Groot et al. 2007). Já outras células como os macrófagos, não apresenta estoque dessas proteínas no meio intracelular, mesmo que essas apresentem uma produção basal de TNF- α (Pallai, Kiss et al. 2016). Essa liberação basal da célula, como mencionado anteriormente, pode tanto ser degradado em lisossomos, como também podem ser encontrados primordialmente na forma transmembranar. Assim, durante a infecção ou por decorrer de uma rápida estimulação, a célula realiza uma

imediate liberação dessa proteína (Lahat, Rahat et al. 2008, Pallai, Kiss et al. 2016).

Na infecção pela Mtb, o TNF- α atua como um fator importante para a resolução da patologia (Chawla, Parikh et al. 2012). Essa citocina oscila entre uma ação pró-hospedeiro quanto na piora da doença (Botha and Ryffel 2003, Welsh, Abbott et al. 2008). Durante o estágio inicial, como citado anteriormente, o primeiro reconhecimento da Mtb ocorre por exemplo, através de receptores como os TLR2 levando a uma primeira produção de TNF- α (Brightbill, Libraty et al. 1999), que por sua vez, ao atuar nas células adjacentes leva a um aumento na produção de óxido nítrico e outros radicais intracelulares, favorecendo a célula na contenção da bactéria dentro do granuloma (Ehlers, Kutsch et al. 1999). Outro fator fundamental é a participação desta citocina como quimioatratador de células na formação do granuloma, atuando principalmente em linfócitos T. Dessa forma, essa proteína é considerada uma das principais citocinas durante a infecção por esse patógeno (Rajaram, Ni et al. 2011, Silva, Silva et al. 2018).

Por outro lado, durante a infecção, a Mtb secreta proteínas que atuam como um loop positivo de produção de TNF- α , isso apesar de favorecer inicialmente o hospedeiro, inicia um processo contínuo de morte celular. Esse processo por sua vez, leva a mudanças na estrutura do granuloma, formando um núcleo caseoso e necrótico, favorecendo assim um processo inflamatório maior e causando, não apenas o escape e a disseminação do patógeno pela tosse do hospedeiro, mas também levando a disseminação interna do patógeno para outros tecidos. Dessa forma, observa-se um balanço delicado que essa proteína gera durante o desenvolvimento da patologia (Fig. 4).

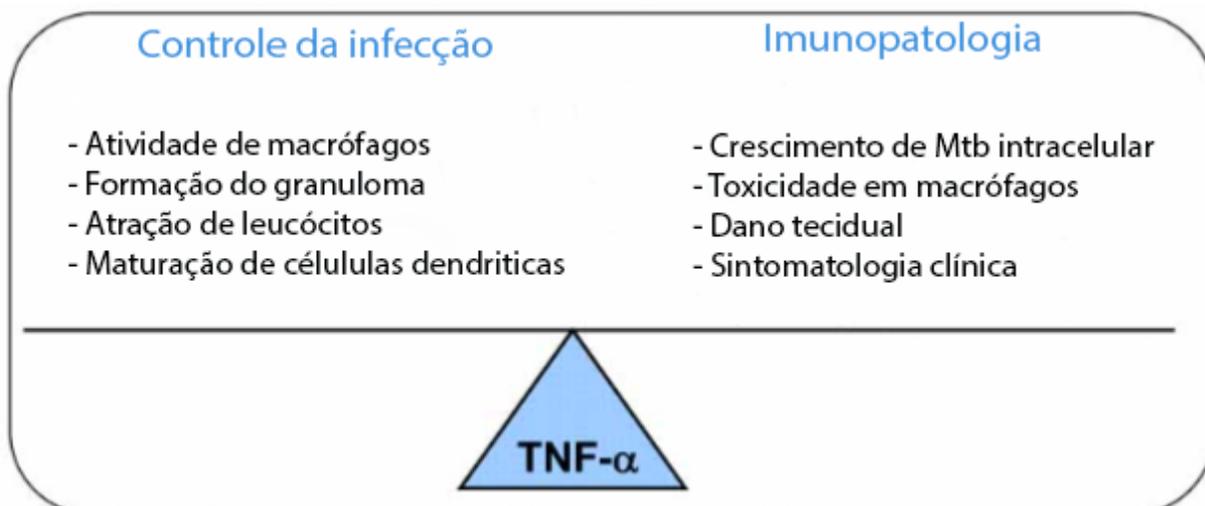


Figura 4 Figura esquemática do balanço do TNF durante as diferentes fases da infecção pela Mtb.

Com esse conjunto de informações, compreende-se que o TNF- α está presente em todos os estágios da infecção e isso, inclui a rápida liberação quando essa citocina encontra na superfície de macrófagos (Pallai, Kiss et al. 2016). Concomitante a isso, resultados prévios do nosso grupo demonstraram que a sMTL-13 de Mtb, tem uma importância direta com o TNF- α produzido no macrófago infectado, uma vez que o bacilo mutante para o gene Rv1419, que tem a ausência da lectina sMTL-13, além de reduzir a capacidade de ligação célula-bactéria, também apresenta um processo ativação celular diferenciado, visto que a rápida liberação do TNF- α não acontece. Curiosamente, apesar de não ser encontrada a mesmas quantidades dessa citocina durante a infecção pela bactéria mutante, o seu crescimento bacteriano e principalmente a expressão do mRNA para o TNF- α da célula infectada, se demonstra igual a infecção pela Mtb H37Rv (Morales et al. 2014). Essas informações confirmam que a sMTL-13 apresenta um papel importante para a ação do TNF- α , confirmando os achados de Souza e colaboradores (2012), nos quais demonstraram que essa lectina tem uma ação antigênica própria, apresentando a capacidade de induzir a liberação de citocinas quando esta lectina foi utilizada isoladamente.

2. HIPÓTESE

Dessa forma, com base no balanço sensível em que o TNF- α age durante os diferentes estágios de infecção pela Mtb, e junto a isso, a característica de uma lectina atuar como um fator de ativação celular, hipotetizamos que a Mtb, utiliza a sMTL-13 como um fator de virulência bacteriana, ao modular a secreção de TNF durante a infecção.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a influência da sMTL-13 na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* em modelo murino.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a infecção, perfil de virulência e padrões inflamatórios em tecidos de camundongos infectados pela Mtb na ausência da sMTL-13;
- Avaliar a influencia da sMTL-13 de Mtb no processo de fagocitose de macrófagos murinos;
- Avaliar a influencia da sMTL-13 de Mtb na homeostasia vesicular e na exocitose de macrófagos infectados;
- Investigar os mecanismos pelo qual a sMTL-13 de Mtb modula o TNF- α pela produzido em macrófagos durante a infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen), Penicillin, Salina (soro fisiológico), SBF (soro bovino fetal – Gibico), HEPES, Piruvato de sódio, L-glutamina, Tripsin (Lonza), meio sólido Lowestein-Jensen (Laborclin), D-galactose (sigma), Syto24, Paraformaldeido, Saponina, Albomina bovina fração IV, xilol, Álcool etílico, álcool metílico, peróxido de hidrogênio, avidina, DAB, Elisa kit TNF- α mouse, Elisa kit IL-06 mouse, LPS ultra, Phaloidin, FMLP, DAPI, zymozan, halo transferrina, membrana de nitrocelulose, ECL, anti-TNF- α PE (BD), anti-mouse avidin (Thermo fisher), anti-CD40 Fitc (BD), anti Adam17 (abcan), anti-TNFR1 (abcan), anti-Rab7 Fitc (BD), anti-Rab5 Fitc (BD), anti-Rab5 (Santa Cruz), Anti-Rab7 (Santa Cruz), anti-lamp1(CD107a)Fitc (BD), anti-lamp1 (santa cruz), primers: **Adam17 F:** CCT GAT GGG CTA GCA GAA TG **Adam 17 R:** TGT TGC TGC GCT CCT GGA AG **TNFR1 F:** CCG GGA GAA GAG GGA TAG CTT **TNFR1 R:** TCG GAC AGT CAC TCA CCA AGT **TNFR2 F:** CAG GTT GTC TTG ACA CCC TAC **TNFR2 R:** GCA CAG CAC ATC TGA GCC T.

4.2. Animais

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados camundongos BALB/C com 6 semanas de idade. Eles receberam água e alimento em regime *ad libitum*, mantidos em ciclos claro/escuro de 12 h com temperatura de 22°C \pm 2. Esses animais foram manipulados no laboratório da professora/colaboradora Ana Paula Junqueira Kipnis, na Universidade Federal de Goiás (UFG).

Para os experimentos *in vitro*, camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, com idade entre 8 e 12 semanas, foram utilizados para a coleta da medula óssea do Fêmur e da Tíbia, para a diferenciação em macrófagos primários. Os animais foram mantidos em caixas de acrílico com

maravilha autoclavada e em estantes ventiladas. Eles receberam água e alimento em regime *ad libitum*, mantidos em ciclos claro/escuro de 12 h com temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2$. O uso dos animais para experimentação deste projeto, foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA-UFSC) sob protocolo 8278290818

4.3. Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

Para a realização desse projeto, foram utilizadas *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) cepa laboratorial H37Rv e Mtb ΔRv1419 , na qual apresenta a ausência do gene Rv1419 em seu genoma e conseqüentemente, a ausência da proteína sMTL-13 na sua parede celular e no CFP secretado (Nogueira et al, 2010). As colônias de Mtb foram cultivadas em meio sólido Lowestein-Jensen, a partir de repique semanais de suspensões de amostras congeladas a -20°C . Esses cultivos foram mantidos a 37°C por 30 dias para obtenção das colônias. Todos os experimentos com Mtb foram realizadas em fluxo laminar classe B3, conforme as normas de biossegurança.

4.4. Infecção *in vivo* e curva de mortalidade

Para determinar a infectividade e a capacidade de sobrevivência desses animais, frente a Mtb H37Rv e Mtb ΔRv1419 , foi realizado uma curva de sobrevivência durante 200 dias, após a infecção por ambas as bactérias. A infecção foi realizada por via intravenosa, utilizando 100 μl de uma escala macfaland (3×10^8 bacterias/ml) feita em solução de PBS + 0,05% de Tween 80. Para tal, os animais foram contidos e anestesiados utilizando Isufurano e a infecção, realizada por via intravenosa. Estes experimentos *in vivo* foram realizados em colaboração com o laboratório coordenado pela professora Ana Paula Junqueira Kipnis, na Universidade Federal de Goias.

4.5. Crescimento bacteriano em tecido

Para determinar a infiltração e o crescimento bacteriano em diferentes tecidos, após 14, 28 e 56 dias de infecção, animais foram anestesiados com isofurano e sequencialmente, eutanasiados para coleta do rim, baço e fígado. Após a coleta, os órgãos foram avaliados quanto ao aspecto e tamanho e em sequencia, lisados e homogeneizados usando PBS + 0,05% de tween 80. Esses homogenatos foram diluídos e plaqueados em ágar 7H10, propício para o crescimento de Mtb. Após 30 dias, foi realizada a contagem de colônias formadas e o cálculo do UFC, foi determinado a partir da relação entre o numero de colônias, a diluição relativa e o volume plaqueado, denominando assim, o resultado como UFC/ml (unidades formadoras de colônias por ml).

4.6. Histologia de pulmão

Para a análise histopatológica, os animais foram selecionados depois de 7, 28 e 56 dias de infecção com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, eutanasiados, perfundidos e os seus pulmões coletados. Esses tecidos foram fixados com PFA 10% por 48h e conservados em álcool 70% a 4°C até o dia do processamento. Após todos os tecidos estarem acondicionados, esses passam por banhos de graduações crescentes de álcool (80, 90 e 100%). Uma vez desidratado, esses tecidos passam por banhos consecutivos de álcool + xilol (50%) e xilol (100%), para a retirada do álcool do tecido. Ao término, essas peças passam por banhos de parafina até serem emblocadas em parafina, ficando prontos para serem cortados e corados.

Uma vez cortado e fixado na lamina, esses cortes são desparafinizados (com banhos de xilol) e hidratados, (com banhos decrescentes de álcool), para em sequencia, serem corados com Hematoxilina e Eosina. Dessa forma, a coloração favorece o reconhecimento de infiltrados celulares, além de modificações estruturais no tecido frente às diferentes infecções. Essas imagens foram realizadas em campo claro, em microscópio Olympus Bx 41.

4.7. **Imunohistoquímica**

Para realizar a análise da produção de citocinas, em tecidos de camundongos infectados com Mtb, foi utilizada a técnica de peroxidase para marcação do TNF- α . Dessa forma, pulmões de camundongos após 28 e 56 dias de infecção com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 foram processados em parafina, cortados e montados em lâminas. O processamento ocorreu a partir da desparafinização das lâminas, onde essas passaram por banhos em concentrações decrescentes de xilol e álcool, sendo essas: xilol 100% mistura 1:1 entre xilol e álcool, álcool em concentrações decrescente, de 100 até 70%. A amostra passou por uma incubação com glicina 0,1 M para bloquear os radicais de aldeído, outra incubação com peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da peroxidase endógena, e por fim, o bloqueio de sítios inespecíficos com solução PBS/BSA 2% com 0,01% de saponina. A marcação ocorreu através incubação com anticorpo primário anti-TNF (1:100), secundário anti-Rat biotilado (1:100), seguido por um anti-vidina HRP (1:100). A amostra foi revelada com DAB conforme descrito na instrução do fabricante. Para melhor visualização do tecido, esses foram contrastados com solução de Hematoxilina. Por fim, o tecido passou por banhos crescentes de álcool e xilol para desidratar o tecido e finalizar a montagem da lâmina. Essas imagens foram realizadas em campo claro, em microscópio invertido Olympus IX 83.

4.8. **Macrófagos derivados de medula óssea**

Camundongos da linhagem C57BL/6, foram eutanasiados e os membros posteriores foram coletados e dissecados em fluxo laminar, para a obtenção do fêmur e da tíbia. Os ossos foram mantidos em tubos contendo meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) com Penicillin (diluição 1:100) para armazenamento e transporte, até o momento da coleta da medula óssea. Em condições assépticas, as extremidades de cada osso foram removidas com o auxílio de uma lâmina de bisturi e utilizando uma seringa de (12 gauges). A medula de cada osso foi removida utilizando de 5 a 10 ml de soro fisiológico

estéril. A suspensão final de células foi centrifugada a 450 g por 5 min e o sobrenadante descartado. O pellet de células foi ressuspendido com 36 ml meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal previamente inativado (SBF), 20% de sobrenadante de células L929, HEPES 25 mM (diluição 1:40), Piruvato de sódio 1 mM (diluição 1:100) e L-glutamina 2 mM (diluição 1:100), plaqueadas em placas de 6 poços (3 ml/ poço) e mantidas em incubação à 37°C/5%CO₂. Após 5 dias de incubação, foi adicionado mais 2 ml do mesmo DMEM suplementado por poço. Essas células, foram mantidas por um período total de 7 dias para a diferenciação dos macrófagos. Ao término da diferenciação, o sobrenadante foi descartado e cada poço lavado com 1ml de Salina. Sequencialmente foi adicionado 700 µL de Tripsina 0,05% e incubado por 5 min a 37°C. Essas células foram retiradas do poço com um auxílio de uma pipeta, para realizar o jateamento dessas células e essas, foram condicionadas em meio DMEM contendo 10% de SBF para inativação da Tripsina. Essas células foram centrifugadas a 450 g por 5 min, contadas e plaqueadas conforme o protocolo experimental com DMEM suplementado com 10% de SBF, HEPES 25 mM, Piruvato de sódio 1 mM e L-glutamina 2 mM.

4.9. Sobrenadante de L929

Células L929 foram descongeladas, lavadas com salina e cultivadas com DMEM suplementado com 20% de SBF em garrafas de cultura (Kavis). Para cultivo e produção do sobrenadante de L929, essas células foram retiradas das garrafas com auxílio de Tripsina 0,05% durante 5 min a 37°C /5%CO₂. Essas células foram lavadas a 450 g por 5 min, contadas e plaqueadas em garrafas de 150 cm² em concentração de 3x10⁶ células por garrafa, com 20 ml de DMEM suplementado com 20% de SBF. No dia seguinte foi adicionada à cada garrafa, 80 ml de DMEM com SBF e cultivadas a 37°C/5% CO₂. Após 7 dias de cultivo, o sobrenadante foi coletado, utilizando uma pipeta sorológica estéril, sequencialmente filtrado em filtro 0,22 mm e congelado a -20°C em alíquotas de 40 ml em tubo. Após a coleta, foi adicionado 100 ml de meio DMEM suplementado com 20% de SBF para a produção de uma segunda leva de sobrenadante. Após 7 dias o processo de

coleta foi repetido e as células foram retiradas da garrafa utilizando Tripsina. Essas células foram lavadas e congeladas em alíquotas de 1×10^7 células por criotubo, utilizando 90% de SBF, com 10% DMSO estéril, em nitrogênio líquido. 1×10^6 dessas células foram separadas para avaliar a presença de micoplasma.

4.10. Infecção de macrófagos por *M. tuberculosis*

Com o auxílio de um palito de madeira previamente autoclavado e em ambiente asséptico, as colônias foram coletadas do meio sólido e depositada em um tubo de vidro, contendo 7 microesferas de vidro. Após vedado, esse tubo foi homogeneizado em vortex por 20 segundos. Após 20 min de descanso em temperatura ambiente, o tubo foi aberto e adicionado 1 ml de salina, fechado e novamente homogeneizado em vortex por 20 segundos. Após 20 min da segunda homogeneização, foi utilizado um segundo tubo sem conter as esferas para diluir a suspensão bacteriana, até que a mesma ficasse visualmente igual a escala 1 Mc farland, caracterizada pela concentração de 3×10^8 bactérias por ml. As escalas de Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, foram realizadas separadamente, seguindo a ordem de primeiro preparar a suspensão da Mtb Δ Rv1419 e após o término, era feito a suspensão da Mtb H37Rv, para evitar contaminação cruzada e comprometer os resultados subsequentes. Para realizar a infecção e a definição do MOI (quantidade de bactéria por célula cultivada), primeiro era realizado o plaqueamento das células conforme as condições experimentais. Dessa forma, tendo o conhecimento do número de células presentes em cada poço, 1 ml da suspensão bacteriana foi centrifugado em eppendorf de 1,5 ml a 20.000 g por 30 min e o pellet ressuspendido em 1 ml de DMEM com 10% de SBF. A partir dessa suspensão de Mtb em DMEM, ocorria a infecção e, essas células infectadas, eram mantidas em cultivo a 37°C/5% CO₂ conforme o tempo de cada protocolo experimental.

4.11. Ensaio de bloqueio da sMTL-13 por D-Galactose

O ensaio de bloqueio da sMTL-13 de Mtb, visa saturar todas os possíveis epítomos da sMTL-13 presentes na parede da bactéria. Para isso, foi demonstrado por técnicas de bioinformática (Item 4.25), que essa lectina apresenta um sitio hipotético de interação com a galactose (Fig. 15B). Além disso, resultados preliminares do laboratório demonstraram que 0,2 M de D-galactose, é capaz de reduzir a interação entre Mtb com o macrófago, sugerindo um bloqueio da lactina na superfície celular. Para isso, após realizar a suspensão das colônias de bactérias em escala de 1 McFaland conforme protocolo item 4.6, 1 ml dessa escala foi centrifugada a 20.000 g por 30 min e o sobrenadante desprezado. O pellet de bactéria foi cuidadosamente ressuscitado em 200 µl de D-galactose (0,2 M) por 1 h em gelo. Após esse tempo de incubação, essa bactéria foi lavada com 1 ml de salina, em centrifugação de 20.000 g por 30 min. Após esse tempo de centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o pellet bacteriano foi ressuscitado em 1 ml de meio DMEM, suplementado com 10% de SBF e em seguida utilizado para fazer a infecção na concentração de 3×10^8 bactérias por ml.

4.12. Coloração de *M. tuberculosis* por Syto24

Para coloração da Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, 1 ml de cada escala 1 Mc Farland era acondicionado em tubos de 1,5 ml e nele, adicionado 0,5 µl de Syto24 1 mM. Essa suspensão foi homogeneizada em vortex por 30 segundos e incubada a 37°C por 30 min. Após a incubação, essas bactérias foram centrifugadas a 20.000 g por 30 min e sequencialmente lavadas com 1 ml de salina em uma nova centrifugação de 20.000 g por 30 min. Ao término, o sedimento de bactéria foi ressuscitado em 1 ml de DMEM suplementado com 10% de SBF.

4.13. Ensaio de interação célula-bactéria

O ensaio de interação entre célula hospedeira e o patógeno alvo identifica a capacidade de reconhecimento da célula perante o patógeno em

estudo. Realizar essa análise a 37°C, favorece o processo de fagocitose desenvolvido pela célula enquanto que a mesma análise a baixa temperatura, indica apenas a capacidade simples de reconhecimento e ligação. Dessa forma, para realizar esse ensaio a 37°C, macrófagos de medula óssea foram plaqueados na concentração de 1×10^6 por ml, infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 em MOI de 10, coradas com Syto 24 e, incubados a 37°C/5% CO₂ conforme os tempos de infecção, protegidos da luz. Ao término, essas células foram lavadas com salina, incubadas com Tripsina 0,5%, por 5 min a 37°C e em seguida, as células foram retiradas do poço. Após a coleta das células, essas foram lavadas com 1 ml de salina, em centrifugação com salina a 450 g. Após lavagem, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com PFA 4% durante a noite, até ser adquirida por citometria de fluxo no dia subsequente.

Já para estudo de interação célula-bactéria, as células foram colocadas em tubos de 1,5 ml e deixadas em descanso por 1h a 37°C/5% CO₂. Após esse período as células foram infectadas nas mesmas condições descritas anteriormente e incubadas em gelo por 1h. Após o término da incubação, essas células foram lavadas com 1 ml de salina, e centrifugada a 450 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas com PFA 4% durante a noite, até ser adquirida por citometria de fluxo.

4.14. Citometria de fluxo

Para marcação e análise por citometria de fluxo, ao término do tempo de infecção, o sobrenadante de cada poço era coletado e armazenado a -20°C. A cada poço foi adicionado salina no mesmo volume que continha de meio de cultura, para realizar a lavagem desse poço e após a retirada da salina, foi adicionado Tripsina. Essas placas foram incubadas a 37°C por 5 min e sequencialmente as células foram retiradas com o auxílio de uma pipeta. Após a retirada das células, essas foram acondicionadas em tubos com meio DMEM + 10% SBF. Para a retirada do SBF, essas células foram lavadas com 1 ml de salina e centrifugadas a 450g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e para a marcação de proteínas de superfície, esse pellet foi incubado com uma

solução de volume final de 20 μ l, contendo: 0,2 μ l de Fc blocker, os anticorpos conforme a concentração de cada um e FACs Buffer (salina com 1% de SBF), para completar o volume. Após 1 h incubando a 4°C (geladeira, protegido da luz), essas células foram lavadas com 1 ml de salina e centrifugadas a 450 g por 5 min. O pellet foi resuspendido em 200 μ l de solução de paraformaldeído 2% a 4°C (geladeira, protegido da luz) até o dia seguinte, para fixação da célula e morte da Mtb, quando foi adquirido no citometro de fluxo.

Para análise de proteínas intracelulares, após o termino da marcação das proteínas de superfície (quando necessário), as células eram fixadas utilizando 200 μ l de paraformaldeído 2% durante 15 min a 37°C. Essas células foram então lavadas, com 1 ml de salina e centrifugada a 450g por 10 min. Sequencialmente, o sobrenadante foi desprezado, as células ressuspendas em 1 ml de Saponina 0,5% e centrifugada a 300 g por 10 min, para ocorrer a permeabilização de membrana. Ao término, o sobrenadante foi desprezado com cuidado e as células, resuspendas em um volume final de 20 μ l de saponina 0,5%, contendo: 0,2 μ l de Fc Blocker e os anticorpos utilizados para a marcação necessária. Por fim, essa solução foi incubada a 4°C (geladeira, protegido da luz) por 1h. Após a incubação, essas células foram lavadas com 1 ml de Saponina 0,5% e centrifugadas a 300 g por 10 min. Se necessária uma marcação com anticorpo secundário, o mesmo protocolo é repetido para a incubação com o anticorpo secundário e ao final, o sobrenadante de Saponina é desprezado, e as células ressuspenda em 200 μ l de salina e acondicionadas a 4°C (geladeira, protegido da luz) até serem adquiridas pelo citometro de fluxo.

Depois de adquirido, as amostras foram analisadas baseadas na estratégia de gate inicial. Para isso, as amostras foram selecionadas para a retirada da autofluorescência através do canal do PercP pelo SSC. Destas, foram selecionadas as amostras simples para a retirada de eventos duplos, através do FSC-H por FSC-A. A partir da população final, foi selecionado a amostra de interesse a partir do canal aberto (PercP) pelo canal referente, onde esse gate foi determinado a partir da população não marcada conforme Fig. 5

Estratégia de Gate

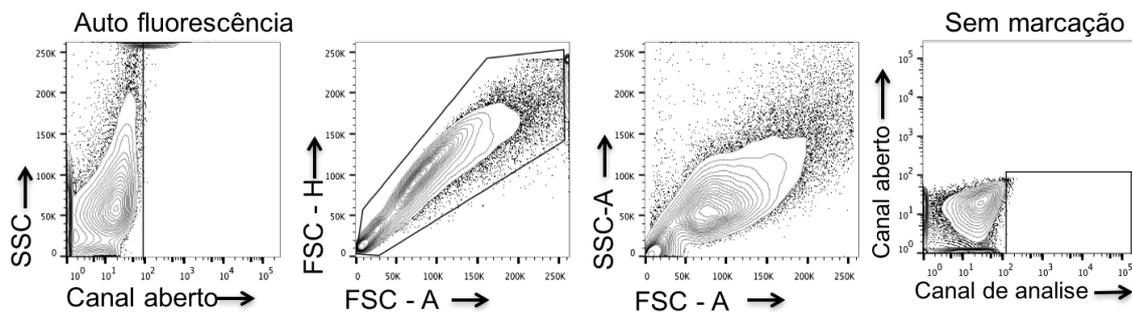


Figura 5 Estratégia de Gate. Estratégia padrão para análise por citometria de fluxo. Da esquerda para a direita: A retirada da autofluorescência, retirada das células duplas, amostragem total da população e o controle da amostra sem marcação, respectivamente

4.14.1. Análise de proteína intracelular por citometria de fluxo

Uma forma de analisar a produção intracelular de proteínas é através da marcação de citometria, para proteínas intracelulares. Para isso, células que secretam citocinas de forma constante, precisam ter o seu sistema de secreção interrompido, para que a proteína se acumule para melhor eficiência do método. Dessa forma, macrófagos de medula óssea plaqueados em concentração de 1×10^6 células/ml são estimuladas com 1 mM de brefeldina, 1h antes da infecção. O estímulo prévio paralisa o complexo de golgi, acumulando as citocinas no interior da célula. Após a infecção, a célula passou pelo processo de marcação intracelular e em seguida, foi analisado por citometria.

4.15. Microscopia de fluorescência

A avaliação de uma célula por microscopia de fluorescência pode demonstrar não apenas as intensidades de fluorescência que uma proteína alvo emite quando sinalizada, mas também é capaz de demonstrar

características morfológicas e de movimentação de estruturas intracelulares, conforme o estímulo que essa célula recebe. Para realizar a marcação celular para essa técnica, após o término do tempo de infecção, os sobrenadantes dessas células foram desprezados e o poço, lavado 3 vezes com 500 μ l de PBS cada. Após desprezar o PBS, essas células foram fixadas por 30 min, com 200 μ l uma solução de PFA 2%/PBS em temperatura ambiente. Após o tempo de fixação, o fixador foi desprezado e o poço lavado 3 vezes com 500 μ l com PBS. Em caso de marcações intracelulares, após desprezar o PBS, as células foram incubadas com 200 μ l de Triton x-100 0,2%/PBS por 5 min a TA e, em caso de marcação de superfície, essa etapa não ocorreria. Após a permeabilização com Triton x-100, as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS e, incubada com 500 μ l de solução de bloqueio, BSA 2%/PBS, por 1h a TA. Após o término do bloqueio, a solução foi desprezada e as células incubadas com o anticorpo primário, em 100 μ l da solução de bloqueio, por 1h a TA. Após o término da marcação com o anticorpo primário, essa solução foi coletada e o poço lavado 5 vezes com 500 μ l PBS, e em seguida, incubado por 1h a TA com 200 μ l de solução contendo o anticorpo secundário, em solução de bloqueio. Ao término da incubação, o poço foi novamente lavado 5 vezes com 500 μ l PBS, incubado com DAPI 1 μ g/ml por 15 min e por fim, lavado novamente mais 2 vezes com 500 μ l PBS. Para finalizar, essa lamínula foi retirada do poço e montada em laminas com a utilização de ProLong®.

4.16. Ensaio de polimerização de actina

Esse ensaio demonstra a capacidade de polimerização dos filamentos de actina, no qual que uma célula esta realizando, conforme o estímulo recebido, ou devido a atividade homeostática que ela está desenvolvendo. Para realizar essa análise, duas mensurações foram efetuadas, sendo a primeira por citometria de fluxo e a segunda, confirmada por microscopia de fluorescência.

4.16.1. Ensaio de polimerização por citometria de fluxo:

Para realizar essa análise, macrófagos foram plaqueados na concentração de 1×10^6 células por ml. Após 12h de descanso à $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$, essas células foram expostas a Mtb H37Rv e Mtb $\Delta\text{Rv}1419$ em MOI de 10, previamente coradas com Syto24. Após diferentes tempos de infecção, as células foram retiradas dos poços com tripsina 0,5%, fixadas com PFA 4% e permeabilizadas com Triton 0,2%, conforme protocolo de marcação intracelular para citometria. Por fim, essas células foram ressuspensas com *Phaloidin-Rodamin*, na diluição 1:300 em solução de PBS/BSA 1%, por 1h a 4°C para coloração da actina. Sequencialmente, essas células foram lavadas com PBS 450g por 5 min, para ser adquiridas no citometro de fluxo.

4.16.2. Ensaio de polimerização por microscopia de fluorescência

Para realizar a avaliação da polimerização de actina por microscopia de fluorescência, macrófagos foram plaqueados em concentração de 1×10^5 células por poço, sobre lamínulas circulares de 15 mm, previamente colocadas em placas de cultura de 24 poços e, deixadas em descanso por 12h à $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Essas células foram expostas a Mtb H37Rv e Mtb $\Delta\text{Rv}1419$ em MOI de 10, coradas com Syto24. Após diferentes tempos de infecção, essas células foram lavadas 3 vezes com 1 ml de PBS (para cada lavagem), fixadas e permeabilizadas conforme protocolo de marcação intracelular para microscopia de fluorescência. Por fim, essas células foram incubadas com 200 μl *Phaloidin-Rodamin*, na diluição 1:300 em solução de PBS/BSA 1%, por 1h a TA e sequencialmente, lavadas com PBS e incubadas com DAPI $1\mu\text{g}/\text{ml}$ por 15 min. Ao termino, essas lamínulas foram retiradas dos poços e montadas em laminas utilizando ProLong® (Becton Dickinson).

4.17. Western blot

A técnica de Western blot, é amplamente utilizada para estimar as proteínas presente em um tecido, ou em uma célula. No entanto, essa técnica

também pode ser utilizada para avaliar processos de fosforilação, quantificação proteica em uma única porção celular, a exemplo de proteínas presentes na membrana, como também a translocação entre porções celulares (da membrana para o citosol). Para realizar essas análises, após o término dos diferentes tempos de infecções, o sobrenadante foi coletado e o poço lavado 1 vez com 500 µl salina. Ao desprezar a salina, essas células foram incubadas com tripsina 0,5%, por 5 min a 37°C e sequencialmente, as células foram retiradas dos poços com a utilização de uma pipeta. A tripsina foi inativada com o mesmo volume de DMEM + 10% de SBF e essas células, foram lavadas com 1 ml de salina, em centrifugação de 450 g por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensão em tampão de lise (RIPA), levado ao vortex por 30 segundos e incubado no gelo por 10 min, sendo esse processo de vortex e gelo repetido 3 vezes. Ao término da incubação, a solução foi centrifugada a 20.000 g por 20 min a 4°C, o sobrenadante coletado, dosado e congelado para futura análise. No dia da análise, a solução foi descongelada em gelo e diluída em tampão de corrida (tampão desnaturante). Essa nova solução foi fervida a 90°C por 5 min e ao término, aplicada no gel previamente feito, conforme a concentração necessária. A amostra foi resolvida por um tempo de 2h, com voltagem fixa em 120V. Após o término, o gel foi retirado do suporte e montado junto a membrana de nitrocelulose, conforme a especificação do equipamento, para ocorrer a transferência. Essa decorreu por 2h em voltagem fixa de 25v. A membrana foi então lavada com solução de lavagem, (TBS+0,05% de tween-20 por 5 min em agitação. Essa solução foi desprezada e a membrana então foi incubada com solução de ponceau por 1 min a TA, para confirmação da transferência, fotografada e novamente lavada com solução de lavagem. Após lavagem da membrana, essa foi incubada com solução de bloqueio (leite 5%/TBS+0,05 tween-20), por 1h em agitação a TA. Ao término do bloqueio, o mesmo foi desprezado e a membrana lavada 3 vezes por 5 min cada, com solução de lavagem e sequencialmente, a membrana foi incubada durante a noite em geladeira com o anticorpo primário, em tampão BSA2%/TBS com 0,05% tween-20. No dia seguinte, a solução foi coletada e congelada para reutilização futura e a membrana, lavada 3 vezes com solução de lavagem por 5 min cada. Essa membrana foi então incubada a TA, sob agitação com o anticorpo secundário, em tampão BSA2%/TBS 0,05%

tween-20, por 2h. Essa solução foi desprezada e a membrana lavada 3 vezes por 5 min cada, com solução de lavagem, e 2 vezes com TBS sem conter tween-20. Ao término a membrana foi incubada com ECL, por 1 ml e exposto em filme em sala escura, para a revelação.

4.17.1. Extração diferencial para proteínas de membrana

A separação diferencial de proteínas é uma técnica utilizada para separar porções proteicas específicas de células ou tecidos, como porção de membrana, núcleo e organelas. Para essa técnica, foi utilizado o protocolo modificado de VOPBA, para separação de proteínas de membrana de macrófagos infectados com Mtb, conforme descrito a seguir. Após a retirada das células com tripsina, foi adicionado o tampão de extração, contendo 100mM de Tris-HCl, 2 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 0,2% de Triton--100 e 5 µL de inibidor de proteinase. Dessa forma, foi adicionado 500 µL desse tampão em um pellet de 1x10⁶ células, vortexado e centrifugado a 600 g por 3 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e esse centrifugado a 6.000g por 5 min a 4°C para retirada de organelas membranosas. O sobrenadante foi coletado e novamente centrifugado a 20.000 g por 15 min a 4°C, para retirada da porção membranar. O pellet foi ressuspendido em 200 µL do tampão inicial, e a amostra está pronta para ser avaliada por Western blot como descrito no item 4.17.

4.17.2. Coloração por gel de prata

A coloração de prata é uma técnica de detecção de proteínas totais em gel de eletroforese, realizada para discriminar (em bandas), todas as proteínas presentes na amostra que foram resolvidas em gel de poliacrilamida. Assim, semelhante ao protocolo de Western blot, a amostra foi resolvida em gel de poliacrilamida, conforme a concentração ideal para cada experimento e esse gel foi contrastado com prata para análise das bandas. Para essa coloração, o gel foi primeiramente acondicionado em uma cuba de vidro e em seguida, incubado com 200 ml de solução fixadora, (50% de etanol e 5% de ácido acético, diluído em água milliQ), sob agitação constante por 30 min, à

temperatura ambiente. Essa agitação foi ininterrupta até o fim do processo de coloração, até o momento de adicionar a solução de parada, como descrito a seguir. Ao término da fixação, a solução foi desprezada e o gel incubado com 200 ml de solução de lavagem (etanol 50%), por 10 min à temperatura ambiente (TA). Em seguida o gel foi novamente lavado, agora com 100 ml de água Milliq por 10 min e em seguida, a água foi desprezada e o gel incubado com a solução de sensibilização (0,02% de tiosulfato de sódio) por 2 min. Após a sensibilização, o gel foi lavado 2 vezes com 100 ml de água milliq, por 3 minutos cada lavagem e adicionado a solução de prata (0,1% de nitrato de prata), por 15 min. Ao término da incubação, a solução foi devidamente descartada e o gel lavado duas vezes com água milliq. Sequencialmente foi adicionado 100 ml de carbonato de sódio 2% até o gel ficar totalmente imerso na solução, e assim, poder adicionar pelo canto da cuba, 80 µl de formaldeído P.A. e esperar a revelação completa do gel. Ao termino, foram adicionados 200 ml de solução de parada (ácido acético 5%) para interromper a reação.

4.18. Microscopia de transmissão eletrônica

A microscopia de transmissão eletrônica (TEM), é uma técnica que possibilita observar as células, com imagens de grandes aumentos, favorecendo observar e analisar estruturas intracelulares e as suas morfologias. Dessa forma, as células foram infectadas, tripsinizadas e lavadas. Esse pellet foi fixado com tampão de cocodilato de sódio 0,1M com 0,5% de glutaraldeído, por 1h a TA. Essas células foram lavadas 3 vezes com tampão cocodilato de sódio (10 min a 450 g). Após essa etapa, ocorre a segunda fixação utilizando solução de tetróxido de ósmio 1% com ferrocianeto de potássio 1,5%, por 2h a TA e protegido da luz. Essa amostra foi lavada 3 vezes com tampão de cocodilato de sódio, como descrito anteriormente e em seguida, foi dado inicio a desidratação da amostra, utilizando séries crescente de acetona, (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), onde cada etapa ocorre com duração de 15 min, e a ultima acetona (100%) foi repetida 2 vezes. A etapa subsequente é denominada como infiltração do tecido em resina, o qual ocorreu em adições graduais de solução acetona: resina, em 4 etapas de 12h

em TA, para a retirada completa da acetona e a estabilização da resina na amostra. Após o término, a resina pura fica em incubação por 70°C por 24h. Esse tecido foi cortado em espessura de 0,6 µm e colocadas em suportes para a amostra, sendo essas contrastadas com citrato de chumbo 1% e uranila 0,5% separadamente, estando assim prontos para análise no microscópio de transmissão eletrônica.

4.19. Microscopia de fluorescência para Endossomos de reciclagem

Os endossomos de reciclagem são vesículas derivadas dos fagossomos, que apresentam como função principal, a reciclagem de proteínas de membrana que foram internalizadas durante a fagocitose. Uma forma para avaliar o trafico dessas vesículas, é através da análise uma proteína de superfície celular, denominada como receptor de transferrina, uma proteína de superfície que apresenta alta porcentagem de reciclagem pela célula. Dessa forma, macrófagos foram plaqueadas conforme protocolo para microscopia de fluorescência. No entanto, previamente a infecção essas células foram incubadas com halotransferrina 10 µg/ml, por uma hora a 37°C/5% CO₂. Após a incubação, essa cultura foi exposta a Mtb H37Rv e Mtb ΔRv1419 em MOI de 10. Após 6h de infecção, o sobrenadante foi descartado, os poços lavados 3 vezes com 1 ml de PBS e sequencialmente essas células foram fixadas com 200 µl de PFA 2% por 30 min. O protocolo de marcação foi realizado conforme descrito no item 4.12 para marcação intracelular, utilizando como anticorpo primário um anti-transferrina na diluição 1:20, e o secundário anti-rabbit alexafluor 657 na diluição 1:2000. A análise dessas lamina foram feitas por microscopia de confocal Leica DMI6000 B, na Fiocruz-PR.

4.20. ELISA

Para quantificar as citocinas secretadas por macrófagos infectados com o bacilo Mtb, o sobrenadante no qual essas células estavam contidas, foram coletados e quantificados por ELISA. Como protocolo padrão, foram utilizados

os kits de ELISA para TNF, IL-6 e IL-10 da eBioscience®, onde o protocolo foi realizado conforme determinado pelo kit correspondente. Dessa forma, esse protocolo padrão foi dividido em 3 dias, onde no primeiro, foi realizado a sensibilização de placas Nunk®, utilizando o anticorpo de captura na diluição de 1:250 em Coating buffer e acondicionado a 4°C até o dia seguinte. No segundo dia, a placa foi lavada 5 vezes com 200 µl de tampão de lavagem, e em seguida, incubada com o tampão de diluição 1x, diluído em PBS, por 1h a temperatura ambiente, para o bloqueio da reação. Após a incubação, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem e em seguida, foi adicionado 100 µl de cada amostra, além da curva com o padrão de concentração correspondente ao kit. Por fim, a placa foi acondicionada novamente a 4°C até o dia seguinte. No terceiro dia, a amostra foi desprezada e em seguida a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem. Após a lavagem, a placa foi incubada com o anticorpo de detecção na diluição de 1:250, em tampão de diluição e incubada a temperatura ambiente por 1h. Após a incubação, a placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem e incubada com avidin-HRP, diluída 1:250 em tampão de diluição e, por fim, incubada por 30 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi novamente lavada, agora 7 vezes com tampão de lavagem, e incubada com 100 µl substrato ABTS. A incubação média com o substrato ocorreu por 20 min, mas podendo variar conforme a reação feita, tomando como base o ponto mais alto da curva.

4.21. Extração de RNA e qPCR

A técnica de qPCR, é utilizada para quantificar um produto genético alvo, amplificado conforme o estímulo utilizado. Dessa forma, para avaliar os genes alvos, as células infectadas conforme item 4.9, (poços com 1×10^6 células/ml), foram resuspendidas com 340 µl de Trizol e congelado até o momento da extrassão. Para tal, cada tubo recebeu 70 µl de clorofórmio, foi misturado por inversão 15 vezes e sequencialmente incubado por 2 min a TA. Após a incubação, esses foram centrifugados a 12.000g por 10 min a 4°C.

Após essa etapa, o sobrenadante (porção aquosa) foi transferido para outro tubo, na qual foi adicionado 200 µl de isopropanol 100% e incubado por 10 min a TA. Essa mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 min a 4°C, o sobrenadante descartado e foi adicionado 340 µl de Etanol 100% sequencialmente centrifugado a 7500 g por 5 min a 4°C. Todo o líquido foi descartado, e o pellet ressuspensão em 20 µl de água ultrapura, quantificado e estocado a -80°C.

Para preparar a amostra para análise, primeiro foi realizada a técnica de RT PCR para preparar o cDNA da amostra, no qual consiste na incubação do tampão comercial RT 5x, dNTP (10 mM), DTT (0,1 mM), Randon primer (100 ng/µl), a enzima M-MLV e a amostra, incubando o mix no termociclador, no ciclo: 25°C por 10 min, 37°C por 2h, 87°C por 5min e estabilizando em 16°C.

A partir do cDNA realizado, esse foi incubado como master mix (2x), os *primers forward* e os *primers reverse* (10 uM cada) e água ultrapura (qsp para 8 µl). Esse mix foi incubado por 40 ciclos no qPCR stepOne®.

4.22. Pull down da sMTL-13 com proteínas de Macrófagos por FPLC

A técnica de pull down é muito utilizada para isolar um composto, isolar uma proteína presente em um grupo heterogêneo, ou também, identificar uma interação entre um grupo proteico. Dessa forma, essa técnica foi utilizada para identificar possíveis proteínas que interagem fisicamente com a sMTL-13 de Mtb. Dessa forma, a sMTL-13 previamente purificada em *E. coli* (Morales *et al* 2012), foi incubado com extrato de macrófagos (BMM) por 12h, a 4°C e em agitação. Após a incubação, a solução proteica foi diluída em tampão fosfato de sódio pH 7,5, com 0,5 M de cloreto de sódio e 20 mM de imidazol.

Para ocorrer a purificação, utilizamos o equipamento Akta avante (FPLC), com coluna Histrap HP 1 ml, com afinidade a histidina. Para a purificação foi utilizado um *loop* de 2 ml para aplicar a amostra, diluído no tampão de ligação descrito anteriormente, e sequencialmente a amostra foi eluída da coluna com tampão de eluição contendo tampão fosfato de sódio pH 7,5 com 0,5 M de cloreto de sódio e 500 mM de imidazol. A amostra foi

coletada, e concentrada em Centricon de 3 kDa, resultando em um volume final de 200 μ l. A amostra foi separada e uma alíquota para confirmação de Western blot e coloração de prata e outra para realizar a espectrometria de massa.

4.23. Espectrometria de massa

A espectrometria de massas foi realizada na PUCRS em parceria com o professor Cristiano Bizarro. Essas amostras foram primeiramente liofilizadas para a retirada da solução de imidazol da amostra e ressuspensa em PBS. Vinte μ g dessa solução foi submetida a protocolo de precipitação com metanol/clorofórmio. O *pellet* foi ressuspendido em 100 mM Tris HCl pH 7.0 contendo 8 M de uréia para realizar a digestão desta amostra. Primeiramente, as pontes de sulfeto são quebradas utilizando 5 mM de dithiothreitol (DTT) por 20 min at 37 °C e então as cisteínas foram alquiladas com 25 mM de iodoacetamida (IAM) por 20 min em temperatura ambiente, no escuro. A digestão ocorreu com tripsina em diluição de 1:100, com 1 mM CaCl₂ incubado a 37 °C durante a noite. O ácido fórmico (5%) foi adicionado para finalizar a reação.

Para realizar a análise por LC-MS/MS, as amostras foram separadas por uma coluna de fase reversa de 20 cm feita *in house*, (5 μ m ODSAQ C18, Yamamura Chemical Lab, Japan), usando a nanoUPLC (nanoLC Ultra 1D plus, Eksigent, USA) conectado ao LTQ-XL Orbitrap Discovery hybrid instrument (Thermo Fisher Scientific) através de uma fonte iônica de nanoeletrospray (Thermo Fisher Scientific). O fluxo de amostra foi setado em 300 nL/min em 60 min em um gradiente de fase reversa. A espectrometria de massa foi analisada usando a plataforma PatternLab.

4.24. Análise do Transcritomas de macrófagos murinos infectados com *M. tuberculosis*

O RNA total obtido de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos C57BL/6 expostos a Mtb, foi enriquecido para mRNA com

seleção de fitas com cauda poli-A e o sequenciamento do mRNA foi feito na plataforma *illumina Miseq*, localizada no Nucleomics Core da Universidade Católica de Louven (Bélgica). Adaptadores e leitura do sequenciamento *Illumina* com score de qualidade Phred menores que 20, foram removidos utilizando o software *trimmomatic* (0.36). As leituras filtradas (*trimmed reads*) foram alinhadas ao genoma de referência GRCm38 utilizando o software *STAR* (2.6.0c). Leituras do alinhamento foram mapeadas contra o genoma GRCm38, utilizando a ferramenta *featureCounts* do pacote de subleitura (1.6.1). Genes com leitura inferior a 3 foram removidos. A metodologia baseada em modelos binomiais negativos *edgeR* (3.10.0) foi utilizada para análise de expressão diferencial. Para calcular os fatores de normalização entre as amostras, foram utilizados os parâmetros *library-based*, TMM, assim como as funções *combat*, *trat* e *efit* para remover o *batch effect* e, calcular os *false Discovery rates* utilizados para definir o conjunto de genes diferencialmente expressos (DEGs).

4.25. Alinhamento sMTL-13

O processo para modelar a proteína sMTL13/Rv1419 foi feito manualmente, através das ferramentas *Modeller* e *phyre2*, no qual foi selecionado o melhor modelo e por fim maximizado os valores de entropia moleculares com os pacotes *PyMol* e *Bio3D*. Além disso, as estruturas candidatas foram alinhadas com o banco de dados PDB, usando os softwares *topMatch* e *topServer*, para selecionar a melhor estrutura. A mesma metodologia foi utilizada para analisar a estrutura da galactose. A partir de cristais disponíveis no banco de dados PDB, foram usadas as ferramentas descritas acima, para mapear as semelhanças entre os alinhamentos e identificar as possíveis interações.

Para o modelamento da sMTL-13, foi utilizado a estrutura da porção beta da Ricina. Essa modelagem foi feita separadamente nos dois métodos como mencionado e por fim, as duas estruturas foram sobrepostas. Dessa forma, a média das duas modelagens foi utilizada como uma estrutura única.

5. RESULTADOS

5.1. A sMTL-13 na *Mycobacterium tuberculosis* favorece a mortalidade de animais infectados

A infecção pela Mtb em mamíferos apresenta um desenvolvimento lento e gradual. Dessa forma, para avaliar a importância da sMTL-13 de Mtb durante a infecção, animais foram infectados via intravenosa com as cepas Mtb H37Rv ou Mtb Δ Rv1419. Os animais foram avaliados durante 200 dias, sendo contabilizado a morte natural do animal ou feito a eutanásia quando necessário, devido o animal estar em estágio clínico avançado conforme as diretrizes da Arrive. Foi observado que os animais infectados pela Mtb Δ Rv1419, sobreviveram por um tempo maior, quando comparados aos animais infectados pela Mtb H37Rv (Fig 6).

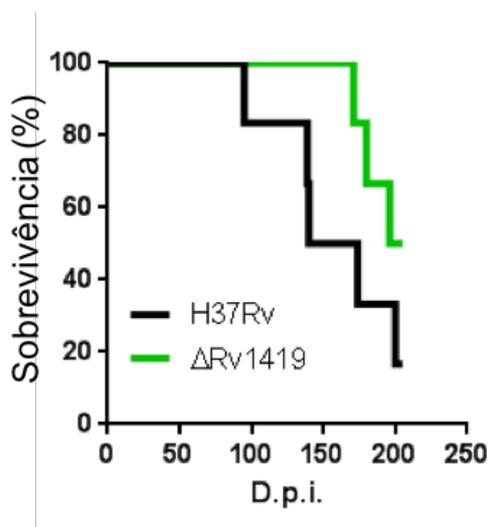


Figura 6 A ausência da sMTL-13 aumenta a sobrevivência de camundongos infectados por Mtb. Curva de sobrevivência de BAL/C infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, utilizando 100 μ l de solução 3×10^8 bactérias por ml, via intravenosa. Para análise foi utilizado ANOVA de uma via, com medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls

5.2. A sMTL-13 de Mtb não interfere na cinética de crescimento bacteriano *in vivo*

A proliferação da bactéria está diretamente associada com o desenvolvimento da patologia durante a progressão da doença, levando a mortalidade do animal infectado (Almeida, Ventura et al. 2017). Dessa forma, avaliamos o crescimento bacteriano tecidual desses animais em diferentes tempos após a infecção. Os animais foram eutanasiados nos dias 14, 28 e 56 dias pós-infecção e o baço, fígado e pulmões foram coletados, homogeneizados e plaqueados, para contagem do número de Unidade formadoras de colônias (UFC). Observamos que o crescimento de ambas as bactérias ocorreu de maneira similar, não apresentando diferença no número de UFC até 56 dias de infecção (Fig 7).

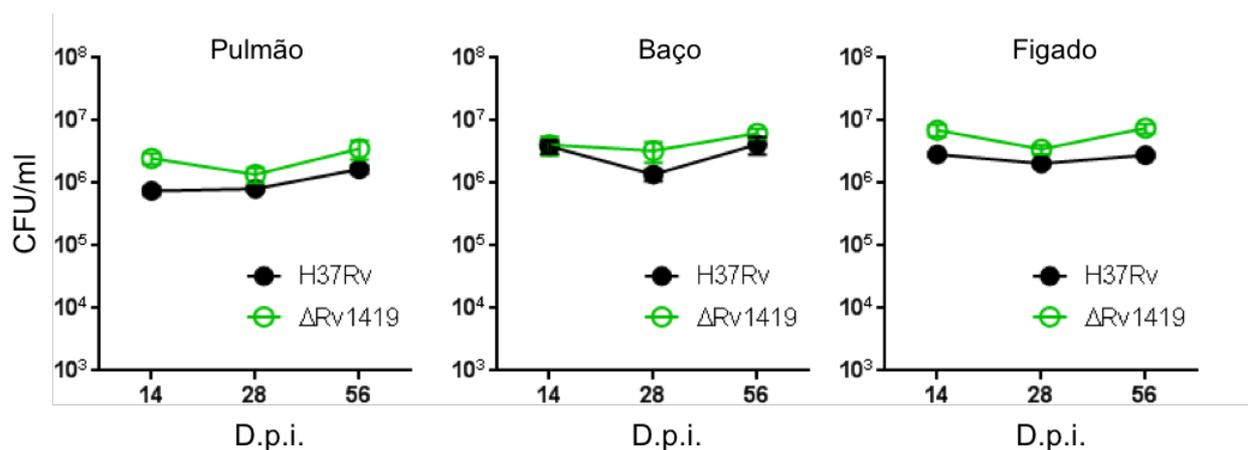


Figura 7 A presença da sMTL-13 de Mtb não interfere no crescimento bacteriano em órgãos de camundongos infectados. O crescimento tanto da cepa Mtb H37Rv quanto da Mtb ΔRv1419, foram avaliadas através da contagem de CFU, feito a partir do pulmão, baço e fígado de animais infectados, por 14, 28 e 56 dias. Foram utilizados 4 animais por grupo experimental. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e *Post hoc* Newman-Keuls

5.3. A sMTL-13 de Mtb favorece a instalação do processo inflamatório em pulmões de camundongos infectados

Durante a infecção, além do crescimento bacteriano a Mtb altera o tecido infectado, como a formação de estruturas tipo Granuloma, além de iniciar um processo inflamatório, culminando em um aumento do infiltrado celular. Dessa forma, pulmões de camundongos foram coletados nos dias 1, 7 e 28 dias, fixados e processados para histologia com coloração por Hematoxilina-Eosina. A análise das histologias de pulmões, demonstraram que o tecido infectado pela Mtb H37Rv apresenta um maior infiltrado celular comparado a infecção pela Mtb Δ Rv1419 (Fig 8).

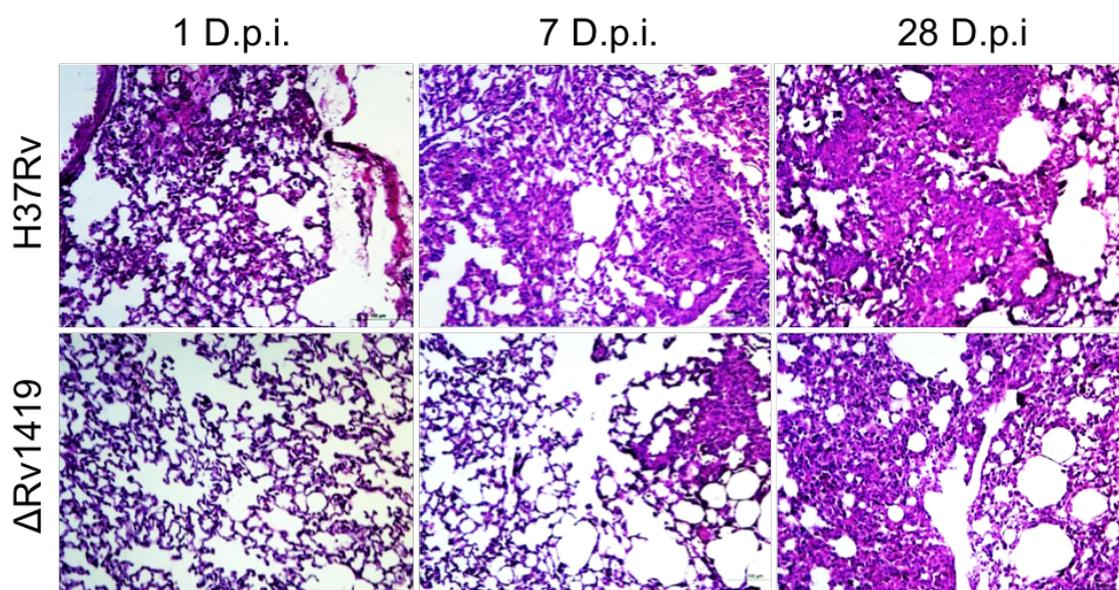


Figura 8 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 reduz o infiltrado celular em pulmão de camundongos infectados. Imagem representativa de cortes histológicos de pulmão de camundongos BALB/C, infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, coletados 1, 7 e 28 dias após infecção e corados com HE.

O dano tecidual é decorrente não apenas do infiltrado celular, como também dos produtos gerados por essas células. Dentre os mediadores, um dos mais expressos nessa infecção, que tem ação tanto nas células adjacentes quanto no tecido como um todo, é o TNF- α . Dessa forma, avaliamos através da técnica de imunohistoquímica, a expressão de TNF- α nos pulmões dos animais. Como já observado por Marakalala e colaboradores, observamos um

aumento do TNF- α em tecidos infectados pela Mtb H37Rv 56 dias pós infecção (Fig 9). Entretanto, cortes de pulmões de animais expostos à Mtb Δ Rv1419 apresentam, através de técnica de imunohistoquímica, uma menor expressão de TNF- α ao comparar com a infecção pela Mtb H37Rv.

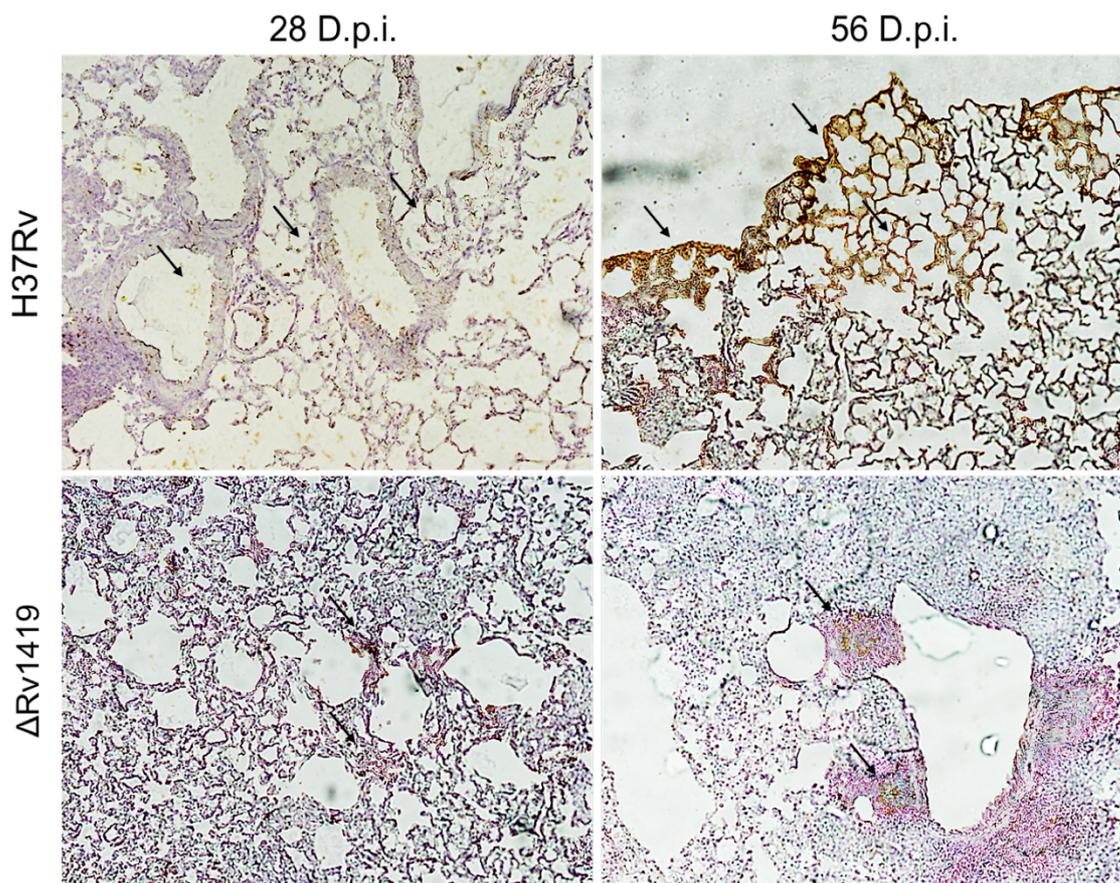


Figura 9 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 reduz a expressão de TNF- α em pulmão de camundongos infectados. Imagem representativa da expressão de TNF- α (marcação em marrom apontado com setas pretas), em pulmão de camundongos BALB/C infectados por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, analisados 28 e 56 dias após infecção. Imagens analisadas por técnica de imunohistoquímica. Análise representativas de 4 animais por grupo experimental.

5.4. A sMTL-13 na Mtb promove a liberação de TNF-a em macrófagos infectados

Para avaliar a capacidade de liberação de TNF- α durante a infecção pela Mtb Δ Rv1419, foi realizado um ensaio por ELISA em sobrenadantes de

macrófagos derivados de medula óssea (BMM) expostos a Mtb. A infecção pela Mtb Δ Rv1419 apresenta redução na liberação de TNF- α em sobrenadantes de culturas de macrófagos quando comparada a células expostas à Mtb H37Rv em todos os tempos de infecção analisados (Fig 10 A) Entretanto, a ausência da sMTL-13 em Mtb não interfere na liberação de IL-6 (Fig 10 B).

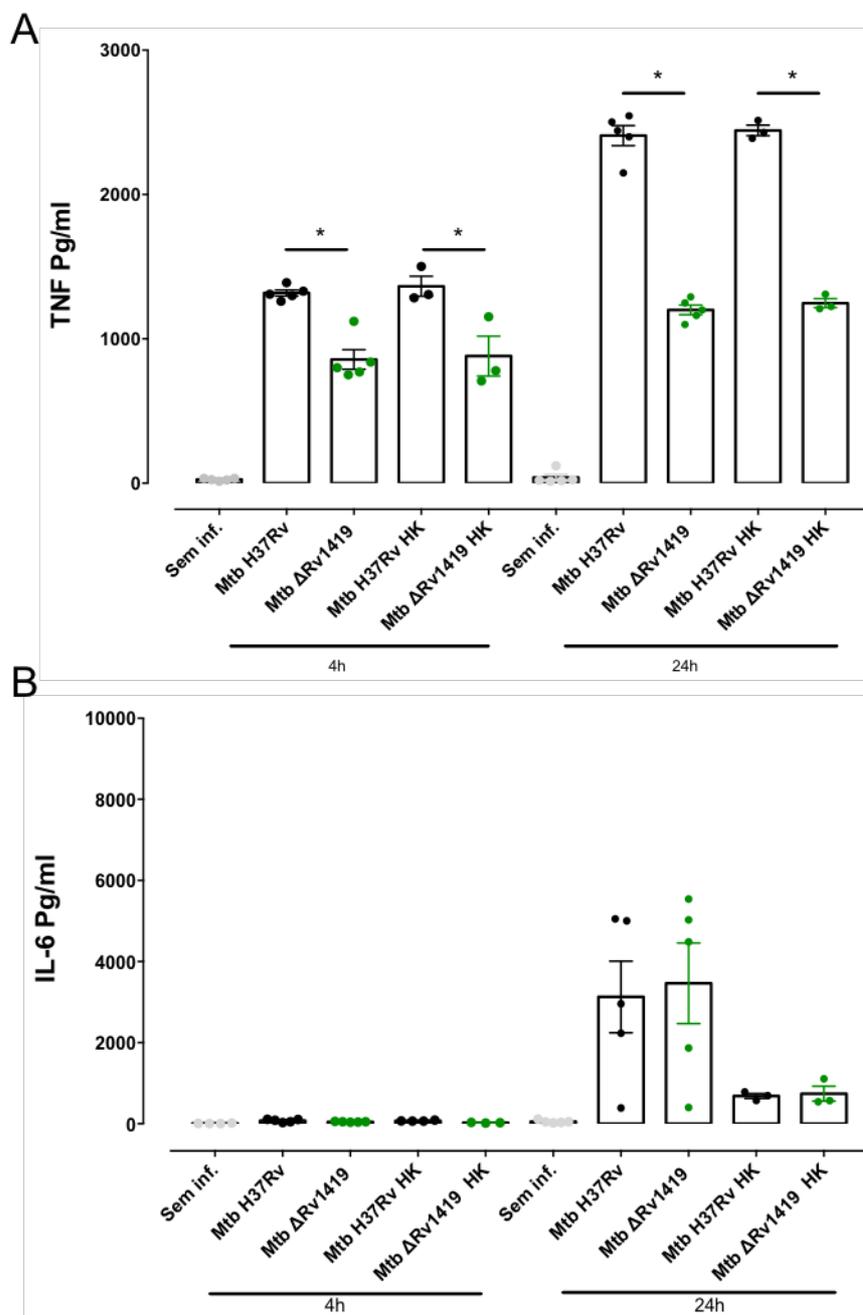


Figura 10 BMM expostos à Mtb Δ Rv1419 apresentam menor liberação de TNF- α durante a infecção. A quantificação de TNF- α (A) e IL-6 (B) solúvel foi mensurada por ensaio de ELISA, em sobrenadantes de macrófagos infectados por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 em MOI 10 e as respectivas cepas mortas pelo calor (HK) nas mesmas concentrações, após 4, 24 e 48h de infecção. Resultado representativo de 3

experimentos independentes. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

Para investigar se a redução do TNF- α liberado pelas células expostas à Mtb DRv1419 é uma diminuição na produção da citocina, avaliou-se os níveis intracelulares da mesma, sendo avaliada por citometria de fluxo. Durante a infecção ambas as cepas Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv, induziram um aumento similar nos níveis intracelulares de TNF- α , sugerindo que não há falha na capacidade das células infectadas de produzirem a citocina (Fig 11).

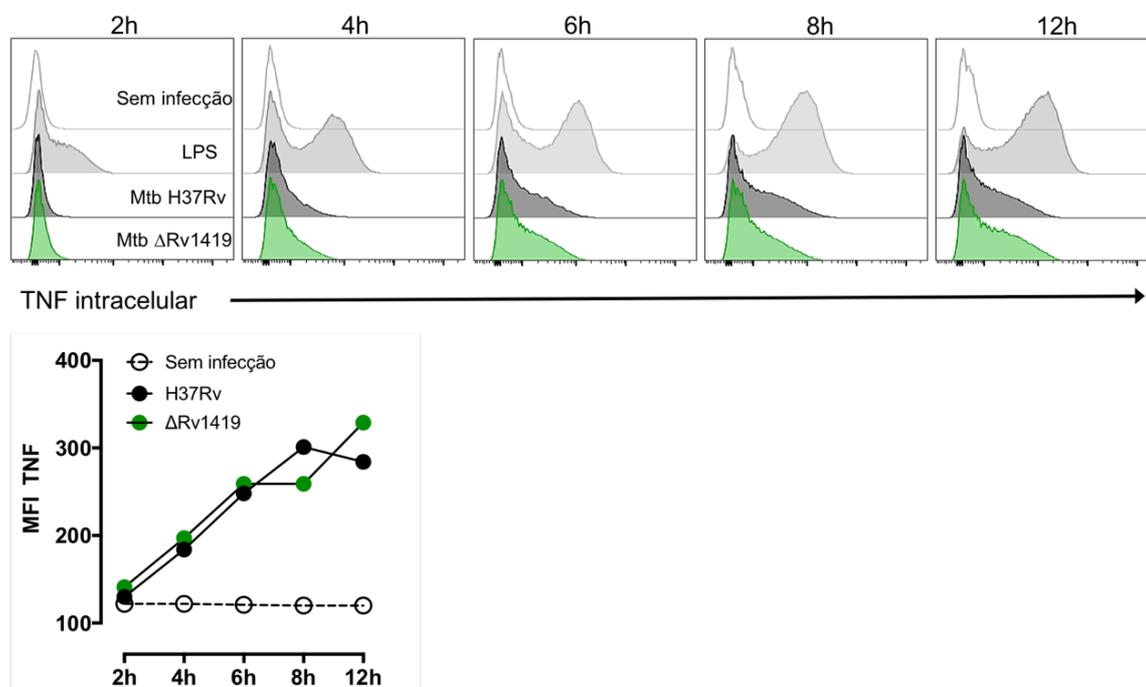


Figura 11 A infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv induzem a mesma transcrição de TNF- α intracelular. A análise do TNF- α intracelular foi mensurado através do MFI para o TNF- α intracelular após a infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv em MOI 10 durante 2, 4, 6, 8 e 12h. LPS 1 μ g/ml utilizado como controle positivo nos respectivos tempos de estimulação. Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls

5.5. A *Mtb* Δ Rv1419 não altera a atividade da Adam17 durante a infecção

Uma vez produzido, o TNF- α é carregado até a membrana célula, onde ele é ancorado por uma porção transmembranar e clivado como trímero solúvel por uma metaloproteinase denominada ADAM17. Para conferir se a infecção pela *Mtb* Δ Rv1419 interfere na expressão e na atividade dessa metaloproteinase, foram analisadas a expressão do RNA mensageiro dessa proteína por técnica de qPCR e a expressão proteica dessa metaloproteinase por Western blot. Esses resultados demonstraram que ambas as bactérias induzem o aumento da expressão do RNA mensageiros do gene *Adam17* em mesma intensidade (Fig. 12 A). O mesmo ocorre para a transcrição da proteína, onde foi observado a mesma quantidade da proteína ADAM17 em macrófagos, 24h após infecção (Fig. 12 B). A ADAM17 também apresenta como função a clivagem do receptor para TNF- α (TNFR), como também a liberação da proteína CD40. Dessa forma, como controle, fizemos a quantificação dessa proteína na superfície de macrófagos infectados, por técnica de citometria de fluxo, e observamos que a expressão do CD40 é similar nas células expostas à *Mtb* H37Rv ou *Mtb* Δ Rv1419 (Fig. 12 C).

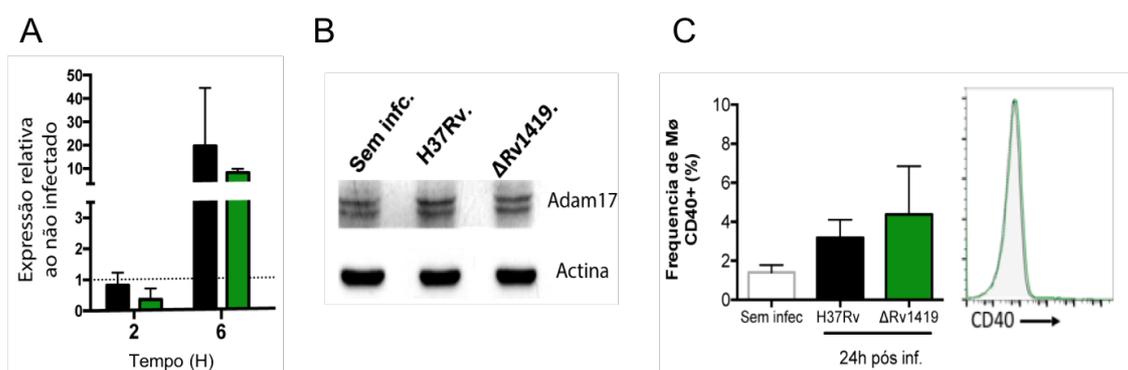


Figura 12 A ausência de SMTL-13 de *Mtb* não interfere na expressão e na função da Adam17 de macrófagos durante a infecção. A expressão da metaloproteinase Adam17 foi mensurada durante a infecção por *Mtb* H37Rv e *Mtb* Δ Rv1419 em MOI 10. (A) A expressão relativa do RNA mensageiro da Adam17. (B) A expressão da Adam17 em macrófagos, foi mensurado por Western blot. (C) A análise funcional da Adam17, foi mensurado através da expressão da proteína de superfície CD40, sendo avaliada a expressão de células positivas e a expressão por MFI, referente a essa proteína na

superfície das células infectada.. Graficos representativos de 3 experimentos independentes. Para essas análises, foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

O receptor para TNF- α presente na superfície da célula, pode atuar como um receptor dessa citocina, mascarando assim a sua presença no sobrenadante destas culturas células. Para confirmar que as baixas concentrações de TNF- α solúveis, durante a infecção pela Mtb Δ Rv1419, não esta envolvida com a receptação dessa citocina, avaliamos a expressão dos receptores para TNF- α . Para essa análise, avaliamos a expressão de RNA mensageiro para ambos os receptores (TNFR1 e TNFR2) por qPCR. Já a expressão da proteína TNFR1, presente apenas na membrana celular, foi avaliado por Western blot. Foi observado que a expressão do RNA *tnfr1* (Fig 13 A) e *tnfr2* (Fig 13 B) aumentam durante a infecção para ambas as infecções, não apresentando diferença entre as duas bactérias. Da mesma forma, a análise da proteína presente na superfície celular, demonstram que macrófagos infectados tanto pela Mtb H37Rv, quanto pela Mtb Δ Rv1419, apresentam um perfil semelhante de expressão para o receptor do tipo 1 (Fig 13 C).

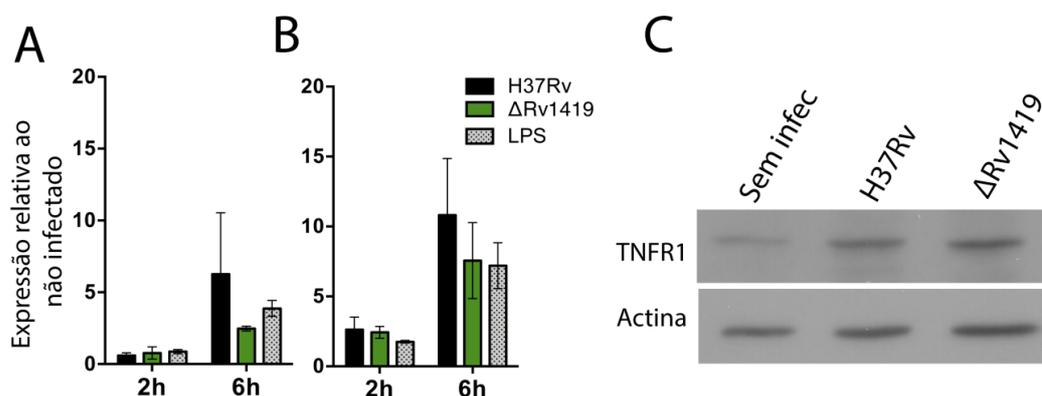


Figura 13 A ausência da sMTL-13 de M tuberculosis não interfere na expressão do receptor para TNF- α . A expressão dos receptores para TNF- α foram mensurados durante a infecção por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 em MOI 10. A expressão relativa dos genes *tnfr1* e *tnfr2* foram quantificadas (A) *tnfr1* (B) *tnfr2*. (C) A quantificação proteica do receptor do tipo 1 (TNFR1) por Western blot diferencial para a porção membranas. Graficos representativos de 3 experimentos independentes (A e B) e de 1 experimento com 2 amostras biológicas em C. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls

5.6. A sMTL-13 de Mtb favorece a liberação de TNF- α por macrófagos

A rápida liberação do TNF- α pelo macrófago, já se demonstrou diferenciado logo nas primeiras horas de infecção, quando comparada as cepas Mtb H37Rv e a Mtb Δ Rv1419. Nesse contexto avaliamos se a sMTL-13 purificada de Mtb consegue modular tal sistema. Assim, foi observado que o estímulo da sMTL-13 purificada não foi capaz de induzir a liberação de TNF- α . No entanto, quando as células são coestimuladas com LPS e sMTL-13, a presença da lectina proporciona um aumento na liberação de TNF- α quando comparada ao estímulo simples com LPS. Interessantemente, observamos que a pré incubação da sMTL-13 com 20 mM de D-gal, inibe o efeito observado, mostrando assim que essa sinergia na liberação do TNF- α é responsabilizado pela estimulação da sMTL-13, possivelmente através de sua função lectínica (Fig 14)

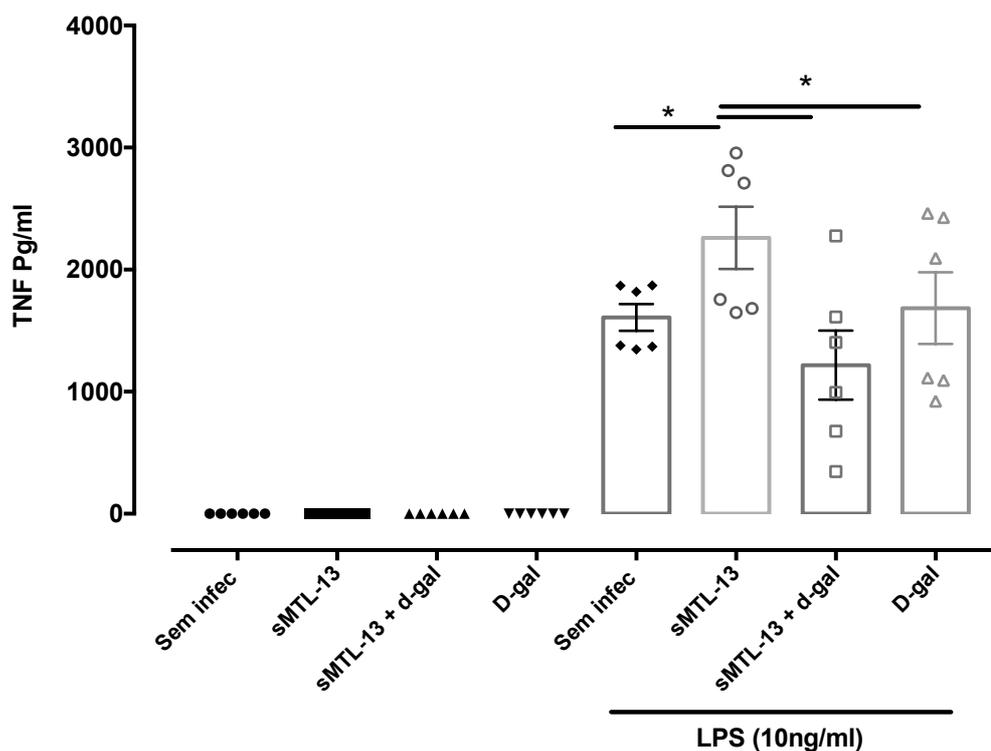


Figura 14 A sMTL-13 aumenta a liberação de TNF mediada por LPS. A quantificação de TNF solúvel, foi mensura por ensaio de ELISA, em sobrenadantes de macrófagos estimulados por 4h. Estímulos realizados com sMTL-13 (10 μ /ml), D-Gal (20 μ g/ml) e LPS (10 ng/ml). Resultado representativo de 2 experimentos independentes. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

5.7. A sMTL-13 de Mtb apresenta um sitio de interação com a galactose

Devido ao resultado anterior, nosso próximo passo foi analisar a conformação tridimensional de sMTL-13 com o emprego do alinhamento dos aminoácidos da lectina. Essa análise permite observar uma estrutura hipotética, com uma porção ou cadeia transmembranar (cadeia linear localizada na porção inferior da estrutura), além de uma porção extramembranar (porção superior da estrutura) (Fig 15 A). Essa última porção por sua vez, apresenta um sitio hipotético de alta afinidade com a Galactose (Fig 15 B).

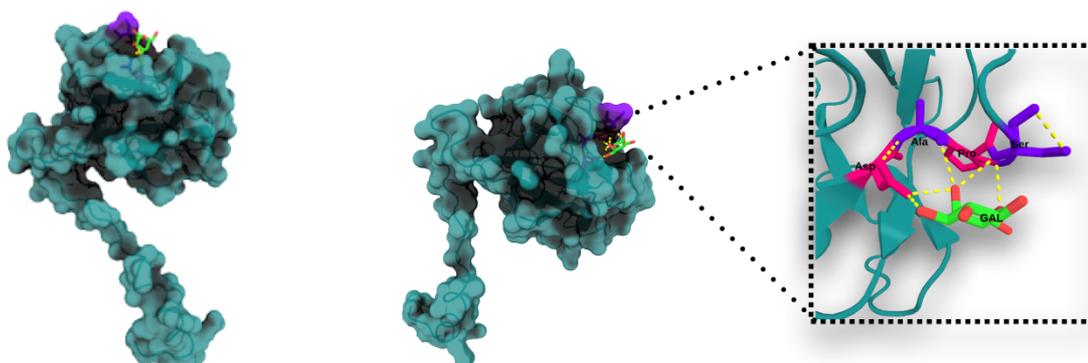


Figura 15 Modelamento estrutural da sMTL-13 de Mtb. O modelamento da sMTL-13 junto a interação *in silico* com a galactose foi realizado utilizando os softwares MODELLER e Phyre 2. A cadeia Beta da Ricina foi utilizada como modelamento base pelo MODELLER, e o alinhamento de sequência realizado pelo Phyre 2.

5.8. A sMTL-13 de Mtb favorece a fagocitose ao promover o reconhecimento inicial do bacilo

Para induzir o processo de fagocitose, primeiramente a célula necessita reconhecer o patógeno. Nesse contexto para analisar a capacidade de associação entre a bactéria e célula hospedeira, as cepas Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 fluorescentes foram incubadas com macrófagos derivados de medula óssea a 37°C. Dessa forma, a Mtb H37Rv apresentou maior associação célula-bactéria quando comparado com a Mtb Δ Rv1419 e essa diferença, já ocorreu logo nos primeiros 30 minutos de incubação, perdurando até as 4h pós infecção. A análise da marcação do Syto24 foi feita através do MFI no canal Fitc (Fig 16A), o qual foi representado graficamente na Fig 16B.

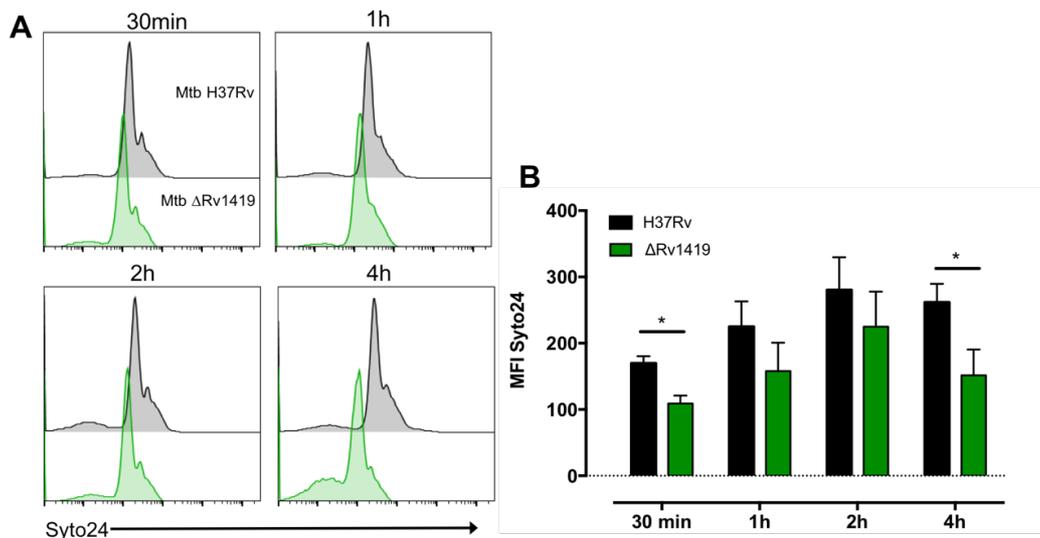


Figura 16 A presença da sMTL-13 de Mtb favorece a internalização da bactéria pelos macrófagos. O processo de reconhecimento foi mensurado por citometria de fluxo, através do MFI de macrófagos infectados com Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 syto24+, em diferentes tempos de infecção. Em A, observa-se os histogramas representativos de 3 experimentos para cada tempo de infecção, sendo em preto o MFI da Mtb H37Rv e em verde o MFI da Mtb Δ Rv1419. O MFI pode ser avaliado numericamente pelo gráfico de barras (B). Para análise foi utilizado teste T com $P < 0,05$

5.9. A infecção por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 apresentam diferentes assinaturas gênicas para proteínas endossomiais de macrófagos

Para obter uma visão global para as possíveis variações endossomiais, foi realizada através da análise do transcriptoma de macrófagos infectados por Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419. Em diferentes tempos de infecção, observa-se que ambas as bactérias induzem a uma variação na expressão de genes envolvidos entre todas as proteínas presentes na maturação endossomal. No entanto, três delas, Lamp1 (Fig 17 A), Rab5a e Rab35 (Fig 17 B), apresentam uma expressão modificada entre 6h e 12h após a infecção com Mtb Δ Rv1419, sugerindo uma modulação tanto nas vias endossomiais fagocíticas, quanto na modulação dos endossomos de reciclagem.

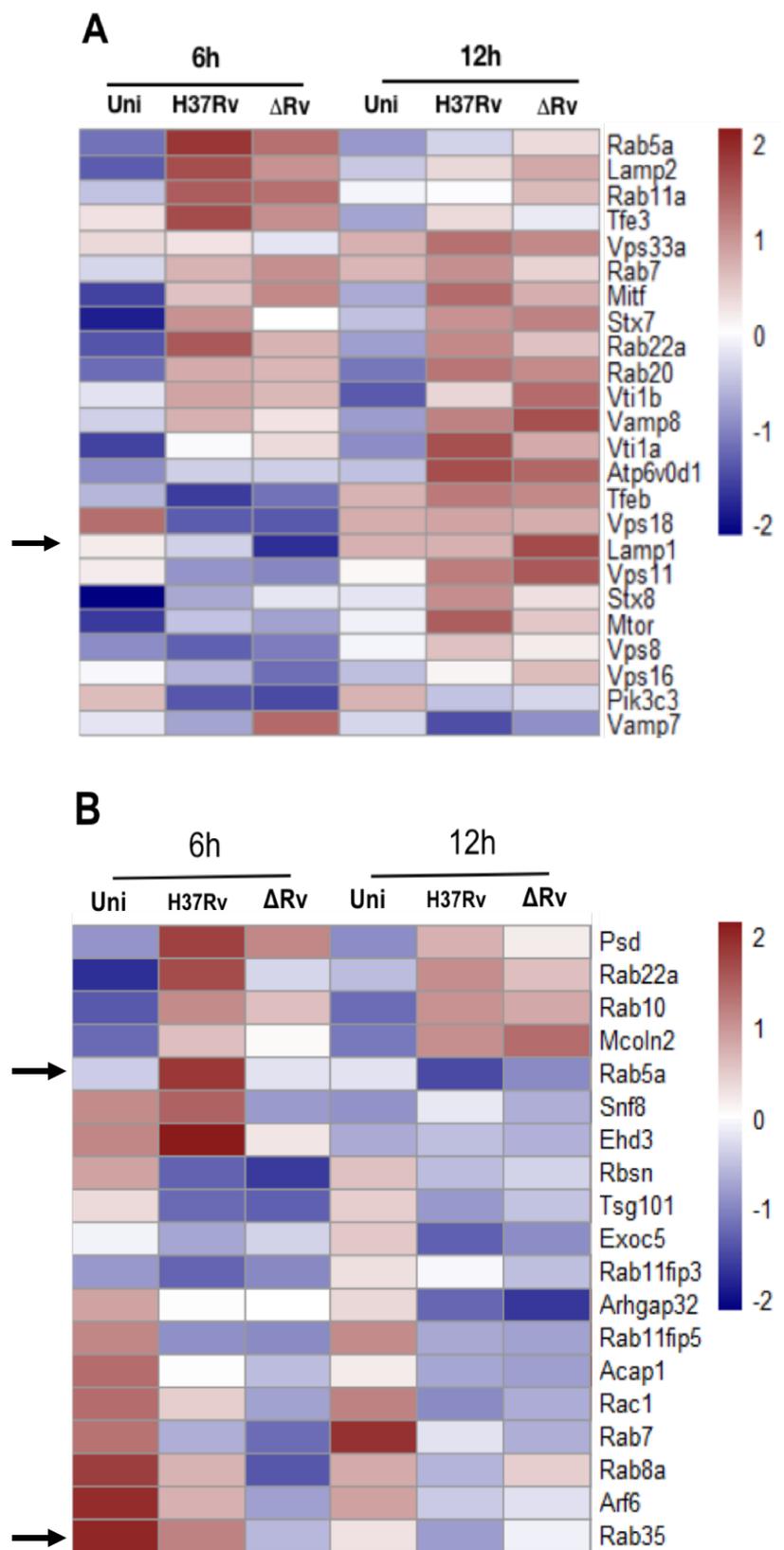


Figura 17 A presença da sMTL-13 de *Mtb* modifica a assinatura gênica da via endossomal de BMM infectos. Transcriptoma de BMM infectados pela *Mtb* H37Rv e *Mtb* Δ Rv1419 por 6, 12 e 24h. (A) Análise de genes relacionados a

vesículas intracelulares direcionadas a fagocitose, incluindo genes de endossomos e lisossomos. (B) Análise de genes relacionados aos endossomos de reciclagem e ao processo de exocitose dessas vesículas durante a infecção. Resultado expresso por z score, com ± 2 desvios padrões.

5.10. A sMTL-13 de *Mtb* não interfere na maturação de endossomos de macrófagos durante a fagocitose

Além da infecção por *Mtb* interferir na produção de proteínas vesiculares, durante a fagocitose as bactérias também podem modular o recrutamento de diferentes vesículas, que por sua vez irão interferir diretamente na maturação dos endossomos. Para analisar se a presença da sMTL-13 na *Mtb* durante a infecção interfere no recrutamento vesicular inicial, realizamos uma microscopia de fluorescência com a marcação para proteína Rab5c. As imagens de BMM infectados, demonstraram que as infecções por ambas as cepas bacterianas apresentaram recrutamento de Rab5 em intensidades similares, sendo que este recrutamento ocorre em todos os tempos de infecções analisados (Fig 18).

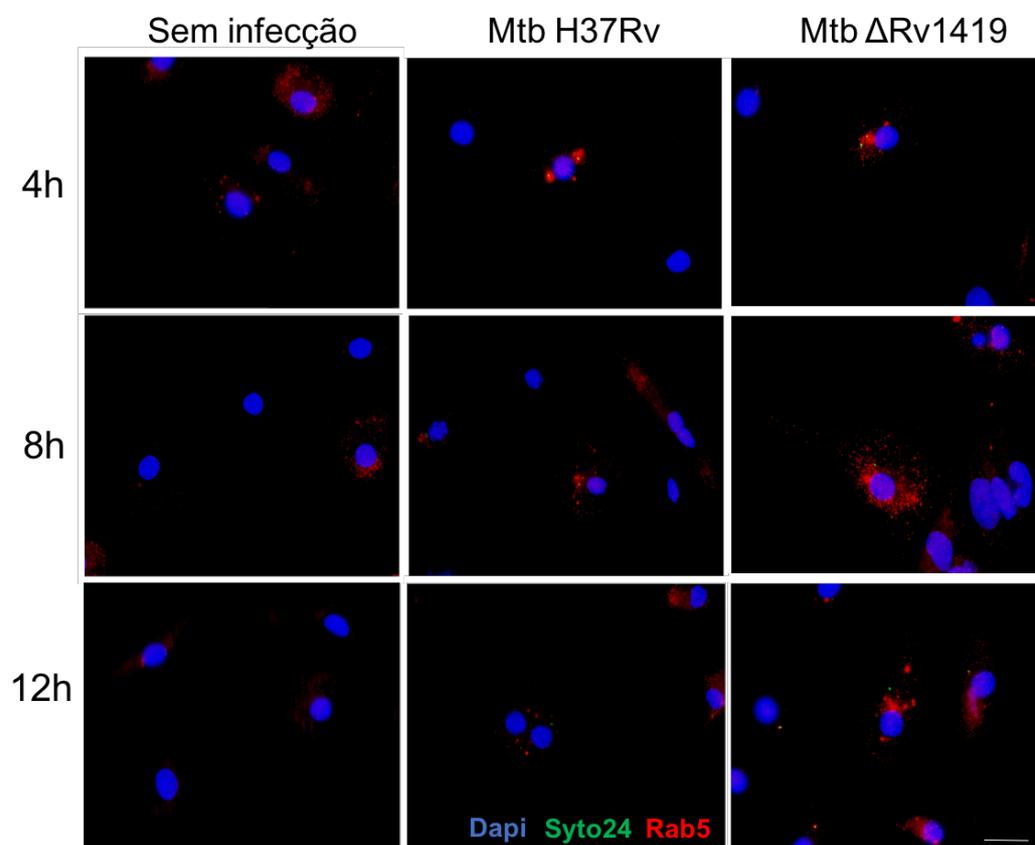


Figura 18 O recrutamento de Rab5 é semelhante durante a infecção por *Mtb* Δ Rv1419 e *Mtb* H37Rv. O Recrutamento endossomal foi avaliado pela localização e a intensidade de endossomos caracterizados pela marcação da proteína Rab5, durante a infecção. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo corado com DAPI (azul), a *Mtb* syto24+ (verde), a proteína Rab5 (vermelho). Fotos representativas dos Merges formados. (As pranchas individuais de cada canal estão representadas no anexo AN-3)

Já a quantificação de fagossomos maduros de macrófagos pode ser mensurada através da proteína Rab7. O MFI das células marcadas para o alvo demonstrou a quantidade de proteína intracelular que é mobilizada durante a infecção. Desta forma, essa análise demonstrou que a infecção por ambas as bactérias induz a expressão da proteína Rab7 em igual intensidade ao longo do tempo de infecção (Fig 19 A e B). O Zymozan, que são pequenas estruturas fungicas formadas por cadeias de glicose repetitivas na qual além de induzir a atividade celular ao ser reconhecida por receptores TLR, também induzem a fagocitose celular através de receptores tipo Dectin, sendo assim. Dessa forma, esse composto foi utilizado aqui como controle positivo para expressão de Rab7 (Fig 19 C).

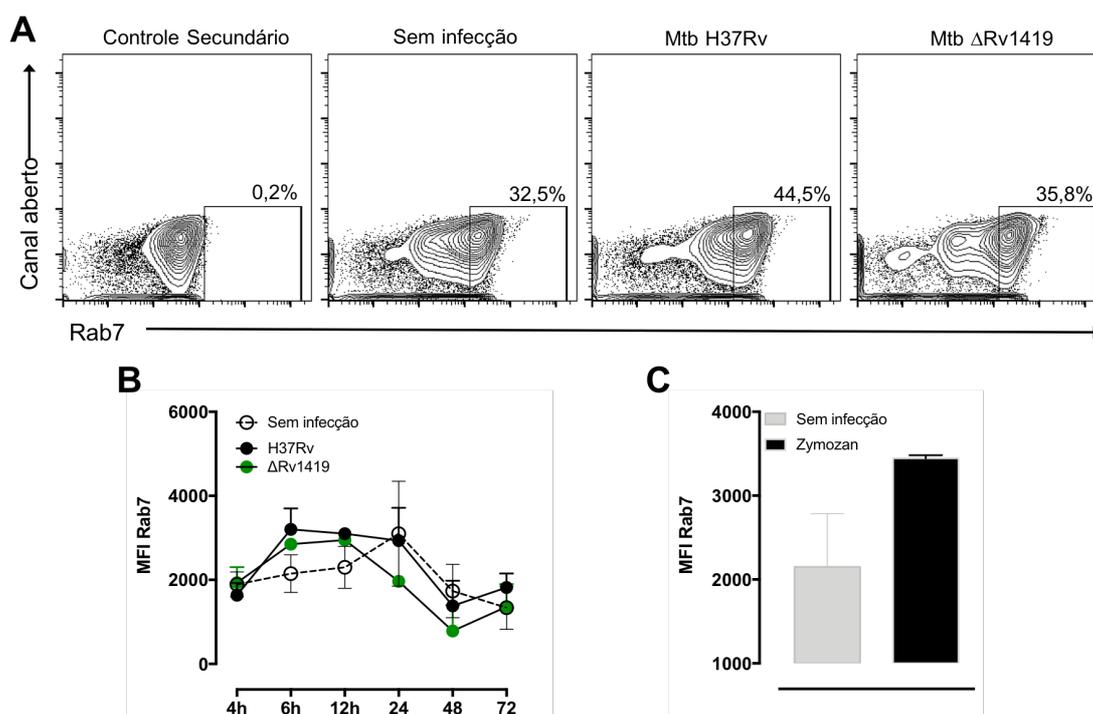


Figura 19 A sMTL-13 de Mtb não intervém na expressão de de Rab7 intracelulares após infecção. A quantificação de fagossomos maduros foi avaliada a partir da marcação da proteína Rab7 e analisada por citometria de fluxo. (A) Frequência celular apresentando a vesícula intracelular. (B) MFI das populações positivas para Rab7 intracelular ao longo do tempo. (C) MFI do controle positivo Zymozam foi avaliado com 12h após o estímulo. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls. Newman-Keuls.

Além de modular a produção de proteínas intracelulares, a Mtb também tem a capacidade de interferir no recrutamento de vesículas, durante o processo de fagocitose celular e dentre esses, a Mtb consegue reduzir o recrutamento de endossomos (Rab7) durante a infecção. Dessa forma, avaliamos se a presença da sMTL-13 em Mtb, interfere nesse recrutamento. A análise qualitativa por microscopia de fluorescência das células infectadas demonstrou que ambas as bactérias apresentam um perfil semelhante de recrutamento de Rab7, em todos os tempos de infecção analisados (Fig 20).

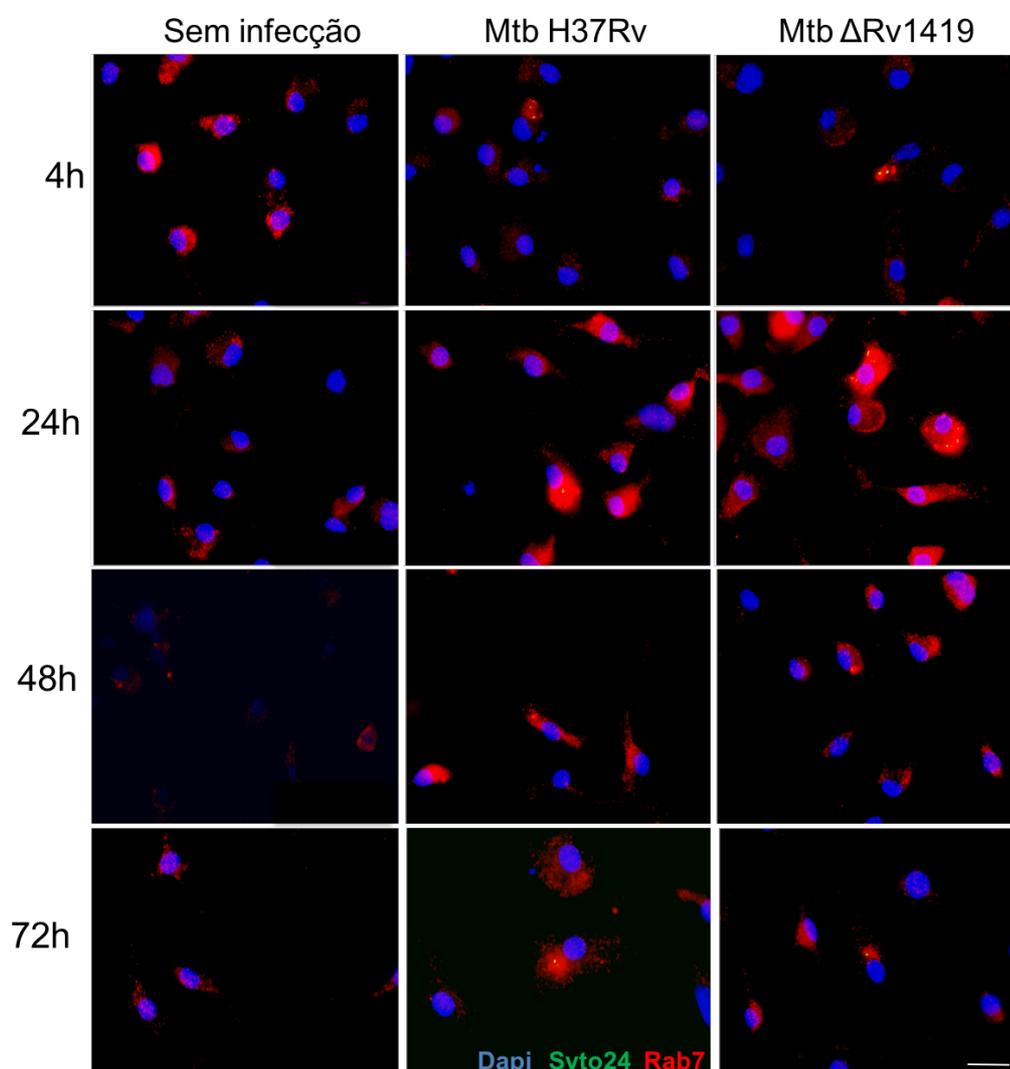


Figura 20 O recrutamento de Rab7 é semelhante durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv. O recrutamento de fagossomos são demonstrados pela localização e intensidade de fluorescência de proteínas Rab7 intracelulares. A análise do recrutamento foi realizado em tempos de infecção 4, 24, 48 e 72h após infecção, apresentando o núcleo corado por DAPI (azul), a Mtb syto24 (verde), a proteína Rab7 (vermelho). (As pranchas individuais de cada canal estão representadas no anexo AN-4)

5.11. A sMTL-13 Mtb promove a manutenção da homeostasia lisossomal em macrófagos infectados

Os Lisossomos são vesículas caracterizadas pela alta presença de proteases, lipases e ions de hidrogênio, tornando-o ácido e muito eletrodense. Dessa forma, essas características possibilitam a contagem destas vesículas em imagens de microscopia de transmissão eletrônica. Os lisossomos (LY) são identificados como vesículas com formato circular, membrana simples e com o preenchimento acinzentada. No entanto, os vacúolos e os fagossomos (Ph) são caracterizados com um preenchimento clarificado, devido a falta de proteases e lipases, e sem uma marcação específica para essas estruturas, nos impossibilitando de distingui-las entre si sem uma marcação específica. Assim, após 72h de infecção, foi observado um aumento significativo de vesículas lisossomais nas células infectadas com a Mtb Δ Rv1419, quando comparado as células infectadas com Mtb H37Rv (Fig 21).

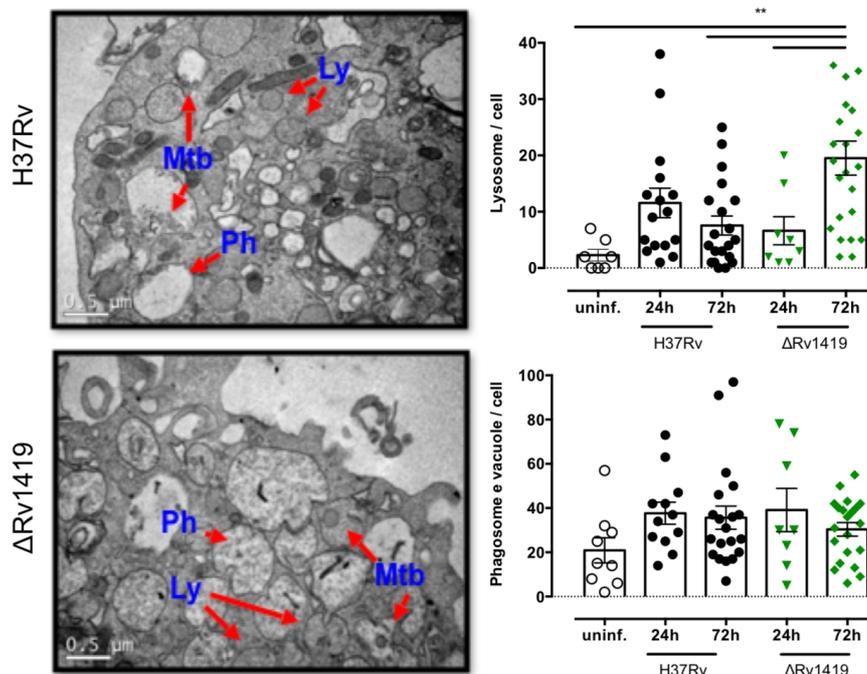


Figura 21 A infecção por Mtb Δ Rv1419 aumenta estruturas similares a lisossomos intracelulares. As estruturas tipo lisossomo (estruturas circulares e acinzentadas denominadas como eletrodensas), foram contadas manualmente através de fotos contendo todas as dimensões das células, representando cada ponto no gráfico como uma célula analisada. A análise foi realizada com células infectadas por 24 e 72h pelas cepas Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 e células sem infecção após 72h de cultura. Para análise observa-se (Ph) fagossomo, (Ly) lisossomos e (Mtb) *Mycobacterium tuberculosis*. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

O escape das vesículas presente no processo fagocítico pela Mtb, tem como característica final a inibição do recrutamento de lisossomos. Nesse contexto, analisamos a influencia da sMTL-13 no recrutamento de Lamp1 e Lamp2 durante a infecção. BMM foram infectadas com Mtb H37Rv, Mtb Δ Rv1419, tratadas com Zymozan 10 μ g/ml ou mantidas em estado de baixa nutrição celular (“starvation”), sendo então marcadas para Lamp1 e Lamp2 intracelular (Fig 22 A). A análise pelo MFI demonstrou um aumento na quantidade de Lamp1 72h após a infecção com a Mtb Δ Rv1419 comparada a Mtb H37Rv (Fig 22 B e C), confirmando a análise feita por microscopia de transmissão eletrônica. No entanto a intensidade de Lamp2 não modificou

durante a infecção. Para o controle positivo, foram utilizados o Zymozan (Lamp1) e o estado de *starvation* (Lamp2), avaliando o MFI de lisossomos 12h após estímulo (Fig 22 D).

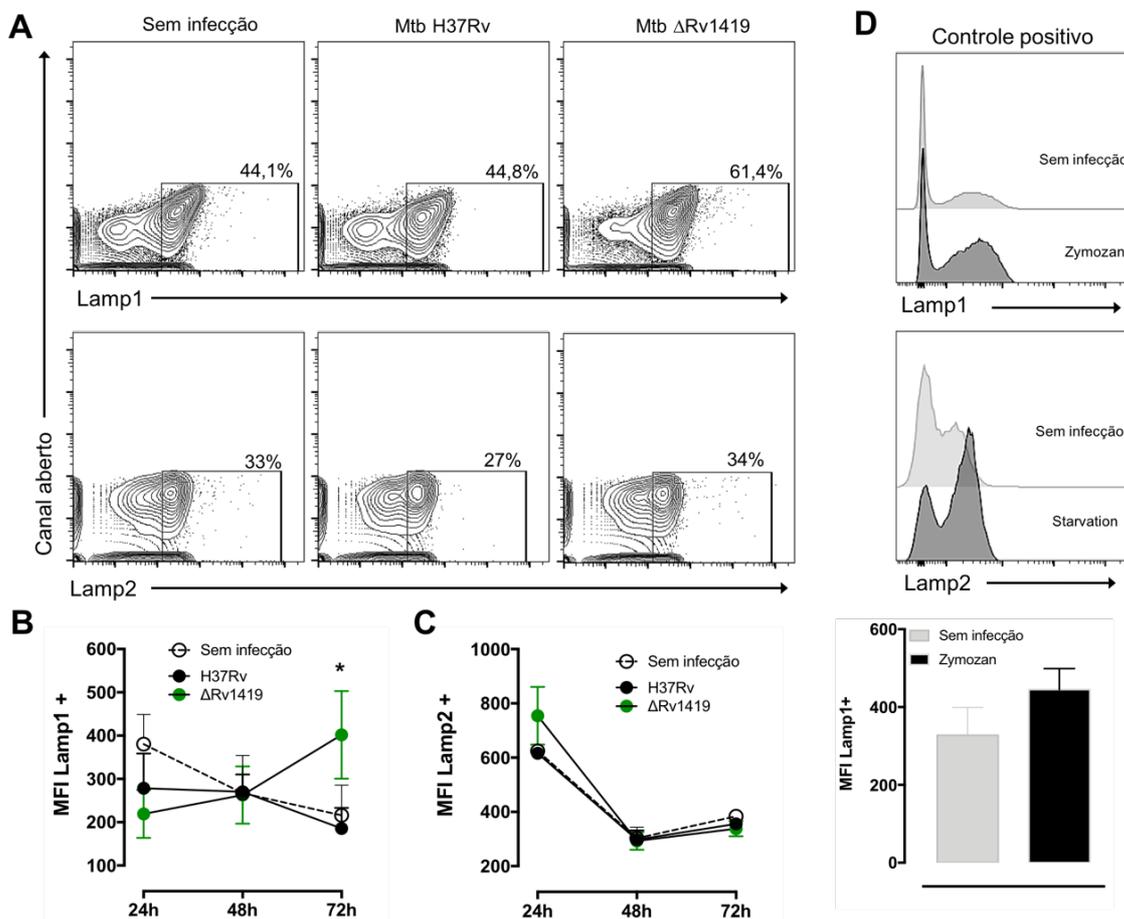


Figura 22 A infecção por Mtb ΔRv1419 aumenta a expressão de Lamp1 em macrófagos. A quantidade de lisossomos foi mensurada a partir de proteínas de superfície Lamp presente na vesícula. (A) A frequência de células positivas para Lamp1. (B) O MFI de Lamp1 de macrófagos infectados por 24, 48 e 72h pelas cepas Mtb ΔRv1419 Mtb H37Rv em MOI 10 (C) O MFI de Lamp2 de macrófagos infectados por 24, 48 e 72h pelas cepas Mtb ΔRv1419 Mtb H37Rv em MOI 10. (D) O estímulo com Zymozan (10 μg/ml) ou o starvation da célula por 12h foi utilizado como controles positivos para induzir a produção de lisossomos, mensurados pela MFI de Lamp1 e Lamp2 em macrófagos. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

Além da maturação vesicular decorrente do processo de fagocitose, a Mtb também pode modular o recrutamento de lisossomos durante a maturação vesicular. Assim, para avaliar o recrutamento lisossomal durante a infecção foi

realizado a microscopia de fluorescência para Lamp1. Para realizar essa análise, macrófagos foram infectados e após os tempos de exposição a bactéria, foi realizada a marcação para Lamp1. A análise por microscopia de fluorescência (Fig 23) demonstrou que até 48h pós infecção, ambas as bactérias apresentam um perfil semelhante no recrutamento de Lamp1, no entanto, no tempo de 72h após infecção, a Mtb Δ Rv1419 apresenta um aumento no recrutamento de Lamp1 intracelular em macrófagos infectados, corroborando com a análise por citometria de fluxo.

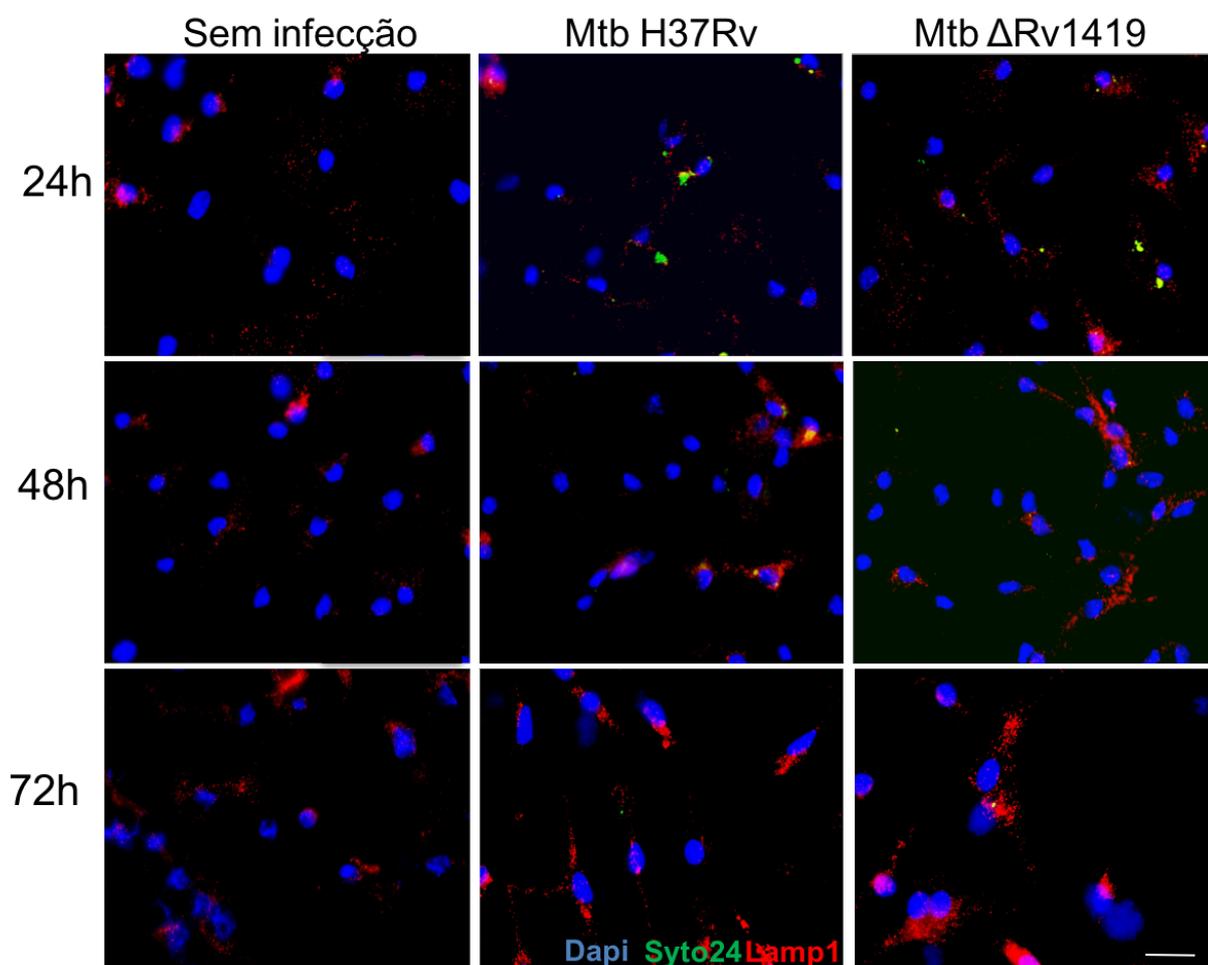


Figura 21 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 aumenta o recrutamento de lisossomos tardios em macrófagos. O recrutamento e acúmulo de lisossomos intracelulares foram avaliados através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul), a Mtb syto24 (verde), a proteína Lamp1 (vermelho). (As pranchas individuais para cada canal estão representadas no anexo AN-5)

Após a formação do fagolisossomo, essa vesícula irá atuar na degradação proteica do produto fagocitado e por fim, irá exocitar esse produto final. Para isso, essa vesícula migra até a superfície celular e funde-se com a membrana plasmática, ancorando proteínas de superfície dos lisossomos na membrana. Assim, a análise de proteínas como Lamp1 na superfície da célula, sugere a capacidade dessa vesícula ser exocitada. Dessa forma, foi realizado a marcação de Lamp1 extracelular e avaliado por citometria. As células infectadas por ambas as bactérias apresentam frequência (Fig 24 A) e intensidade semelhantes de Lamp1 na superfície celular, (Fig 24 B). Para controle positivo, a célula foi mantida em estado de *starvation* por 12h (Fig 24 C).

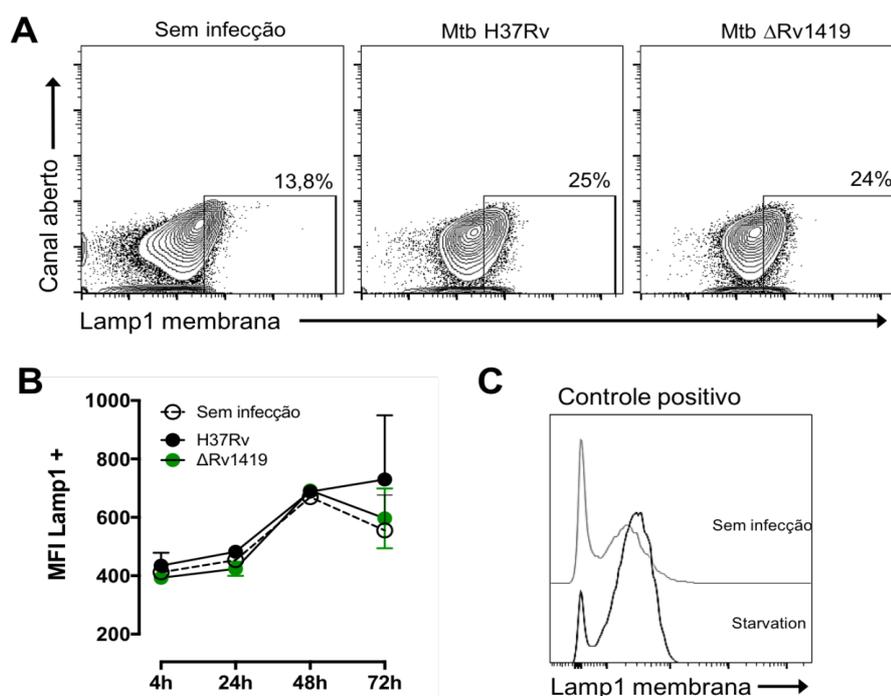


Figura 24 A infecção pela Mtb Δ Rv1419 induz o acúmulo intracelular de lamp1. A análise da exocitose lisossomal foi feita através da marcação para Lamp1 na membrana plasmática da célula. (A) Dot plots representativos das células infectadas com Mtb H37Rv, Mtb DELTARv1419 ou controle positivo (starvation), demonstrando a marcação para Lamp1. (B) Variação temporal da presença de Lamp1 na membrana da célula durante a infecção. (C) Intensidade de fluorescência para lamp1 de membrana após *starvation* da célula por 12h. Para análise foi utilizado ANOVA de duas vias, sem medidas repetidas, com $P < 0,05$ e Post hoc Newman-Keuls.

5.12. A sMTL-13 de Mtb promove o recrutamento de lisossomos durante a fagocitose

Durante a fagocitose, macrófagos recrutam vesículas e organelas para o fusão rápida com a membrana celular, favorecendo assim, uma rápida agregação de membrana durante a formação do copo fagocítico. Tendo em vista que existe uma sinalização celular proveniente da sMTL-13 de Mtb para liberação de TNF- α e o controle lisossomal durante a infecção, realizamos uma microscopia de fluorescência para analisar o recrutamento de Lamp1 no processo inicial de infecção. A sMTL-13 no Mtb favorece o recrutamento de Lamp1 em macrófagos 4h após a infecção (Fig 25). Essa função foi confirmada ao observar que a ausência da proteína na Mtb Δ Rv1419, como também o bloqueio da lectina, realizada pela pré incubação da Mtb H37Rv com D-Gal, resultaram na menor intensidade de recrutamento lisossomal.

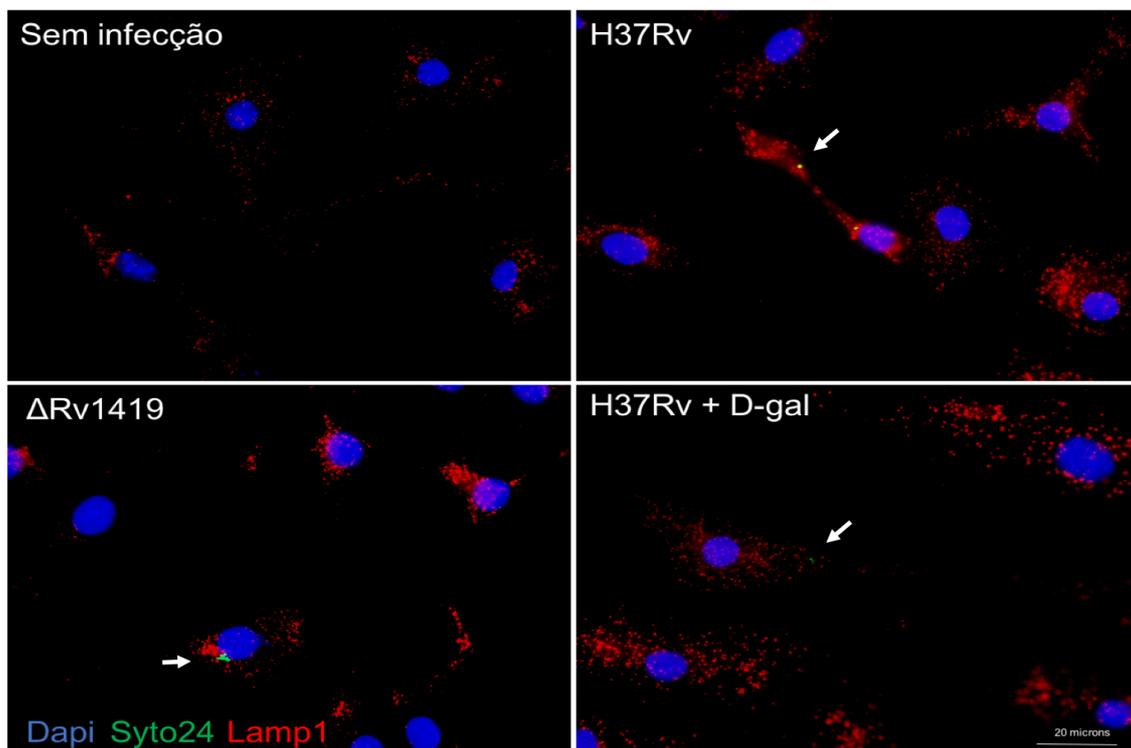


Figura 22 A sMTL-13 de Mtb induz o recrutamento de lisossomos durante a fagocitose. O recrutamento de lisossomos intracelulares foi avaliado através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo corado com DAPI (azul), a Mtb syto24 (verde), a proteína Lamp1 (vermelho). Dessa obtemos a infecção pela Mtb H37Rv, Mtb Δ Rv1419 e pela Mtb H37Rv pré incubado com 20 mM

de D-gal por 1h, em MOI 10. (As pranchas individuais de cada canal estão representadas no anexo AN-6)

Para compreender se a sMTL-13 de Mtb é a responsável direta pelo recrutamento de lisossomos no processo inicial da infecção, foi avaliado se células estimuladas com a proteína isolada apresentava um aumento no recrutamento de Lamp1 para a membrana da célula. No entanto, foi observado que o estímulo pela sMTL-13 na concentração de 10 ug/ml por 4h, não promoveu o recrutamento de Lamp1 observado pela infecção das células pela Mtb H37Rv, sugerindo assim a necessidade da coestimulação da proteína e da bactéria, para que ocorra esse recrutamento inicial (Fig 26).

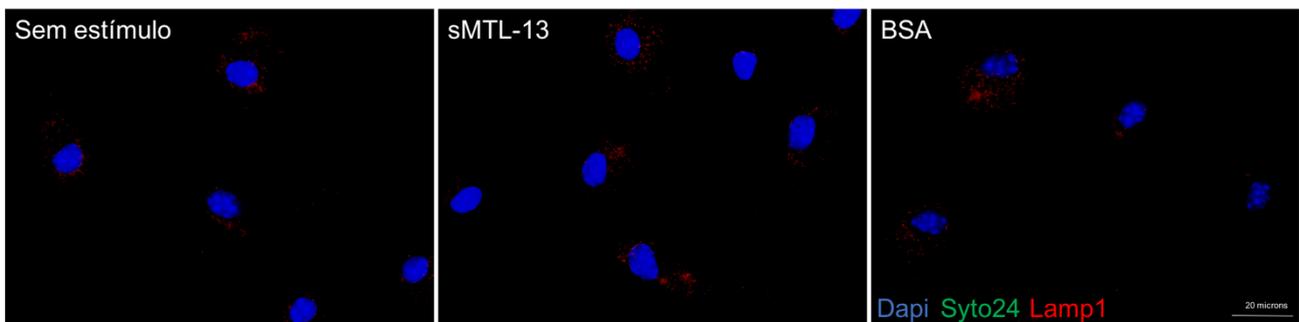


Figura 23 A sMTL-13 isolada não induz o recrutamento de lamp1 O recrutamento de lisossomos intracelulares foi avaliado através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul) e a proteína Lamp1 (vermelho). Dessa obtemos o estímulo pela sMTL-13 10 ug/ml e pelo BSA 10 ug/ml, por 4h. (As pranchas individuais de cada canal estão representadas no anexo AN-7)

5.13. A sMTL-13 de Mtb estimula a exocitose de endossomos de reciclagem de macrófagos infectados.

O acúmulo de lisossomos intracelulares já demonstrado na infecção pela Mtb Δ Rv1419, junto com a mesma intensidade de Lamp1 na membrana de células infectadas por ambas as cepas, sugere que a célula infectada pela Mtb Δ Rv1419 apresente uma falha na exocitose celular. Outras vesículas como os endossomos de reciclagem, também possuem a característica de realizar a exocitose e junto, fazem liberação de citocinas produzidas pela célula após o

estímulo e neste contexto, é importante ressaltar que o TNF- α é uma citocina transportada exclusivamente pelo ER, no qual contem o receptor de transferrina no seu interior (Stanley, Wong et al. 2014). Assim, para confirmar a modulação na exocitose dessas células pela sMTL-13 em Mtb, foi observado que a infecção pela cepa Mtb Δ Rv1419 leva a um acúmulo citoplasmático de transferrina, fato esse não observado na infecção pela cepa Mtb H37Rv, confirmando uma falha na exocitose dessa vesícula (Fig 27).

Z- stack

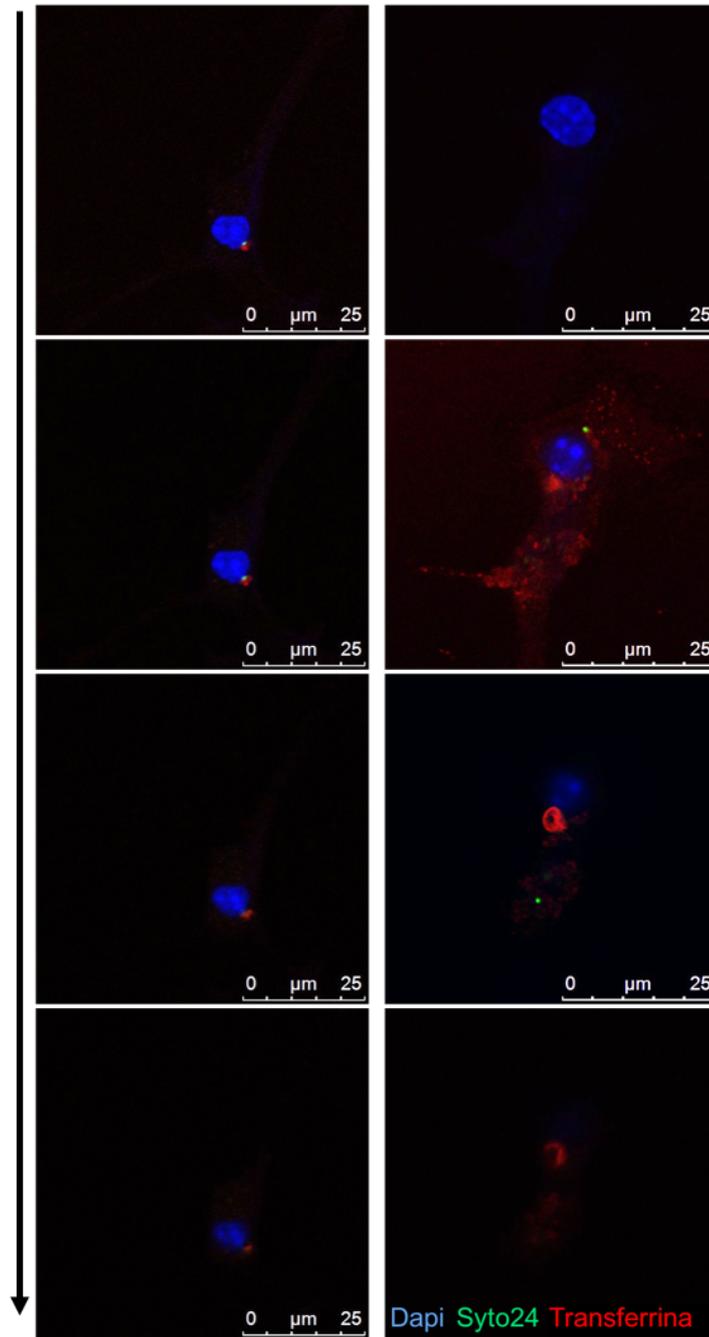


Figura 24 A *Mtb* Δ Rv1419 induz acúmulo de endossomo de reciclagem durante a infecção. Endossomos de reciclagem de macrófagos foram avaliados com a marcação para o receptor da transferrina (vermelho), pré estimulado com halo-transferrina 10 ug/ml. A infecção ocorreu pela *Mtb* H37Rv e pela *Mtb* Δ Rv1419 em MOI 10, por 6h. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul), a *Mtb* syto24 (verde), a proteína transferrina (vermelho).

6. DISCUSSÃO

A *Mtb* desenvolveu diferentes mecanismos que favoreceram a sua sobrevivência no hospedeiro, e agem desde a entrada do patógeno para se instalar nas vias aéreas, até o processo de proliferação e disseminação. Assim, o bacilo produz algumas moléculas que atuam como fatores de virulência, e dentre essas, os glicolipídios a exemplo da Lipoarabinomanna presente na superfície da bactéria, ou a Esat-6, um produto secretado pela bactéria. Estas atuam no processo de reconhecimento celular, na ativação de receptores de superfície, ou até mesmo na inibição de vesículas ácidas para evadir da degradação proteica após ser fagocitada (Fukuda, Matsumura et al. 2013, Conrad, Osman et al. 2017).

Dentre várias proteínas presentes e preditas em *Mtb*, uma lectina de 13 kDa presente na membrana desse bacilo chamou a atenção do nosso grupo. Apesar de ainda não ter sido cristalizada, já foi visto que apresenta alta similaridade estrutural com a cadeia β da toxina Ricina, sugerindo assim, um possível papel dessa lectina no reconhecimento da bactéria pela célula hospedeira (Nogueira, Cardoso et al. 2010). Denominada como sMTL-13, essa lectina apresenta capacidade imunogênica por ser reconhecida como um antígeno e ser apresentada a células T, como também apresenta capacidade de ativar a célula e induzir a produção de citocinas pró inflamatórias (Souza et al., 2012). Para compreender a importância dessa lectina no contexto da infecção pela *Mtb*, Nogueira e colaboradores (2010) desenvolveram uma bactéria com a deleção no gene Rv1419, produzindo assim um bacilo com a ausência da sMTL-13 na parede da bactéria, como também, sem apresentar essa proteína no CFP, o qual é secretado pela *Mtb* (Nogueira, Cardoso et al. 2010).

O desenvolvimento do bacilo da tuberculose pode ser modulado durante a infecção, o tanto pelas mudanças na resposta da célula imune do hospedeiro, como também pela modificações na estrutura do bacilo decorrente da utilização de medicamentos. Um exemplo foi demonstrado em estudos utilizando camundongos deficientes para a produção de TNF- α na infecção pela *Mtb*, onde a ausência dessa citocina favorece rapidamente a proliferação

do patógeno, piorando assim o quadro patológico e aumentando a mortalidade dos animais (Fremond, Allie et al. 2005, Di Paolo, Shafiani et al. 2015). Da mesma forma, a utilização de fármacos como a Isoniazida (INH), um fármaco que tem como finalidade inibir a síntese de ácidos micólicos e fragilizar a espessa camada membrana da Mtb, favorece a célula do sistema imune no combate contra esse patógeno, observando uma redução na replicação bacteriana e a melhora do quadro patológico (Botha, Ryffel 2003). Neste contexto, foi questionado se a ausência sMTL-13 reduziria a virulência da Mtb durante a infecção. Assim, foi realizado a infecção de camundongos utilizando as cepas Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419 por via intravenosa, possibilitando assim avaliar a sobrevivência dos animais e à capacidade de infectividade de ambas as bactérias em diferentes tecidos. De forma que, a Mtb Δ Rv1419 apresentou um atraso na mortalidade dos animais infectados, sugerindo que a ausência da lectina sMTL-13 leva a uma perda da virulência da bactéria.

O estado virulento de uma bactéria também é definido pela capacidade da cepa de se reproduzir em um organismo, célula ou tecido alvo. Apesar de ainda não ter sido muito elucidado o mecanismo pelo qual a Mtb consegue disseminar para outros tecidos, já foi descrito que ao se instalarem em locais como o fígado, baço e na pleura, macrófagos residentes fazem o primeiro reconhecimento da bactéria, recrutando rapidamente linfócitos T pré-sensibilizado, e assim, levando a formação do granuloma (Chawla, Parikh et al. 2012, Ranaivomanana, Raberahona et al. 2018). Considerando a possibilidade de proliferação em outros órgãos e a rápida disseminação quando essa bactéria atinge a corrente sanguínea, foi avaliado a capacidade de ambas as cepas de colonizarem e conseguirem se proliferar em diferentes órgãos, onde não foi observado diferença entre as cepas analisadas, demonstrando que a variação na mortalidade desses animais não está diretamente relacionada com a capacidade de replicação dessas bactérias.

Apesar da proliferação bacteriana ser uma das consequências da progressão da patologia, outros fatores também podem ser avaliados para determinar a capacidade da virulência de um patógeno, um exemplo é a análise histopatológica do tecido lesionado. No processo de evasão do sistema imune, a Mtb apresenta diferentes estágios de dano tecidual durante a progressão da patologia, sendo um deles a formação de um tecido caseoso, o

qual é responsável pelo aumento do processo inflamatório no local da infecção (Chawla, Parikh et al. 2012). Neste contexto, quando o organismo passa a apresentar mutações ou variações da resposta celular contra o patógeno, variações passam a ser observadas quanto ao dano tecidual gerado, como também na estrutura do granuloma, ou até no infiltrado celular decorrente da infecção. Isso é observado por exemplo na infecção pela *Mtb* em camundongos deficientes para $\text{TNF-}\alpha$, onde esses animais apresentam um menor infiltrado celular, seguido de um menor processo inflamatório nos primeiros dias de infecção. Por outro lado, esse processo se reverte nas semanas seguintes, aparentando assim uma maior sensibilidade do organismo e conseqüentemente resultando em um maior processo necrótico (Welsh, Abbott et al. 2008). Já a infecção de camundongos pela bactéria mutante para o gene *Rv1419* apresentou um menor infiltrado celular nos pulmões e também um menor processo necrótico local. Resultado semelhante observado nos trabalhos de Welsh e Botha com tecido de camundongos $\text{TNF}^{-/-}$, demonstrando que a falha no reconhecimento do bacilo interfere diretamente no desenvolvimento do processo inflamatório gerado.

O $\text{TNF-}\alpha$ por sua vez é uma das principais citocinas envolvidas na evolução da tuberculose. Como descrito anteriormente, esta citocina apresenta um balanço singular durante a infecção, sendo favorável tanto para a célula hospedeira quanto para o patógeno, dependendo do estágio infeccioso que esse sistema se encontra. Durante o estágio inicial da infecção, o $\text{TNF-}\alpha$ atua como um produto antibacteriano, assim quando a bactéria se instala no tecido essa citocina apresenta duas funções fundamentais, sendo a primeira associada a sinalização de linfócitos T, induzindo o recrutamento celular e a segunda nos macrófagos, onde ocorre a ativação da via do $\text{TNF-}\alpha$ levando ao aumento da produção de radicais livres intracelulares, como o peróxido de hidrogênio por exemplo. Estes radicais livres por sua vez estão presentes dentro das vesículas lisossomais, auxiliando a célula a matar o bacilo (Mootoo, Stylianou et al. 2009, Silva, Silva et al. 2018). Desta forma, com a infecção pela *Mtb* ΔRv1419 , foi observado a menor quantidade de $\text{TNF-}\alpha$ em pulmões de camundongos. Esta menor quantidade de $\text{TNF-}\alpha$ apresentando junto com diferença histológica no tecido infectado, sugere-se que a falta da lectina

sMTL-13 na *Mtb* induz um processo inflamatório mais ameno durante a infecção. Portanto, um menor infiltrado celular resulta em um menor processo inflamatório conseqüentemente, favorecendo assim o aumento do tempo de sobrevivência do animal infectado, mesmo que a carga bacteriana nos tecidos não tenha sido diferente. Assim, sugere-se que apesar do TNF- α agir de maneira antibacteriana no início da infecção, a sMTL-13 apresenta um papel relevante no desenvolvimento do processo inflamatório no qual é favorecido pelo TNF- α , e que por sua vez, é importante para a instalação da patologia.

Dentre as células do tecido que responde mais rapidamente a *Mtb*, encontram-se os macrófagos, os quais possuem não só a função de combater o patógeno, como também de recrutar novos grupos celulares para o local infectado. Para ocorrer esta atividade celular, o macrófago precisa secretar citocinas, como o TNF- α , para ocorrer uma atividade autócrina ou para uma sinalização quimiotática, tornando assim, um grupo celular fundamental a ser investigado durante a infecção pelo bacilo da TB (Marakalala, Raju et al. 2016). Foi observado que macrófagos derivados de medula óssea infectados com a cepa deficiente para a lectina também apresentou uma menor liberação de TNF- α em relação a cepa selvagem, corroborando estes resultados *in vitro* com os resultados obtidos *in vivo*. Curiosamente, outra citocina importante e presente na infecção pela *Mtb*, a interleucina-6 (IL-6), não apresentou diferença entre as cepas. Esse dado corrobora com dados prévios do laboratório onde a infecção por ambas as cepas, levam a uma expressão semelhante de interleucina-1 β (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10). No entanto, diferente do IL-6, a liberação do TNF- α , está diretamente associada a presença física da lectina na bactéria e não de uma possível ação ativa da bactéria. Esta informação é decorrente da análise da bactéria morta pelo calor, onde o estímulo pela bactéria mutante que foi fervida, apresenta o mesmo perfil ao induzir citocinas como o TNF- α e o IL-6, quando comparado a bactéria viva. Esta análise é importante uma vez que já foi demonstrado que estruturas da bactéria é capaz de ativar receptores de padrões mesmo quando a mesma encontra-se morta, assim gerando, apesar que em uma menor escala, a expressão de citocinas pelas células quando ocorre o reconhecimento desses organismos (Shimada et al, 2006), mostrando assim que a bactéria apresenta tanto uma ação ativa

quando viva, como também resulta em um estímulo físico quando morte. Estas análises dos perfis de citocinas durante a infecção reforçam que a redução do processo inflamatório encontrado na infecção pela *Mtb* Δ Rv1419, está associada diretamente a redução de TNF- α no sistema resultante da falta de estímulo pela sMTL-13.

Diferentes estímulos celulares, como a ativação de receptores de superfície da família TLR, induzem a produção de TNF- α por macrófagos. A liberação desta citocina para o meio extracelular é iniciada pela sinalização da membrana da célula, levando a transcrição do RNA mensageiro e a produção da proteína pela maquinaria celular (Falvo, Tsytsykova et al. 2010). Curiosamente, apesar da infecção pela *Mtb* Δ Rv1419 apresentar níveis mais baixos de TNF- α , as infecções por ambas as cepas apresentam a mesma expressão de RNA mensageiro para esta citocina (Morales et al., 2014). Mesmo que nem todos os genes que são transcritos resultam propriamente na expressão da proteína, o que poderia explicar o fenômeno observado, foi demonstrado que as quantidades de TNF- α intracelular nos macrófagos infectados por ambas as cepas também é igual. Isto sugere que a ausência da lectina durante a infecção não interfere na capacidade da célula de produzir TNF- α , e sim, que a presença da sMTL-13 na *Mtb* modula o mecanismo de liberação dessa citocina durante a infecção.

O TNF- α produzido é direcionado e ancorado na membrana celular. Sendo uma proteína considerada inicialmente como uma pré-citocina, uma vez que possui uma calda transmembranar acoplada a sua porção trimérica, a qual fica ancorada a membrana da célula. Dessa forma, ela só irá se tornar uma citocina solúvel quando for clivada da membrana por uma metaloproteinase, denominada Adam17. Essa metaloproteinase é uma proteína transmembranar que tem como função a clivagem de proteínas na superfície da célula. Além do TNF- α , a Adam17 tem ação na liberação dos receptores do TNF- α do tipo 1 e 2, como também em proteínas consideradas da “grande família dos TNFR” como o CD40 e CD44. Junto a essa função exclusiva, ela também atua concomitante a outras metaloproteinases como a Adam8 e Adam10, atuando sob diferentes classes proteicas (Algood, Lin et al. 2004, Hirayama, Awano et al. 2017). Dessa forma, a Adam17 é uma proteína chave para o processo de

clivagem do TNF- α , determinando a quantidade de citocina que será liberada pela célula. Portanto, a Adam17 poderia ser um alvo em potencial da ação da sMTL-13 ligada a Mtb durante a regulação da quantidade de TNF- α no meio extracelular, no entanto, não foi observado diferenças na expressão do RNA mensageiro e da proteína da Adam17 em macrófagos infectados por ambas as bactérias. Apesar de extensivos esforços, não foi possível mensurar o TNF- α , como pré-citocina, ligado a membrana dos macrófagos, o que avaliaria a função da Adam17. No entanto, outra forma de avaliar esta função foi observando a expressão de CD40 presente na superfície de macrófago, onde foi demonstrado que a Adam17 permanece com suas funções inalteradas ao comparar ambas as infecções. Paralelo a isso, outro alvo desta metaloproteinase, são os próprios receptores de TNF- α (TNFR1 e TNFR2), os quais foram quantificados em macrófagos infectados por ambas as bactérias. Da mesma forma, não foi observado diferenças tanto na expressão do RNA mensageiro nos dois tipos dos receptores, como também para a quantificação do receptor do tipo 1 na membrana da célula. Esse conjunto de dados, demonstram que a sMTL-13 de Mtb, não interfere com a expressão/função da Adam17 de células infectadas, sugerindo que a modulação do TNF- α ocorra em etapas anteriores a clivagem desta citocina na membrana dos macrófagos.

Na tentativa de identificar se o reconhecimento da lectina sMTL-13 de Mtb ocorre pela interação da lectina com diferentes receptores e, se estas proteínas estão envolvidas direta ou indiretamente no mecanismo de ativação celular, foi analisado o complexo formado pela interação da sMTL-13 com com extrato total de macrófagos. Esta análise revelou que a lectina tem a capacidade de se ligar a diferentes proteínas da célula, sendo que uma proteína em especial chamou a atenção, por ser um inibidor de metaloproteinase (Timp-2) (Anexo-1). Esta classe de proteínas apresenta como função principal a inibição de algumas metaloproteinases na superfície celular, as quais abrangem diferentes Adams e compoendo esses inibidores presentes em macrófago encontra-se os Timp1, 2, 3 e 4. Essas proteínas por sua vez apresentam variações dentre as suas estruturas e seus sítios de ativação, no entanto, elas também compartilham alvos, ou seja, mais de um tipo de Timp consegue inibir a mesma classe de Adam (Schubert, Collins et al. 2019). Neste

cenário, até o presente momento foi descrito que o TNF- α sofre clivagem apenas da Adam17, onde por sua vez, essa metaloproteinase sofre ação prioritariamente do Timp3. Trabalhos direcionados à análise estruturais das proteínas da família Timp, demonstram que as proteínas desta família apresentam certa similaridade estrutural e de alinhamento entre si, sendo esta similaridade variável conforme a proteína comparada (Brew and Nagase 2010). Apesar dos sítios funcionais serem bem diferentes entre as proteínas desta família, a similaridade entre elas acontece devido ao tamanho da sua região funcional na qual é responsável por reconhecer diferentes Adams (Scilabra, Pighi et al. 2018). Dentre o Timp2 e o 3 por exemplo, existe aproximadamente 45% de similaridade estrutural e apesar do Timp2 não atuar na Adam17, essas duas compartilham diferentes outras metaloproteinases, como a pro-MMP2 e a Adam12 (Brew and Nagase 2010, Schubert, Collins et al. 2019). Portanto, visto que o Timp 3 é o responsável por atuar na liberação do TNF- α da membrana celular, sugere-se que ela seja o alvo de ligação com a sMTL-13, no entanto não foi possível identificá-la no pull down. Dessa forma foi hipotetizado que durante a infecção, a sMTL-13 de Mtb, levaria a um bloqueio da Timp3 na superfície celular, favorecendo assim que a Adam17 esteja disponível para a clivagem do TNF- α , pré-formado na membrana dos macrófagos. No entanto experimentos futuros como ensaio de ligação proteica entre a sMTL-13 e a Timp3 e ensaio de atividade para a Adam17, devem ser realizados para abordar tal hipótese.

Apesar de existirem diversos estudos referentes a estrutura e sequenciamento de proteínas da família Timp, ainda não foi descrito a cristalografia da molécula do Timp3, o que impossibilita realizar projeções ou possíveis interações proteicas destas moléculas por estudos de bioinformática. Demonstrando assim que a sMTL-13 estaria ligando na Timp3. Desta forma, para demonstrar que a sMTL-13 estaria atuando de forma indireta na liberação do TNF- α da membrana celular, foi realizado um ensaio de sinergismo para a liberação desta citocina. Assim, foi observado que o estímulo conjunto da sMTL-13 e com LPS, resulta em um aumento da liberação do TNF- α por macrófagos. Como confirmação, a incubação prévia dessa lectina com a D-galactose, um carboidrato com alta afinidade com a sMTL-13, resulta na

reversão do fenótipo, confirmando assim, que a lectina tem um papel fundamental na liberação dessa citocina por macrófagos, durante a infecção pela Mtb. É importante ressaltar que de acordo com Murray R.Z. e colaboradores (2005), a liberação do TNF- α pela membrana celular está concentrado nos copos fagocítico. Dessa forma, a análise da função da Adam17 realizada através da molécula CD40 (como demonstrado), espalhada por toda superfície celular, esteja mascarando o aumento verdadeiro da atividade da Adam17, a qual estaria ocorrendo diretamente no copo fagocítico (Murray, Kay et al. 2005).

Conforme observado, as infecções pela Mtb H37Rv e pela Mtb Δ Rv1419 resultam em diferentes concentrações de TNF- α liberado, ocorrendo desde os tempos iniciais de infecção observados *in vitro* (4 horas p.i.), até tempos tardios de infecção analisados *in vivo* (56 dias p.i.), sugerindo assim que mecanismo pelo qual a sMTL-13 atua na liberação do TNF- α pela célula ocorre em diversos momentos. Assim, sugere-se que a sMTL-13 de Mtb apresente diferentes mecanismos que favoreçam o controle da liberação desta citocina.

Visto que a liberação do TNF- α está relacionada com a formação do copo fagocítico durante a fagocitose, a falta do reconhecimento da sMTL-13 em Mtb durante a infecção poderia estar interferindo no processo de fagocitose da bactéria. É de conhecimento que proteínas da classe das lectinas possuem afinidade por carboidratos, e estes por sua vez, são altamente expressos na superfície celular (Lis, Sharon, 1998), o que possibilita que sMTL-13 seja utilizada como uma fonte de reconhecimento da Mtb pela célula hospedeira. Previamente, Nogueira e colaboradores demonstraram que a sMTL-13 apresenta alta similaridade com a cadeia β da toxina Ricina, sugerindo que estas duas proteínas possam ter funções semelhantes, desta forma, a sMTL-13 é reconhecida e realiza a condução da bactéria para o meio intracelular. Foi avaliado a capacidade desta lectina de interagir com carboidratos por um alinhamento por técnicas de bioinformática entre a sMTL-13 e a D-galactose (D-gal). Apesar da cristalografia da sMTL-13 não ter sido elucidada, a estrutura hipotética realizada através do alinhamento da sua sequência de aminoácidos apresentou um possível sitio de afinidade com a D-galactose, corroborando com dados de Souza e colaboradores (2012), no qual demonstrou que a pré-

incubação da Mtb com D-gal resultava na menor ativação de macrófagos, reforçando assim a hipótese que essa lectina participa do reconhecimento da bactéria pela célula hospedeira.

Uma vez reconhecida pela superfície dos macrófagos, a Mtb passa a ser internalizada por esta célula, caracterizando o início do processo de fagocitose, e uma vez demonstrado o reconhecimento direto entre a sMTL-13 e a D-gal, sugere-se que a lectina de Mtb seja uma candidata a favorecer a internalização da bactéria. Porém, três aspectos necessitam ser levados em consideração, a capacidade de ligação da bactéria com a célula alvo, o envolvimento da membrana nessa ação (a formação do copo fagocítico) e por último a confirmação da internalização. Nesse contexto, ensaios de ligação realizado utilizando as duas cepas de bactérias, demonstraram que a presença da sMTL-13 de Mtb favorece o macrófago em reconhecer a bactéria, uma vez que as células infectadas pela cepa Mtb Δ Rv1419 apresentaram uma menor interação célula-patógeno. No entanto, uma vez que essa bactéria é reconhecida pela superfície de macrófagos, diferentes estímulos levam ao início do processo de internalização dessa bactéria, no qual é denominado como a formação do copo fagocítico (Schlam, Bagshaw et al. 2015). Esta estrutura de membrana é composta de filamentos de actina que se reorganizam e polimerizam, levando ao prolongamento da membrana plasmática. Uma vez formado, o copo fagocítico envolve o bacilo e a internaliza em forma de vesícula (Pratten e Lloyd, 1986, Lukácsi *et al.*, 2017). Contudo, dentre as análises feitas, não foi possível avaliar com clareza o processo de polimerização das células infectadas, tanto pela cepa Mtb H37Rv quando pela Mtb Δ Rv1419, não possibilitando inferir se a presença da sMTL-13 possa interferir no processo direto de polimerização de actina. Além disso, por ser uma célula ativa o macrófago demonstra a capacidade de formar contínuos prolongamentos de membrana, denominados filopodia (Isogai, van der Kammen et al. 2015) e durante a infecção, as presenças das bactérias mantem os macrófagos permanentemente ativos, principalmente quanto a movimentações de membrana. Esta atividade pode estar diretamente relacionada com o resultado observado, uma vez que foi obtido uma alta intensidade de fluorescência, tanto por citometria de fluxo quanto por microscopia em toda a célula, não possibilitando distinguir a formação do copo fagocítico ou as modificações nos

filamentos de actina decorrentes do local de reconhecimento da bactéria. No entanto, apesar da baixa detecção dessa polimerização gerada pela infecção, em ensaios de marcação para vesículas intracelulares, foi possível observar que ambas as cepas de Mtb possuem a capacidade de ser internalizada logo 6h após a infecção. Esse conjunto de dados permitem concluir que a ausência da sMTL-13 leva a um menor reconhecimento pela célula e também resulta em um retardo no processo de internalização, no entanto, isso não permite afirmar que a fagocitose em si está prejudicada, uma vez que ambas as bactérias são internalizadas.

Uma vez internalizada, a Mtb será encontrada primeiramente dentro de vesículas denominadas de fagossomos. Em um estado homeostático ou durante as infecções, onde o patógeno não interfira no desenvolvimento da célula, este fagossomo iniciará um processo de maturação vesicular, sofrendo acoplamento de proteínas sinalizadoras do citoplasma, até a fusão final com lisossomos pré-formados (Chandra, Ghanwat et al. 2015). Essa estrutura vesicular é denominada como fagolisossomo e tem como característica ser ácida, por possuir bombas de hidrogénio que interferem no pH intravesicular, como também tem a presença de lipases e proteases no seu interior que auxiliam na degradação do produto internalizado (Thorne, Oliver et al. 1976). A literatura apresenta diversas formas pelo qual a Mtb consegue evadir desse sistema vesicular, escapando para o citoplasma celular e se desenvolvendo (Jamwal, Mehrotra et al. 2016, Queval, Song et al. 2017) (Gutierrez *et al.*, 2004). Dentre os mecanismos pela qual a Mtb consegue evadir deste sistema vesicular, observa-se a inibição do recrutamento de cálcio intracelular, levando ao bloqueio dos endossomos primários, como também, no bloqueio do acoplamento de proteínas de superfície de endossomos maduros, como a PI3K e a Rab7, proteínas essas envolvidas na formação de complexos proteicos de membrana que levam a fusão entre as vesículas (Chandra, Ghanwat et al. 2015). Consequentemente a esses eventos, observa-se a redução da fusão do endossomo maduro com o lisossomo, além de redução o pH quando ocorre a formação do fagolisossomo, possibilitando assim, a desestruturação da membrana vesicular e a fuga dessa bactéria para o citoplasma da célula (Michelet *et al.*, 2018; Siqueira, Ribeiro e Travassos, 2018). Frente a diferentes mecanismos pelos quais a Mtb consegue manipular as vias endossomais, foi

realizado uma abordagem transcricional, para observar possíveis modulações que a sMTL-13 possa estar gerando na célula, baseado na infecção pela bactéria mutante *Mtb* Δ Rv1419. Pela análise de transcriptoma das células infectadas por ambas as cepas foi possível avaliar as expressões gênicas de forma ampla, que abordasse uma resposta rápida ou tardia na produção das proteínas vesiculares. Os resultados demonstraram variações em genes pontuais como o Lamp1 no mapa de genes para endossomos. Isso chama a atenção visto que o Lamp1 é uma proteína estrutural de lisossomos, e esta vesícula por sua vez, tem como característica ser inibida na infecção pela *Mtb* (Gauthier, Rossier et al. 2009). Já no mapa de endossomos de reciclagem, no qual será abordado adiante, foi observado modulações nas proteínas Rab5a e Rab35. Essas são proteínas importantes do processo de reciclagem de vesículas e no transporte proteico (Kouranti, Sachse et al. 2006). Esses mapas sugerem que a níveis gênicos, a sMTL-13 interfere nas vias vesiculares durante o processo de infecção.

Sugerido que a sMTL-13 pode atuar nas vias endossomais de macrófagos infectado, torna-se fundamental compreender todas as etapas de maturação vesicular pelo qual a bactéria pode interferir durante a fagocitose. Durante o processo de fagocitose, após o fechamento do copo fagocítico, a estrutura membranar formada desacopla da membrana celular tornando-se uma vesícula solta no citoplasma da célula. No decorrer da maturação desta vesícula até a formação de uma vesícula ácida final, responsável por degradar o produto internalizado, essa necessita passar por diversas modificações no seu percurso (Poteryaev et al., 2010). Assim que o endossomo primário se desacopla da membrana da célula, outra vesícula imatura, é encaminhada ao seu encontro e funde-se ao fagossomo (Duclos, Diez et al. 2000). Essa fusão inicia o processo de acidificação das vesículas, carreando moléculas como bombas de íons, além de proteínas secundárias que fazem o endereçamento da vesícula. Dentre as proteínas vesiculares, uma é fundamental para formação do endossomo maduro, denominada como Rab5. A Rab5, uma proteína GTPase, tem como principal função o recrutamento de outras Rabs, sendo a principal delas a Rab7, uma GTPase fundamental para a fusão lisossomal (Duclos, Diez et al. 2000, Mottola 2014). Sendo a proteína Rab5 um dos genes diferencialmente expressos no transcriptoma, foi avaliado então

o recrutamento desta proteína vesicular durante a infecção por ambas as cepas de Mtb em estudo. Nesse contexto, não foi observado variações no recrutamento dessa proteína nas células infectadas pela Mtb H37Rv ou pela Mtb Δ Rv1419, mostrando que nesse contexto, a sMTL-13 de Mtb não interfere no processo inicial de maturação endossomal. É importante ressaltar que as proteínas Rab5 possuem subformas, onde cada uma delas está predominante em tipos diferentes de estruturas. O modelo de análise em questão foi baseado na marcação da Rab5c, uma subunidade fundamental para sequencia da maturação do endossomo imaturo. Por outro lado, a proteína em destaque no transcriptoma é a Rab5a, uma subunidade funcional nas vesículas endossomo de reciclagem, variante do endossomo primário (Cabrera and Ungermann 2010, Schafer, McRae et al. 2016).

Após a ativação da Rab5 na superfície do endossomo, esta proteína inicia o recrutamento de outra proteína fundamental neste sistema, a GTPase denominada Rab7. Essa GTPase por sua vez, é fundamental para o processo final de fusões lisossomais, onde além de fazer o reconhecimento de outra vesícula, é importante para recrutar outras proteínas auxiliares, como as Vamps e sintaxinas. Estas proteínas auxiliares, tem com função o reconhecimento de outras proteínas presente na superfície do lisossomo, intensificando a ligação entre as duas vesículas (Vanlandingham and Ceresa 2009, Schafer, McRae et al. 2016). Apesar de não ter sua expressão gênica modificada, quando analisado pelo transcriptoma, já foi descrito que Mtb consegue reduzir o recrutamento das Rab7, quando comparado a uma Mtb não virulenta (Mtb H37Ra). Nesse contexto, foi demonstrado que apesar de não modificar a concentração de proteína total da célula, estudos de microscopia de fluorescência demonstraram que a Mtb H37Rv inibe o recrutamento dessa proteína do citoplasma para a superfície de endossomos. Esse processo, resultará na futura falha da fusão do fagossomo maduro com o lisossomo (Chandra, Ghanwat et al. 2015). Ao avaliar a inibição da proteína Rab7 pela lectina sMTL-13 durante a infecção pela Mtb, não foi observado diferença na expressão da Rab7 das células infectadas, como também não foi observada diferença no recrutamento da mesma avaliando as células infectadas por imunofluorescência. Pode-se concluir, portanto, que a sMTL-13 de Mtb não está envolvida no processo de fusão ou formação do fagolisossomo.

Após o acoplamento da Rab7 e das proteínas auxiliares, o lisossomo produzido pela célula é recrutado por essas proteínas e sequencialmente, sua membrana funde-se com a membrana do fagossomo maduro formando o fagolisossomo (Yamazaki et al., 2018). Uma vez fundida, essa nova estrutura demonstra uma redução do seu pH, devida a alta concentração de lipases, proteases e peróxidos de hidrogênio dentro desta estrutura. Além dessas proteínas de fusão, os fagolisossomos apresentam proteínas singulares na sua membrana, onde dentre varias encontram-se bombas de prótons v-ATPases, além de proteínas sinalizadoras que fazem o direcionamento futuro dessa vesícula (Ba et al., 2018). Junto também encontram proteínas estruturais que não apresentam uma função propriamente dita, mas estão presentes nessas vesículas desde a sua formação, sendo elas denominadas como Lamp1 e Lamp2. Assim, as proteínas Lamp acabam por também serem alvos de estudos de virulência da bactéria, por ser um componente sempre presente na membrana de lisossomos intracelular (Divangahi, Chen et al. 2009, Queval, Song et al. 2017). Além destas proteínas clássicas para os estudos de vesículas intracelulares, pela técnica de microscopia de transmissão eletrônica também é possível avaliar o lisossomo intracelular, mesmo que não tenha sido feito uma marcação específica e não permita identificar todas as estruturas e as bactérias no interior da célula. A identificação dos lisossomos ocorre através das características morfológicas próprias durante as infecções, apresentando uma estrutura circular de membrana dupla, possuindo uma coloração acinzentada escura característica por ser uma vesícula ácida, o que torna ela eletrodensa. Estas imagens tornam possível observar que as células infectadas com a Mtb Δ Rv1419 apresentam um aumento no numero de lisossomos durante a infecção. Esse aumento é direcionado a esse tipo vesicular, uma vez que endossomos e vacúolos não apresentaram diferenças nas contagens. Corroborando com esses dados, a análise de Lamp1 nessas células infectadas reproduziram o que é descrito na literatura (Malik, Iyer et al. 2001), onde a Mtb H37Rv tem a capacidade de reduzir a quantidade de lisossomos em células infectadas. No entanto, durante a infecção pela bactéria mutante, o perfil de recrutamento ou acúmulo de lisossomo ocorre de maneira contrária. Desta forma, observa-se que 72h após a infecção ocorre um aumento na expressão de Lamp1 nas células infectadas pela Mtb Δ Rv1419. Esse conjunto de dados

demonstram que a sMTL-13 de *Mtb* favorece a homeostasia vesicular da célula infecta, não levando a acúmulo de lisossomos intracelular.

Diferentes patologias podem levar a variações na biogênese dos lisossomos. Esta vesícula, é produzida pela célula na necessidade de degradação de algum produto internalizado, ou na eliminação de alguma organela, assim três são os sinais possíveis para iniciar a produção dessa estrutura. Um ocorre no início da fagocitose, assim uma vez iniciada a formação do fagossomo, vesículas ácidas começam a ser liberadas no citoplasma da célula e isso, decorre por dois motivos, sendo o primeiro a necessidade de eliminar o produto internalizado, e o segundo por uma necessidade de expansão rápida da membrana celular, onde trabalhos já demonstraram que quando um patógeno é internalizado a célula precisa de uma demanda rápida de membrana celular, assim a célula direciona essas vesículas e algumas organelas para fundirem como a membrana celular, podendo ampliá-la rapidamente (Saftig and Klumperman 2009; Gray, Choy et al. 2016; Hipolito V. E. B. et al., 2018). Outros dois sinais provem de funções intracelulares, onde um está relacionado com a formação de autofagossomos, e o outro é um sinal decorre da baixa nutricional da célula, onde isso também é um motivo para iniciar o processo autofágico. No entanto, ambos esses estímulos intracelulares resultam em uma mesma sinalização, resultando na ativação do complexo mTORc1. Uma vez ativado esse complexo libera fatores de transcrição denominados como *Tfeb*, *Tfec* e *Tfe3*, tornando-os livre para migrar para o núcleo e aumentar a produção desses lisossomos (Saftig and Klumperman 2009, Raben and Puertollano 2016, Bala and Szabo 2018, Chao, Wang et al. 2018).

Para eliminar da célula o que foi degradado, essa vesícula é encaminhada até a membrana celular e direcionada através dos filamentos de actina pelas Rabs. Uma vez na membrana, essa vesícula sofre uma fusão de membrana, abrindo o seu conteúdo e liberando-o para o meio externo. Esse é um processo contínuo da célula e assim, diferentes proteínas presentes na membrana do lisossomo, podem ser encontradas agora na superfície celular após a exocitose dessas vesículas. Dentre estas proteínas encontra-se também as Lamp1, as quais na membrana da célula ainda não teve sua função descrita mas que permite estudar a atividade de exocitose dessa célula (Kima,

Burleigh et al. 2000, Murray, Kay et al. 2005, Andrews 2017). Na análise do transcriptoma, não foi observado uma diferença na transcrição dos fatores de transcrição como TFEB ou de proteínas como mTORc, sugerindo assim que não ocorra uma variação na biogênese dos lisossomos quando comparado a infecção pelas bactérias Mtb H37Rv e a Mtb Δ Rv1419. Por outro lado, foi observado um aumento na quantidade de lisossomos após 72h de infecção, assim foi analisado como estaria a exocitose dessa vesícula, na tentativa de compreender se estaria ocorrendo um acúmulo intracelular, ou um aumento na expressão dos lisossomos. Nesse contexto, avaliando as proteínas Lamp1 na membrana da célula, foi observado que não existe diferença entre as células infectadas por ambas as cepas em estudo. Dessa forma sugere-se que o aumento de lamp1 observado anteriormente, está se acumulando no interior da célula com o passar do tempo de infecção, sugerindo, que a sMTL-13 em Mtb, mantém a homeostasia nas funções vesiculares na célula infectada, favorecendo assim a exocitose vesicular dessa célula.

Por outro lado, já foi mencionado que os lisossomos podem atuar favorecendo o processo de fagocitose, facilitando a prolongação rápida dos filamentos de actina. Coerente a essa ideia, Olsen e colaboradores demonstraram que logo após 4h de infecção por Mtb, já ocorre a presença de lisossomos no interior da célula. Apesar da abordagem celular ser parecida, as células J774.16 são tipos de macrófagos que não apresentam o mesmo perfil da BMM e por serem células pequenas, essas apresentam pouco citoplasma, o que dificulta a análise de recrutamento vesicular. Nesse contexto, avaliamos o recrutamento desses lisossomos em BMM infectados, no mesmo tempo inicial de infecção, e assim foi possível observar um aumento do recrutamento de lamp1, corroborando com Olsen. Curiosamente, não foi observado o mesmo perfil de recrutamento durante a infecção pela Mtb Δ Rv1419. Nesse caso, durante a infecção pela bactéria mutante, esta consegue ser fagocitada, mas apresenta um perfil diferente na resposta celular, o que por sua vez, corrobora com o perfil diferenciado de liberação do TNF- α previamente observado durante a infecção. Dessa forma, pode-se inferir que a sMTL-13 de Mtb apresenta um papel fundamental na sinalização celular gerada pela bactéria, uma vez que a pré incubação da Mtb H37Rv com a D-gal reduz o recrutamento de lamp1 de forma semelhante a Mtb Δ Rv1419. Por outro lado, a sMTL-13

purificada não promoveu o recrutamento de lamp1, o que é observado durante a infecção pela Mtb H37Rv. Isso leva a duas hipóteses possíveis, uma que há a necessidade de um co-estímulo para ocorrer a fagocitose e conseqüentemente a necessidade do recrutamento dessas vesículas para expandir a membrana celular ou, o fato que após o tempo de exposição analisado (4h), essa proteína já tenha sido internalizada, não sendo assim, um estímulo forte o suficiente para requerer esse recrutamento. Dessa forma, apesar de não interferir no processo direto de polimerização de actina e na formação do copo fagocítico, essa lectina presente parede da Mtb, passa a demonstrar um papel de sinalização para ocorrer uma modulação das vesículas intracelulares e conseqüentemente, a ausência dela, a bactéria leva à uma falha vesicular desde o início até tempos tardios de infecção. Curiosamente, a modulação destas vesículas lisossomais não representam uma diferença na capacidade da célula de eliminar o patógeno, ou do patógeno levar a um aumento da morte celular, uma vez que Morais e colaboradores (2014) demonstraram que a ambas as infecções apresentam mesmo perfil de crescimento intracelular, como também Abdala e colaboradores (2019) demonstraram não haver uma diferença na quantidade ou no tipo de morte celular gerada por ambas as bactérias, demonstrando assim que a sMTL-13 de Mtb, atua diretamente no recrutamento e na homeostasia dessas vesículas, sem que esse fenômeno interfira inicialmente na sobrevivência do patógeno.

Entre as variações vesiculares decorrente da comparação entre duas infecções, outro grupo de vesículas, endossomo de reciclagem (ER), também foi chamativa. Este grupo vesicular é proveniente dos fagossomos e tem como finalidade reciclar proteínas proveniente da membrana celular que foram internalizadas na fagocitose e junto, realizar o transporte e a secreção de citocinas para o meio extracelular (Kobayashi, Fukuda 2013). Por sua vez, os ER são divididos entre reciclagem rápida ou lenta, variando conforme as proteínas acessórias que esse contenha. Dentre estas proteínas, as Rab estão entre as mais importantes dos ER, por serem responsáveis pelos diferentes direcionamentos dessas vesículas (Stanley, Wong et al. 2014). Neste contexto, duas proteínas chamam a atenção durante a análise do transcriptoma dos macrófagos infectados, as rab5a e a rab35, estando reduzidas na infecção pela Mtb Δ Rv1419, em relação a Mtb H37Rv. Apesar destas duas proteínas estarem

em tipos diferentes de reciclagem, uma das classes de ER, denominada como reciclagem lenta, chama muito a atenção por esta estar associada diretamente com o transporte de citocinas (Manderson, Kay et al. 2007). Diante destas informações, foi avaliado a reciclagem de endossomo através da marcação do receptor de transferrina, a qual está diretamente associada a vesícula responsável por carrear citocinas do complexo de golgi até a membrana plasmática. Essa análise mostrou que a célula infectada pela Mtb Δ Rv1419, leva a um acúmulo de vesículas de reciclagem no citoplasma da célula. Este resultado é coerente com as análises feita para lisossomo, confirmando que a variação dessas vesículas ocorrer de maneira generalizada, levando a uma falha na exocitose da célula infectada pela bactéria nocaute.

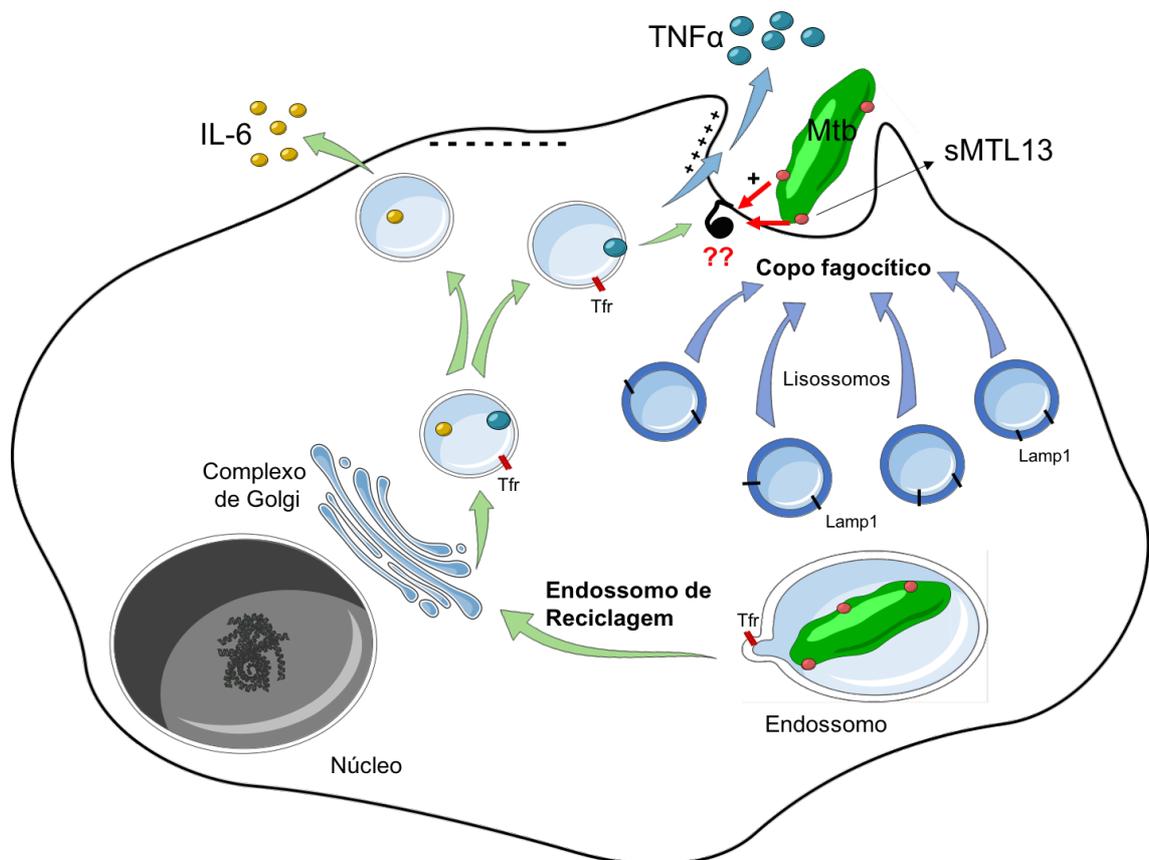
Interessante avaliar que a infecção pela Mtb leva a liberação de diferentes citocinas como mencionado anteriormente, no entanto das citocinas mensuradas, apenas o TNF- α apresentou variação na sua mensuração. Além de ser uma citocina liberada rapidamente na infecção, por ser uma proteína pré-formada, o TNF- α apresenta uma produção constante durante todo o processo infeccioso, demonstrando a sua importância em diferentes estágios da patologia/infecção. Curiosamente, o TNF- α é prioritariamente transportado por vesículas de reciclagem, que apresentaram uma falha durante a infecção pela bactéria nocaute, demonstrando ser coerente com a variação da quantificação durante dias de infecção. No entanto, junto com o TNF- α , na mesma vesícula ocorre a liberação de uma outra proteína, a IL-6 (Murray, Kay et al. 2005). Contudo, ao realizar a quantificação de IL-6 durante os mesmos tempos de infecções não foi averiguado qualquer diferença entre as infecções. Em um estudo de Murray e colaboradores, foi mostrado que durante a liberação destas citocinas ocorre um *sorting* da vesícula na etapa final, onde o ER, quando está próximo a membrana, se divide entre TNF- α e IL-6 devido a um potencial elétrico de membrana no qual é exercido sob a vesícula. Isso significa que próximo a membrana ocorre uma diferença de potencial elétrico, no qual faz com que essas citocinas, que inicialmente foram transportadas juntas, possam ser liberadas separadamente e em locais diferentes. Junto a isso, eles também mostraram que o TNF- α , tem um direcionamento direto para o copo fagocítico, enquanto que o IL-6 não. Assim, nesse contexto, temos que

a sMTL-13 de *Mtb*, tem um papel fundamental em manter a homeostasia vesicular durante a infecção, como em gerar uma sinalização inicial para favorecer a fagocitose e manter o equilíbrio da liberação de TNF- α e todos esses processos. Dessa forma, esse conjunto de dados demonstram que a sMTL-13 presente em *Mtb* tem mecanismo aumentar a liberação de TNF- α produzida pela célula, tanto no processo de fagocitose, como após a sua internalização, ao induzir o recrutamento e a fusão de vesículas de reciclagem com a membrana celular. Esse fenótipo sugere que a sMTL-13 apresente um ligante importante para o favorecimento deste sistema no qual estaria presente no processo de fusão vesicular, como por exemplo proteína Rac1 ou outras Rho ATPases, proteínas fundamentais para a ligação da vesícula de reciclagem com a membrana celular do copo fagocítico e conseqüentemente para a liberação do TNF- α (Stanley A. C et al, 2014).

Considerando a importância desse sistema em equilíbrio, junto da presença maciça do TNF- α para o desenvolvimento da patologia, nossos dados demonstram que a sMTL-13 de *Mtb* tem um papel fundamental na manutenção do processo inflamatório, sendo portanto, um fator de virulência que favorece diretamente a evolução e a disseminação do patógeno conectada ao processo inflamatório local.

7. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados demonstram que a sMTL-13 é um fator de virulência da Mtb, por favorece a instalação do processo inflamatório em pulmão de camundongos infectados ao induzir a liberação de TNF- α através da modulação da homeostasia vesicular dos macrófagos infectados.



Representação ilustrativa referente a conclusão do presente trabalho.

8. REFÊRENCIAS

ABEER M. ABD EL-AZIZA, A. E. & YOUSSEF M. A. Bacteriophage therapy increases complement mediated lysis of bacteria and enhances bacterial clearance after acute lung infection with MDR *Pseudomonas aeruginosa*. **Oxford University Press**, p. Accepted Manuscript, 2018.

ALGOOD, H. M., P. L. LIN, D. YANKURA, A. JONES, J. CHAN AND J. L. FLYNN. "TNF influences chemokine expression of macrophages in vitro and that of CD11b+ cells in vivo during *Mycobacterium tuberculosis* infection." **J Immunol**, v. 172, n. 11, p. 6846-6857, 2004.

ALMEIDA, F. M., T. L. VENTURA, E. P. AMARAL, S. C. RIBEIRO, S. D. CALIXTO, M. R. MANHAES, A. L. REZENDE, G. S. SOUZA, I. S. DE CARVALHO, E. C. SILVA, J. A. SILVA, E. C. CARVALHO, A. L. KRITSKI AND E. B. LASUNSKAIA. "Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice." **PLoS One** 12(3): e0173715, 2017.

ANDREWS, N. W.. "Detection of Lysosomal Exocytosis by Surface Exposure of Lamp1 Luminal Epitopes." **Methods Mol Biol** n.1594, p. 205-211, (2017).

ASTARIE-DEQUEKER, C., E. N. N'DIAYE, V. LE CABEC, M. G. RITTIG, J. PRANDI AND I. MARIDONNEAU-PARINI. "The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages." **Infect Immun** v.67, n.2, p.469-477, (1999).

BA, Q. *et al.* Whole-Cell Scale Dynamic Organization of Lysosomes Revealed by Spatial Statistical Analysis Article Whole-Cell Scale Dynamic Organization of Lysosomes Revealed by Spatial Statistical Analysis. **Cell Reports**, v. 23, n. 12, p. 3591– 3606, 2018

BACKERT, S. AND T. F. MEYER. "Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis." **Curr Opin Microbiol** v.9, n.2, p. 207-217, (2006).

BAFICA, A., C. A. SCANGA, C. G. FENG, C. LEIFER, A. CHEEVER AND A. SHER. "TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*." **J Exp Med** v.202, n.12, p.1715-1724, (2005).

BALA, Shashi; SZABO, Gyongyi. TFEB, a master regulator of lysosome biogenesis and autophagy, is a new player in alcoholic liver disease. **Digestive medicine research**, v. 1, 2018.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. Katarzyna *et al.* Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2,

resulting in inactivation of TNF- α . **The journal of Immunology**, v. 161, n. 5, p. 2636-2641, 1998.

KLEINE BALDERHAAR, Henning J.; UNGERMANN, Christian. CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. **J Cell Sci**, v. 126, n. 6, p. 1307-1316, 2013.

BARBERIS, Ilaria et al. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. **Journal of preventive medicine and hygiene**, v. 58, n. 1, p. E9, 2017.

Barry, C. E., 3rd, R. E. Lee, K. Mdluli, A. E. Sampson, B. G. Schroeder, R. A. Slayden and Y. Yuan. "Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions." **Prog Lipid Res** v.37, n.2-3, p.143-179, (1998).

Barthel, R., A. V. Tsytsykova, A. K. Barczak, E. Y. Tsai, C. C. Dascher, M. B. Brenner and A. E. Goldfeld. "Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300." **Mol Cell Biol** v.23, n.2, p.526-533 (2003).

Beutler, B., N. Krochin, I. W. Milsark, C. Luedke and A. Cerami. "Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance." **Science** v.232, n.4753, p.977-980, (1986).

Blander, J. M. and R. Medzhitov. "Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors." **Science** v.304, n.5673, p.1014-1018, (2004).

Bloom, B. R. and C. J. Murray. "Tuberculosis: commentary on a reemergent killer." **Science** v.257, n.5073, p.1055-1064, (1992).

Botha, T. and B. Ryffel. "Reactivation of latent tuberculosis infection in TNF-deficient mice." **J Immunol** v.171, n.6, p.3110-3118, (2003).

BOTOS, I.; SEGAL, D. M.; DAVIES, D. R. The Structural Biology of Toll-like Receptors. **Structure**, v. 19, n. 4, p. 447–459, (2011).

Brennan, P. J. and H. Nikaido. "The envelope of mycobacteria." **Annu Rev Biochem** v.64, p.29-63, (1995).

Brenner, D., H. Blaser and T. W. Mak (2015). "Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die." **Nat Rev Immunol** 15(6): 362-374.

Brew, K. and H. Nagase. "The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity." **Biochim Biophys Acta** v.1803, n.1, p.55-71, (2010).

Brightbill, H. D., D. H. Libraty, S. R. Krutzik, R. B. Yang, J. T. Belisle, J. R. Bleharski, M. Maitland, M. V. Norgard, S. E. Plevy, S. T. Smale, P. J. Brennan, B. R. Bloom, P. J. Godowski and R. L. Modlin. "Host defense mechanisms

triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors." **Science** v.285, n.5428, p.732-736, (1999).

Cabrera, M. and C. Ungermann. "Guiding endosomal maturation." **Cell** v.141, n.3, p.404-406, (2010).

Capuano, S. V., 3rd, D. A. Croix, S. Pawar, A. Zinovik, A. Myers, P. L. Lin, S. Bissel, C. Fuhrman, E. Klein and J. L. Flynn. "Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection." **Infect Immun** v.71, n.10, p.5831-5844, (2003).

Champion, P. A. and J. S. Cox. "Protein secretion systems in Mycobacteria." **Cell Microbiol** v.9, n.6, p.1376-1384, (2007).

Chan, J., X. D. Fan, S. W. Hunter, P. J. Brennan and B. R. Bloom. "Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of Mycobacterium tuberculosis within macrophages." **Infect Immun** v.59, n.5, p.1755-1761, (1991).

Chandra, P., S. Ghanwat, S. K. Matta, S. S. Yadav, M. Mehta, Z. Siddiqui, A. Singh and D. Kumar. "Mycobacterium tuberculosis Inhibits RAB7 Recruitment to Selectively Modulate Autophagy Flux in Macrophages." **Sci Rep** v.5 p.16320, (2015).

Chao, X., S. Wang, K. Zhao, Y. Li, J. A. Williams, T. Li, H. Chavan, P. Krishnamurthy, X. C. He, L. Li, A. Ballabio, H. M. Ni and W. X. Ding. "Impaired TFEB-Mediated Lysosome Biogenesis and Autophagy Promote Chronic Ethanol-Induced Liver Injury and Steatosis in Mice." **Gastroenterology** v.155, n.3, p.865-879 e812, (2018).

Chawla, M., P. Parikh, A. Saxena, M. Munshi, M. Mehta, D. Mai, A. K. Srivastava, K. V. Narasimhulu, K. E. Redding, N. Vashi, D. Kumar, A. J. Steyn and A. Singh. "Mycobacterium tuberculosis WhiB4 regulates oxidative stress response to modulate survival and dissemination in vivo." **Mol Microbiol** v.85, n.6, p.1148-1165, (2012).

Chen, W. L., J. R. Sheu, R. J. Chen, S. H. Hsiao, C. J. Hsiao, Y. C. Chou, C. L. Chung and G. Hsiao. "Mycobacterium tuberculosis Upregulates TNF-alpha Expression via TLR2/ERK Signaling and Induces MMP-1 and MMP-9 Production in Human Pleural Mesothelial Cells." **PLoS One** v.10, n.9, p.e0137979, (2015).

Churchyard, G., P. Kim, N. S. Shah, R. Rustomjee, N. Gandhi, B. Mathema, D. Dowdy, A. Kasmar and V. Cardenas. "What We Know About Tuberculosis Transmission: An Overview." **J Infect Dis** v.216, n.(suppl_6), p.S629-S635, (2017).

Co, D. O., L. H. Hogan, S. Il-Kim and M. Sandor. "T cell contributions to the different phases of granuloma formation." **Immunol Lett** v.92, n.1-2, p.135-142, (2004).

Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry, 3rd, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead and B. G. Barrell. "Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence." **Nature** v.393, n.6685, p.537-544, (1998).

Collart, M. A., D. Belin, J. D. Vassalli, S. de Kossodo and P. Vassalli. "Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors." **J Exp Med** v.164, n.6, p.2113-2118, (1986).

COLUCCI-GUYON, E. *et al.* A role for mammalian diaphanous-related formins in complement receptor (CR3)-mediated phagocytosis in macrophages. **Current Biology**, v. 15, n. 22, p. 2007–2012, 2005.

Conrad, W. H., M. M. Osman, J. K. Shanahan, F. Chu, K. K. Takaki, J. Cameron, D. Hopkinson-Woolley, R. Brosch and L. Ramakrishnan. "Mycobacterial ESX-1 secretion system mediates host cell lysis through bacterium contact-dependent gross membrane disruptions." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.114, n.6, p.1371-1376, (2017).

Converse, S. E. and J. S. Cox. "A protein secretion pathway critical for *Mycobacterium tuberculosis* virulence is conserved and functional in *Mycobacterium smegmatis*." **J Bacteriol** v.187, n.4, p.1238-1245, (2005).

Cox, D., D. J. Lee, B. M. Dale, J. Calafat and S. Greenberg. "A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.97, n.2, p.680-685, (2000).

Cruz, A. C., B. T. Frank, S. T. Edwards, P. F. Dazin, J. J. Peschon and K. C. Fang. "Tumor necrosis factor- α -converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells." **J Biol Chem** v.279, n.7, p.5612-5620, (2004).

Cuturi, M. C., M. Murphy, M. P. Costa-Giomi, R. Weinmann, B. Perussia and G. Trinchieri. "Independent regulation of tumor necrosis factor and lymphotoxin production by human peripheral blood lymphocytes." **J Exp Med** v.165, n.6, p.1581-1594, (1987).

Daniel, T. M.. "The history of tuberculosis." **Respir Med** v.100, n.11, p.1862-1870, (2006).

Devin, A., Y. Lin, S. Yamaoka, Z. Li, M. Karin and Z. Liu. "The alpha and beta subunits of I κ B kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF." **Mol Cell Biol** v.21, n.12, p.3986-3994, (2001).

Di Paolo, N. C., S. Shafiani, T. Day, T. Papayannopoulou, D. W. Russell, Y. Iwakura, D. Sherman, K. Urdahl and D. M. Shayakhmetov. "Interdependence between Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor Regulates TNF-Dependent Control of Mycobacterium tuberculosis Infection." **Immunity** v.43, n.6, p.1125-1136, (2015).

Dibbs, Z. I., A. Diwan, S. Nemoto, G. DeFreitas, M. Abdellatif, B. A. Carabello, F. G. Spinale, G. Feuerstein, N. Sivasubramanian and D. L. Mann. "Targeted overexpression of transmembrane tumor necrosis factor provokes a concentric cardiac hypertrophic phenotype." **Circulation** v.108, n.8, p.1002-1008, (2003).

Divangahi, M., M. Chen, H. Gan, D. Desjardins, T. T. Hickman, D. M. Lee, S. Fortune, S. M. Behar and H. G. Remold. "Mycobacterium tuberculosis evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair." **Nat Immunol** v.10, n.8, p.899-906, (2009).

Diwan, A., Z. Dibbs, S. Nemoto, G. DeFreitas, B. A. Carabello, N. Sivasubramanian, E. M. Wilson, F. G. Spinale and D. L. Mann. "Targeted overexpression of noncleavable and secreted forms of tumor necrosis factor provokes disparate cardiac phenotypes." **Circulation** v.109, n.2, p.262-268, (2004).

Doz, E., S. Rose, N. Court, S. Front, V. Vasseur, S. Charron, M. Gilleron, G. Puzo, I. Fremaux, Y. Delneste, F. Erard, B. Ryffel, O. R. Martin and V. F. Quesniaux. "Mycobacterial phosphatidylinositol mannosides negatively regulate host Toll-like receptor 4, MyD88-dependent proinflammatory cytokines, and TRIF-dependent co-stimulatory molecule expression." **J Biol Chem** v.284, n.35, p.23187-23196, (2009).

Duclos, S., R. Diez, J. Garin, B. Papadopoulou, A. Descoteaux, H. Stenmark and M. Desjardins. "Rab5 regulates the kiss and run fusion between phagosomes and endosomes and the acquisition of phagosome leishmanicidal properties in RAW 264.7 macrophages." **J Cell Sci** v.113 n.Pt 19, p.3531-3541, (2000).

EDELSON, B. T.; UNANUE, E. R. MyD88-Dependent but Toll-Like Receptor 2-Independent Innate Immunity to Listeria: No Role for Either in Macrophage Listericidal Activity. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 7, p. 3869–3875, 2002.

Ehlers, S., S. Kutsch, J. Benini, A. Cooper, C. Hahn, J. Gerdes, I. Orme, C. Martin and E. T. Rietschel. "NOS2-derived nitric oxide regulates the size, quantity and quality of granuloma formation in Mycobacterium avium-infected

mice without affecting bacterial loads." **Immunology** v.98, n.3, p.313-323, (1999).

Encarnacao, M., L. Espada, C. Escrevente, D. Mateus, J. Ramalho, X. Michelet, I. Santarino, V. W. Hsu, M. B. Brenner, D. C. Barral and O. V. Vieira. "A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair." **J Cell Biol** v.213, n.6, p.631-640, (2016).

Falvo, J. V., A. V. Tsytsykova and A. E. Goldfeld. "Transcriptional control of the TNF gene." **Curr Dir Autoimmun** v.11, p.27-60, (2010).

Faridgozar, M. and H. Nikoueinejad. "New findings of Toll-like receptors involved in Mycobacterium tuberculosis infection." **Pathog Glob Health** v.111, n.5, p.256-264, (2017).

FITZER-ATTAS, C. J. *et al.* Fcγ Receptor–Mediated Phagocytosis in Macrophages Lacking the Src Family Tyrosine Kinases Hck, Fgr, and Lyn. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 4, p. 669–682, 2000.

Fotin-Mleczek, M., F. Henkler, D. Samel, M. Reichwein, A. Hausser, I. Parmryd, P. Scheurich, J. A. Schmid and H. Wajant. "Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8." **J Cell Sci** v.115, n.Pt 13, p.2757-2770, (2002).

Fremont, C., N. Allie, I. Dambuza, S. I. Grivennikov, V. Yeremeev, V. F. Quesniaux, M. Jacobs and B. Ryffel. "Membrane TNF confers protection to acute mycobacterial infection." **Respir Res** v.6, p.136, (2005).

Fritsch, J., P. Zingler, V. Sarchen, A. L. Heck and S. Schutze. "Role of ubiquitination and proteolysis in the regulation of pro- and anti-apoptotic TNF-R1 signaling." **Biochim Biophys Acta Mol Cell Res** v.1864, n.11 Pt B, p.2138-2146, (2017).

Fukuda, T., T. Matsumura, M. Ato, M. Hamasaki, Y. Nishiuchi, Y. Murakami, Y. Maeda, T. Yoshimori, S. Matsumoto, K. Kobayashi, T. Kinoshita and Y. S. Morita. "Critical roles for lipomannan and lipoarabinomannan in cell wall integrity of mycobacteria and pathogenesis of tuberculosis." **MBio** v.4, n.1, p.e00472-00412, (2013).

Gangadharam, P. R., F. M. Harold and W. B. Schaefer. "Selective inhibition of nucleic acid synthesis in Mycobacterium tuberculosis by isoniazid." **Nature** v.198, p.712-714, (1963).

Gao, L. Y., S. Guo, B. McLaughlin, H. Morisaki, J. N. Engel and E. J. Brown. "A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion." **Mol Microbiol** v.53, n.6, p.1677-1693, (2004).

Gauthier, N. C., O. M. Rossier, A. Mathur, J. C. Hone and M. P. Sheetz. "Plasma membrane area increases with spread area by exocytosis of a GPI-anchored protein compartment." **Mol Biol Cell** v.20, n.14, p.3261-3272, (2009).

Gengenbacher, M. and S. H. Kaufmann. "Mycobacterium tuberculosis: success through dormancy." **FEMS Microbiol Rev** v.36, n.3, p.514-532, (2012).

Gomez, M., S. Johnson and M. L. Gennaro. "Identification of secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis by a bioinformatic approach." **Infect Immun** v.68, n.4, p.2323-2327, (2000).

Gottlieb, Y., O. Topaz, L. A. Cohen, L. D. Yakov, T. Haber, A. Morgenstern, A. Weiss, K. Chait Berman, E. Fibach and E. G. Meyron-Holtz. "Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro." **Haematologica** v.97, n.7, p.994-1002, (2012).

Grant, B. D. and J. G. Donaldson. "Pathways and mechanisms of endocytic recycling." **Nat Rev Mol Cell Biol** v.10, n.9, p.597-608, (2009).

Gray, M. A., C. H. Choy, R. M. Dayam, E. Ospina-Escobar, A. Somerville, X. Xiao, S. M. Ferguson and R. J. Botelho. "Phagocytosis Enhances Lysosomal and Bactericidal Properties by Activating the Transcription Factor TFEB." **Curr Biol** v.26, n.15, p.1955-1964, (2016).

Green, S., A. Dobrjansky, M. A. Chiasson, E. Carswell, M. K. Schwartz and L. J. Old. "Corynebacterium parvum as the priming agent in the production of tumor necrosis factor in the mouse." **J Natl Cancer Inst** v.59, n.5, p.1519-1522, (1977).

Grell, M., H. Wajant, G. Zimmermann and P. Scheurich. "The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.95, n.2, p.570-575, (1998).

Grivennikov, S. I., D. V. Kuprash, Z. G. Liu and S. A. Nedospasov. "Intracellular signals and events activated by cytokines of the tumor necrosis factor superfamily: From simple paradigms to complex mechanisms." **Int Rev Cytol** v.252, p.129-161, (2006).

Guler, M., A. Simsek, R. Ofluoglu, H. Celenk Erguden and N. Capan. "Are all granulomatous lesions tuberculosis?" **Respir Med Case Rep** v.5, p.42-44, (2012).

Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and. **Cell**, v. 119, p. 753–766, 2004.

HAYES, J. M. *et al.* Fc gamma receptors: Glycobiology and therapeutic prospects. **Journal of Inflammation Research**, v. 9, p. 209–219, 2016.

Hinson, J. M., Jr., R. W. Bradsher and S. J. Bodner. "Gram-stain neutrality of *Mycobacterium tuberculosis*." **Am Rev Respir Dis** v.123, n.4 Pt 1, p.365-366, (1981).

Hipolito, Victoria EB et al. Lysosome expansion by selective translation of lysosomal transcripts during phagocyte activation. **bioRxiv**, p. 260257, 2018.

Hirayama, A., S. Awano, Y. Seta and T. Ansai. "ADAM17 regulates TNF-alpha expression upon lipopolysaccharide stimulation in oral keratinocytes." **Biomed Res** v.38, n.3, p.157-165, (2017).

Hong-Geller, E. and R. A. Cerione. "Cdc42 and Rac stimulate exocytosis of secretory granules by activating the IP(3)/calcium pathway in RBL-2H3 mast cells." **J Cell Biol** v.148, n.3, p.481-494, (2000).

HOVLAND, A. *et al.* The complement system and toll-like receptors as integrated players in the pathophysiology of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 480– 494, 2015.

Huber, V. C., J. M. Lynch, D. J. Bucher, J. Le and D. W. Metzger. "Fc receptor-mediated phagocytosis makes a significant contribution to clearance of influenza virus infections." **J Immunol** v.166, n.12, p.7381-7388, (2001).

Imai, K., F. Hao, N. Fujita, Y. Tsuji, Y. Oe, Y. Araki, M. Hamasaki, T. Noda and T. Yoshimori. "Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation." **J Cell Sci** v.129, n.20, p.3781-3791, (2016).

Isogai, T., R. van der Kammen, D. Leyton-Puig, K. M. Kedziora, K. Jalink and M. Innocenti. "Initiation of lamellipodia and ruffles involves cooperation between mDia1 and the Arp2/3 complex." **J Cell Sci** v.128, n.20, p.3796-3810, (2015).

Jamwal, S. V., P. Mehrotra, A. Singh, Z. Siddiqui, A. Basu and K. V. Rao. "Mycobacterial escape from macrophage phagosomes to the cytoplasm represents an alternate adaptation mechanism." **Sci Rep** v.6, p.23089, (2016).

Jaumouille, V., Y. Farkash, K. Jaqaman, R. Das, C. A. Lowell and S. Grinstein. "Actin cytoskeleton reorganization by Syk regulates Fcγ receptor responsiveness by increasing its lateral mobility and clustering." **Dev Cell** v.29, n.5, p.534-546, (2014).

Jonsson, S., D. M. Musher, A. Chapman, A. Goree and E. C. Lawrence. "Phagocytosis and killing of common bacterial pathogens of the lung by human alveolar macrophages." **J Infect Dis** v.152, n.1, p.4-13, (1985).

Josefsson, E. C., H. H. Gebhard, T. P. Stossel, J. H. Hartwig and K. M. Hoffmeister. "The macrophage αMβ2 integrin αM lectin domain mediates the phagocytosis of chilled platelets." **J Biol Chem** v.280, n.18, p.18025-18032, (2005).

Jung, I. D., S. K. Jeong, C. M. Lee, K. T. Noh, D. R. Heo, Y. K. Shin, C. H. Yun, W. J. Koh, S. Akira, J. Whang, H. J. Kim, W. S. Park, S. J. Shin and Y. M. Park. "Enhanced efficacy of therapeutic cancer vaccines produced by co-treatment with Mycobacterium tuberculosis heparin-binding hemagglutinin, a novel TLR4 agonist." **Cancer Res** v.71, n.8, p.2858-2870, (2011).

Kang, J., K. H. Park, J. J. Kim, E. K. Jo, M. K. Han and U. H. Kim. "The role of CD38 in Fcγ receptor (FcγR)-mediated phagocytosis in murine macrophages." **J Biol Chem** v.287, n.18, p.14502-14514, (2012).

Karunakaran, S., T. Sasser, S. Rajalekshmi and R. A. Fratti. "SNAREs, HOPS and regulatory lipids control the dynamics of vacuolar actin during homotypic fusion in *S. cerevisiae*." **J Cell Sci** v.125, n.Pt 7, p.1683-1692, (2012).

Kaufmann, S. H. and A. Dorhoi. "Inflammation in tuberculosis: interactions, imbalances and interventions." **Curr Opin Immunol** v.25, n.4, p.441-449, (2013).

Kaur, D., A. Obregon-Henao, H. Pham, D. Chatterjee, P. J. Brennan and M. Jackson. "Lipoarabinomannan of Mycobacterium: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.105, n.46, p.17973-17977, (2008).

Khader, S. A., J. Rangel-Moreno, J. J. Fountain, C. A. Martino, W. W. Reiley, J. E. Pearl, G. M. Winslow, D. L. Woodland, T. D. Randall and A. M. Cooper. "In a murine tuberculosis model, the absence of homeostatic chemokines delays granuloma formation and protective immunity." **J Immunol** v.183, n.12, p.8004-8014, (2009).

Kiazyk, S. and T. B. Ball. "Latent tuberculosis infection: An overview." **Can Commun Dis Rep** v.43, n.3-4, p.62-66, (2017).

KIMA, Peter E.; BURLEIGH, Barbara; ANDREWS, Norma W. Surface-targeted lysosomal membrane glycoprotein-1 (Lamp-1) enhances lysosome exocytosis and cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. **Cellular microbiology**, v. 2, n. 6, p. 477-486, 2000.

Kobayashi, H. and M. Fukuda. "Arf6, Rab11 and transferrin receptor define distinct populations of recycling endosomes." **Commun Integr Biol** v.6, n.5, p.e25036, (2013).

Kolbe, K., S. K. Veleti, N. Reiling and T. K. Lindhorst. "Lectins of Mycobacterium tuberculosis - rarely studied proteins." **Beilstein J Org Chem** v.15, p.1-15, (2019).

Kouranti, I., M. Sachse, N. Arouche, B. Goud and A. Echard. "Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis." **Curr Biol** v.16, n.17, p.1719-1725, (2006).

Kriegler, M., C. Perez, K. DeFay, I. Albert and S. D. Lu. "A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF." **Cell** v.53, n.1, p.45-53, (1988).

Lahat, N., M. A. Rahat, A. Kinary, L. Weiss-Cerem, S. Pinchevski and H. Bitterman. "Hypoxia enhances lysosomal TNF-alpha degradation in mouse peritoneal macrophages." **Am J Physiol Cell Physiol** v.295, n.1, p.C2-12, (2008).

LUKÁCSI, S. *et al.* The role of CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in complement-mediated phagocytosis and podosome formation by human phagocytes. **Immunology Letters**, v. 189, n. May, p. 64–72, 2017.

LANGEMEYER, L.; FRÖHLICH, F.; UNGERMANN, C. Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 11, p. 957– 970, 2018.

Largent, B. L., K. M. Walton, C. A. Hoppe, Y. C. Lee and R. L. Schnaar. "Carbohydrate-specific adhesion of alveolar macrophages to mannose-derivatized surfaces." **J Biol Chem** v.259, n.3, p.1764-1769, (1984).

LATZ, E. *et al.* Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll- like receptor 9. **Nature Immunology**, v. 8, n. 7, p. 772–779, 2007.

Le Cabec, V., S. Carreno, A. Moisand, C. Bordier and I. Maridonneau-Parini. "Complement receptor 3 (CD11b/CD18) mediates type I and type II phagocytosis during nonopsonic and opsonic phagocytosis, respectively." **J Immunol** v.169, n.4, p.2003-2009, (2002).

Lee, H., G. W. Koo, J. H. Min, T. S. Park, D. W. Park, J. Y. Moon, S. H. Kim, T. H. Kim, H. J. Yoon and J. W. Sohn. "Factors associated with non-initiation of latent tuberculosis treatment among healthcare workers with a positive interferon-gamma releasing assay." **Sci Rep** v.9, n.1, p.61, (2019).

LEVIN, Roni; GRINSTEIN, Sergio; CANTON, Johnathan. The life cycle of phagosomes: formation, maturation, and resolution. **Immunological reviews**, v. 273, n. 1, p. 156-179, 2016.

Lewis, V., S. A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius and I. Mellman. "Glycoproteins of the lysosomal membrane." **J Cell Biol** v.100, n.6, p.1839-1847, (1985).

LEWKOWICZ, E. *et al.* The microtubule-binding protein CLIP-170 coordinates mDia1 and actin reorganization during CR3-mediated phagocytosis. **Journal of Cell Biology**, v. 183, n. 7, p. 1287–1298, 2008.

LI, Z. *et al.* Homer Tetramer Promotes Actin Bundling Activity of Article Homer Tetramer Promotes Actin Bundling Activity of Drebrin. **Structure/Folding and Design**, v. 27, n. 1, p. 1–12, 2018.

LIN, Philana Ling; FLYNN, JoAnne L. The end of the binary era: Revisiting the spectrum of tuberculosis. **The Journal of Immunology**, v. 201, n. 9, p. 2541-2548, 2018.

Lis, H. and N. Sharon. "Lectins: Carbohydrate-Specific Proteins That Mediate Cellular Recognition." **Chem Rev** v.98, n.2, p.637-674, (1998).

Machesky, L. M., R. D. Mullins, H. N. Higgs, D. A. Kaiser, L. Blanchoin, R. C. May, M. E. Hall and T. D. Pollard. "Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.96, n.7, p.3739-3744, (1999).

Malik, Z. A., S. S. Iyer and D. J. Kusner. "Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages." **J Immunol** v.166, n.5, p.3392-3401, (2001).

Manderson, A. P., J. G. Kay, L. A. Hammond, D. L. Brown and J. L. Stow. "Subcompartments of the macrophage recycling endosome direct the differential secretion of IL-6 and TNFalpha." **J Cell Biol** v.178, n.1, p.57-69, (2007).

Marakalala, M. J., R. M. Raju, K. Sharma, Y. J. Zhang, E. A. Eugenin, B. Prideaux, I. B. Daudelin, P. Y. Chen, M. G. Booty, J. H. Kim, S. Y. Eum, L. E. Via, S. M. Behar, C. E. Barry, 3rd, M. Mann, V. Dartois and E. J. Rubin. "Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized." **Nat Med** v.22, n.5, p.531-538, (2016).

May, R. C. and L. M. Machesky. "Phagocytosis and the actin cytoskeleton." **J Cell Sci** v.114, n.Pt 6, p.1061-1077, (2001).

McDonough, J. A., K. E. Hacker, A. R. Flores, M. S. Pavelka, Jr. and M. Braunstein. "The twin-arginine translocation pathway of Mycobacterium smegmatis is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases." **J Bacteriol** v.187, n.22, p.7667-7679, (2005).

Menzio, F. D., V. M. Reddy, D. Cayet, D. Raze, A. S. Debie, M. P. Dehouck, R. Cecchelli and C. Locht. "Mycobacterium tuberculosis heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions." **Microbes Infect** v.8, n.1, p.1-9, (2006).

Menzio, F. D., J. H. Rouse, M. Alavi, M. Laude-Sharp, J. Muller, R. Bischoff, M. J. Brennan and C. Locht. "Identification of a heparin-binding hemagglutinin present in mycobacteria." **J Exp Med** v.184, n.3, p.993-1001, (1996).

Michelet, X. *et al.* Lysosome-Mediated Plasma Membrane Repair Is Dependent on the Small GTPase Arl8b and Determines Cell Death Type in Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 200, n. 9, p. ji1700829, 2018.

Mootoo, A., E. Stylianou, M. A. Arias and R. Reljic. "TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality." **Inflamm Allergy Drug Targets** v.8, n.1, p.53-62, (2009).

Morita, Y. S., J. H. Patterson, H. Billman-Jacobe and M. J. McConville. "Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides." **Biochem J** v.378, n.Pt 2, p.589-597, (2004).

Morales S. L. V. **A LECTINA BACTERIANA sMTL-13 REGULA A MORTE CELULAR E PRODUÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL EM MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO POR *Mycobacterium tuberculosis***. 2014. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) – Programa de pós graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2014

Mottola, G.. "The complexity of Rab5 to Rab7 transition guarantees specificity of pathogen subversion mechanisms." **Front Cell Infect Microbiol** v.4, p.180, (2014).

Muller, S., J. Dennemarker and T. Reinheckel. "Specific functions of lysosomal proteases in endocytic and autophagic pathways." **Biochim Biophys Acta** v.1824, n.1, p.34-43, (2012).

MUNAWARA, U. *et al.* Cytokines regulate complement receptor immunoglobulin expression and phagocytosis of *Candida albicans* in human macrophages: A control point in anti-microbial immunity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–16, 2017.

Murray, R. Z., J. G. Kay, D. G. Sangermani and J. L. Stow. "A role for the phagosome in cytokine secretion." **Science** v.310, n.5753, p.1492-1495, (2005).

NIMMERJAHN, F.; RAVETCH, J. V. Fc G receptors as regulators of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. January, p. 34–47, 2008.

NIZET, V.; VARKI, A.; AEBI, M. Microbial Lectins: Hemagglutinins, Adhesins, and Toxins. [s.l.] **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2015.

Nogueira, L., F. C. Cardoso, A. M. Mattos, J. Bordignon, C. P. Figueiredo, P. Dahlstrom, C. C. Frota, C. N. Duarte Dos Santos, M. Chalhoub, B. S. Cavada, H. C. Teixeira, S. C. Oliveira, M. Barral-Netto and A. Bafica. "*Mycobacterium tuberculosis* Rv1419 encodes a secreted 13 kDa lectin with immunological reactivity during human tuberculosis." **Eur J Immunol** v.40, n.3, p.744-753, (2010).

OLAZABAL, I. M. *et al.* Rho-Kinase and Myosin-II Control Phagocytic Cup Formation during CR, but Not Fc β R, Phagocytosis Results and Discussion ROK Activity Is Required for CR-Mediated. **Current Biology**, v. 12, n. 02, p. 1413–1418, 2002.

Old, L. J. "Tumor necrosis factor (TNF)." **Science** v.230, n.4726, p.630-632, (1985).

Olivares, M. J., A. M. Gonzalez-Jamett, M. J. Guerra, X. Baez-Matus, V. Haro-Acuna, N. Martinez-Quiles and A. M. Cardenas. "Src kinases regulate de novo actin polymerization during exocytosis in neuroendocrine chromaffin cells." **PLoS One** v.9, n.6, p.e99001, (2014).

Olszewski, M. B., A. J. Groot, J. Dastyk and E. F. Knol. "TNF trafficking to human mast cell granules: mature chain-dependent endocytosis." **J Immunol** v.178, n.9, p.5701-5709, (2007).

Pallai, A., B. Kiss, G. Vereb, M. Armaka, G. Kollias, Z. Szekanecz and Z. Szondy. "Transmembrane TNF-alpha Reverse Signaling Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Proinflammatory Cytokine Formation in Macrophages by Inducing TGF-beta: Therapeutic Implications." **J Immunol** v.196, n.3, p.1146-1157, (2016).

Parry, S. L., M. Sebbag, M. Feldmann and F. M. Brennan. "Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF-alpha." **J Immunol** v.158, n.8, p.3673-3681, (1997).

Pathak, S. K., S. Basu, K. K. Basu, A. Banerjee, S. Pathak, A. Bhattacharyya, T. Kaisho, M. Kundu and J. Basu. "Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of Mycobacterium tuberculosis and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages." **Nat Immunol** v.8, n.6, p.610-618, (2007).

Pawlowski, A., M. Jansson, M. Skold, M. E. Rottenberg and G. Kallenius. "Tuberculosis and HIV co-infection." **PLoS Pathog** v.8, n.2, p.e1002464, (2012).

Pimentel-Muiños, Felipe X.; SEED, Brian. Regulated commitment of TNF receptor signaling: a molecular switch for death or activation. **Immunity**, v. 11, n. 6, p. 783-793, 1999

Podinovskaia, M. and A. Spang. "The Endosomal Network: Mediators and Regulators of Endosome Maturation." **Prog Mol Subcell Biol** v.57, p.1-38, (2018).

Porat-Shliom, N., O. Milberg, A. Masedunskas and R. Weigert. "Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis." **Cell Mol Life Sci** v.70, n.12, p.2099-2121, (2013).

POTERYAEV, D. *et al.* Identification of the switch in early-to-late endosome transition. **Cell**, v. 141, n. 3, p. 497–508, 2010.

PRATTEN, M. K.; LLOYD, J. B. Pinocytosis and phagocytosis: the effect of size of a particulate substrate on its mode of capture by rat peritoneal macrophages cultured in vitro. **BBA - General Subjects**, v. 881, n. 3, p. 307–313, 1986

Pu, J., C. M. Guardia, T. Keren-Kaplan and J. S. Bonifacino. "Mechanisms and functions of lysosome positioning." **J Cell Sci** v.129, n.23, p.4329-4339, (2016).

Queval, C. J., O. R. Song, J. P. Carralot, J. M. Saliou, A. Bongiovanni, G. Deloison, N. Deboosere, S. Jouny, R. Iantomasi, V. Delorme, A. S. Debie, S. J. Park, J. C. Gouveia, S. Tomavo, R. Brosch, A. Yoshimura, E. Yeramian and P. Brodin. "Mycobacterium tuberculosis Controls Phagosomal Acidification by Targeting CISH-Mediated Signaling." **Cell Rep** v.20, n.13, p.3188-3198, (2017).

Raben, N. and R. Puertollano. "TFEB and TFE3: Linking Lysosomes to Cellular Adaptation to Stress." **Annu Rev Cell Dev Biol** v.32, p.255-278, (2016).

Rabinovitch, M. "Professional and non-professional phagocytes: an introduction." **Trends Cell Biol** v.5, n.3, p.85-87, (1995).

Rajaram, M. V., B. Ni, J. D. Morris, M. N. Brooks, T. K. Carlson, B. Bakthavachalu, D. R. Schoenberg, J. B. Torrelles and L. S. Schlesinger. "Mycobacterium tuberculosis lipomannan blocks TNF biosynthesis by regulating macrophage MAPK-activated protein kinase 2 (MK2) and microRNA miR-125b." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.108, n.42, p.17408-17413, (2011).

Ranaivomanana, P., M. Raberahona, S. Rabarioelina, Y. Borella, A. Machado, M. J. D. Randria, R. A. Rakotoarivelo, V. Rasolofo and N. Rakotosamimanana. "Cytokine Biomarkers Associated with Human Extra-Pulmonary Tuberculosis Clinical Strains and Symptoms." **Front Microbiol** v.9, p.275, (2018).

RAZE, D. *et al.* Heparin-binding hemagglutinin adhesin (HBHA) is involved in intracytosolic lipid inclusions formation in mycobacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, p. 1–15, 2018.

Rhoades, E. R., A. A. Frank and I. M. Orme. "Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent Mycobacterium tuberculosis." **Tuber Lung Dis** v.78, n.1, p.57-66, (1997).

Ricklin, D., E. S. Reis and J. D. Lambris. "Complement in disease: a defence system turning offensive." **Nat Rev Nephrol** v.12, n.7, p.383-401, (2016).

Rossol, M., U. Meusch, M. Pierer, S. Kaltenhauser, H. Hantzschel, S. Hauschildt and U. Wagner. "Interaction between transmembrane TNF and TNFR1/2 mediates the activation of monocytes by contact with T cells." **J Immunol** v.179, n.6, p.4239-4248, (2007).

RUIZ-ALCARAZ, A. J. *et al.* Characterization of human peritoneal monocyte/macrophage subsets in homeostasis: Phenotype, GATA6,

phagocytic/oxidative activities and cytokines expression. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

Saftig, P. and J. Klumperman. "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." **Nat Rev Mol Cell Biol** v.10, n.9, p.623-635, (2009).

Salzman, N. H. and F. R. Maxfield. "Fusion accessibility of endocytic compartments along the recycling and lysosomal endocytic pathways in intact cells." **J Cell Biol** v.109, n.5, p.2097-2104, (1989).

Saunders, B. M. and W. J. Britton. "Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis." **Immunol Cell Biol** v.85, n.2, p.103-111, (2007).

Saunders, B. M., A. A. Frank, I. M. Orme and A. M. Cooper. "CD4 is required for the development of a protective granulomatous response to pulmonary tuberculosis." **Cell Immunol** v.216, n.1-2, p.65-72, (2002).

Schafer, J. C., R. E. McRae, E. H. Manning, L. A. Lapierre and J. R. Goldenring. "Rab11-FIP1A regulates early trafficking into the recycling endosomes." **Exp Cell Res** v.340, n.2, p.259-273, (2016).

Schindler, C., Y. Chen, J. Pu, X. Guo and J. S. Bonifacino. "EARP is a multisubunit tethering complex involved in endocytic recycling." **Nat Cell Biol** v.17, n.5, p.639-650, (2015).

Schlam, D., R. D. Bagshaw, S. A. Freeman, R. F. Collins, T. Pawson, G. D. Fairn and S. Grinstein. "Phosphoinositide 3-kinase enables phagocytosis of large particles by terminating actin assembly through Rac/Cdc42 GTPase-activating proteins." **Nat Commun** v.6, p.8623, (2015).

SCHREIBER, A. D. *et al.* The FcγReceptors on Human Macrophages. **Transfusion Medicine Reviews**, v. 3, n. 4, p. 282–289, 1989.

Schubert, K., L. E. Collins, P. Green, H. Nagase and L. Troeberg. "LRP1 Controls TNF Release via the TIMP-3/ADAM17 Axis in Endotoxin-Activated Macrophages." **J Immunol** v.202, n.5, p.1501-1509, (2019).

Scilabra, S. D., M. Pighi, V. Pravata, T. Schatzl, S. A. Muller, L. Troeberg and S. F. Lichtenthaler. "Increased TIMP-3 expression alters the cellular secretome through dual inhibition of the metalloprotease ADAM10 and ligand-binding of the LRP-1 receptor." **Sci Rep** v.8, n.1, p.14697, (2018).

Sendide, K., N. E. Reiner, J. S. Lee, S. Bourgoin, A. Talal and Z. Hmama. "Cross-talk between CD14 and complement receptor 3 promotes phagocytosis of mycobacteria: regulation by phosphatidylinositol 3-kinase and cytohesin-1." **J Immunol** v.174, n.7, p.4210-4219, (2005).

SHAH, Kabeer K.; PRITT, Bobbi S.; ALEXANDER, Mariam P. Histopathologic review of granulomatous inflammation. **Journal of clinical tuberculosis and other Mycobacterial Diseases**, v. 7, p. 1-12, 2017

Shakhov, A. N., M. A. Collart, P. Vassalli, S. A. Nedospasov and C. V. Jongeneel. "Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages." **J Exp Med** v.171, n.1, p.35-47, (1990).

SHAKYA, S. *et al.* Rab22A recruits BLOC-1 and BLOC-2 to promote the biogenesis of recycling endosomes. **EMBO reports**, p. e45918, 2018.

Sheff, D. R., E. A. Daro, M. Hull and I. Mellman. "The receptor recycling pathway contains two distinct populations of early endosomes with different sorting functions." **J Cell Biol** v.145, n.1, p.123-139, (1999).

SHINNICK, T. M. Tuberculosis 1. ed. Berlin: **Springer**, 1996

Shurety, W., A. Merino-Trigo, D. Brown, D. A. Hume and J. L. Stow. "Localization and post-Golgi trafficking of tumor necrosis factor-alpha in macrophages." **J Interferon Cytokine Res** v.20, n.4, p.427-438, (2000).

Siegmund, D., J. Kums, M. Ehrenschwender and H. Wajant. "Activation of TNFR2 sensitizes macrophages for TNFR1-mediated necroptosis." **Cell Death Dis** v.7, n.9, p.e2375, (2016).

Silva, D., M. V. D. Silva, C. C. O. Barros, P. B. D. Alexandre, R. P. Timoteo, J. S. Catarino, H. Sales-Campos, J. R. Machado, D. B. R. Rodrigues, C. J. Oliveira and V. Rodrigues. "TNF-alpha blockade impairs in vitro tuberculous granuloma formation and down modulate Th1, Th17 and Treg cytokines." **PLoS One** v.13, n.3, p.e0194430, (2018).

Siqueira, M. Da S.; Ribeiro, R. De M.; Travassos, L. H. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.

Silva Miranda, M., A. Breiman, S. Allain, F. Deknuydt and F. Altare. "The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria?" **Clin Dev Immunol** v.2012, p.139127, (2012).

Sobajima, T., S. I. Yoshimura, T. Maeda, H. Miyata, E. Miyoshi and A. Harada. "The Rab11-binding protein RELCH/KIAA1468 controls intracellular cholesterol distribution." **J Cell Biol** v.217, n.5, p.1777-1796, (2018).

Sorensen, A. L., S. Nagai, G. Houen, P. Andersen and A. B. Andersen. "Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis." **Infect Immun** v.63, n.5, p.1710-1717, (1995).

Souza N. M. **AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DA SMTL-13, UMA LECTINA SECRETADA DE *Mycobacterium tuberculosis*** 2012. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) - Programa de pós graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 2012

Spriggs, D., K. Imamura, C. Rodriguez, J. Horiguchi and D. W. Kufe. "Induction of tumor necrosis factor expression and resistance in a human breast tumor cell line." **Proc Natl Acad Sci U S A** v.84, n.18, p.6563-6566, (1987).

STAMM, C. E.; COLLINS, A. C.; SHILOH, M. U. Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 204–219, 2015.

Stanley, A. C., C. X. Wong, M. Micaroni, J. Venturato, T. Khromykh, J. L. Stow and P. Lacy. "The Rho GTPase Rac1 is required for recycling endosome-mediated secretion of TNF in macrophages." **Immunol Cell Biol** v.92, n.3, p.275-286, (2014).

Stewart, G. R., B. D. Robertson and D. B. Young. "Tuberculosis: a problem with persistence." **Nat Rev Microbiol** v.1, n.2, p.97-105, (2003).

Symon, D. N., I. C. McKay and P. C. Wilkinson. "Plasma-dependent chemotaxis of macrophages towards *mycobacterium tuberculosis* and other organisms." **Immunology** v.22, n.2, p.267-276, (1972).

Takahashi, S., K. Kubo, S. Waguri, A. Yabashi, H. W. Shin, Y. Katoh and K. Nakayama. "Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane." **J Cell Sci** v.125, n.Pt 17, p.4049-4057, (2012).

Thorne, K. J., R. C. Oliver and A. J. Barrett. "Lysis and killing of bacteria by lysosomal proteinases." **Infect Immun** v.14, n.2, p.555-563, (1976).

Tosi, M. F., H. Zakem and M. Berger. "Neutrophil elastase cleaves C3bi on opsonized *pseudomonas* as well as CR1 on neutrophils to create a functionally important opsonin receptor mismatch." **J Clin Invest** v.86, n.1, p.300-308, (1990).

Trifiro, S., A. M. Bourgault, F. Lebel and P. Rene. "Ghost *mycobacteria* on Gram stain." **J Clin Microbiol** v.28, n.1, p.146-147, (1990).

TSUBOI, S.; MEERLOO, J. Wiskott-Aldrich syndrome protein is a key regulator of the phagocytic cup formation in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 47, p. 34194–34203, 2007.

Tzircotis, G., V. M. Braga and E. Caron (2011). "RhoG is required for both FcγR- and CR3-mediated phagocytosis." **J Cell Sci** v.124, n.Pt 17, p.2897-2902.

Uings, I. J. and S. N. Farrow. "Cell receptors and cell signalling." **Mol Pathol** v.53, n.6, p.295-299, (2000).

Ulrichs, T. and S. H. Kaufmann. "New insights into the function of granulomas in human tuberculosis." **J Pathol** v.208, n.2, p.261-269, (2006).

Uribe-Querol, E. and C. Rosales. "Control of Phagocytosis by Microbial Pathogens." **Front Immunol** v.8, p.1368, (2017).

van der Wel, N., D. Hava, D. Houben, D. Fluitsma, M. van Zon, J. Pierson, M. Brenner and P. J. Peters. "M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells." **Cell** v.129, n.7, p.1287-1298, (2007).

Vanlandingham, P. A. and B. P. Ceresa. "Rab7 regulates late endocytic trafficking downstream of multivesicular body biogenesis and cargo sequestration." **J Biol Chem** v.284, n.18, p.12110-12124, (2009).

Vergne, I., J. Chua and V. Deretic. "Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade." **J Exp Med** v.198, n.4, p.653-659, (2003).

Vergne, I., M. Gilleron and J. Nigou. "Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan." **Front Cell Infect Microbiol** v.4, p.187, (2014).

Wajant, H. and P. Scheurich. "TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway." **FEBS J** v.278, n.6, p.862-876, (2011).

Wajant, H. and D. Siegmund. "TNFR1 and TNFR2 in the Control of the Life and Death Balance of Macrophages." **Front Cell Dev Biol** v.7, p.91, (2019).

Weiss, G. and U. E. Schaible. "Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria." **Immunol Rev** v.264, n.1, p.182-203, (2015).

Welin, A., H. Bjornsdottir, M. Winther, K. Christenson, T. Oprea, A. Karlsson, H. Forsman, C. Dahlgren and J. Bylund. "CFP-10 from Mycobacterium tuberculosis selectively activates human neutrophils through a pertussis toxin-sensitive chemotactic receptor." **Infect Immun** v.83, n.1, p.205-213, (2015).

Welsh, K. J., A. N. Abbott, S. A. Hwang, J. Indrigo, L. Y. Armitige, M. R. Blackburn, R. L. Hunter, Jr. and J. K. Actor. "A role for tumour necrosis factor-alpha, complement C5 and interleukin-6 in the initiation and development of the mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate induced granulomatous response." **Microbiology** v.154, n.Pt 6, p.1813-1824, (2008).

WHO. Global tuberculosis report 2019. Geneva Switzerland: WHO Press 2019.

Wong, C. O., S. Gregory, H. Hu, Y. Chao, V. E. Sepulveda, Y. He, D. Li-Kroeger, W. E. Goldman, H. J. Bellen and K. Venkatachalam. "Lysosomal Degradation Is Required for Sustained Phagocytosis of Bacteria by Macrophages." **Cell Host Microbe** v.21, n.6, p.719-730 e716, (2017).

Xu, H.; Ren, D. Lysosomal Physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 77, n. 1, p. 57–80, 2015.

Xu, N., H. Yuan, W. Liu, S. Li, Y. Liu, J. Wan, X. Li, R. Zhang and Y. Chang. "Activation of RAW264.7 mouse macrophage cells in vitro through treatment with recombinant ricin toxin-binding subunit B: involvement of protein tyrosine, NF-kappaB and JAK-STAT kinase signaling pathways." **Int J Mol Med** v.32, n.3, p.729-735, (2013).

YAMAZAKI, S. *et al.* Actin polymerization is activated by terahertz irradiation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018.

Yudowski, G. A., M. A. Puthenveedu, A. G. Henry and M. von Zastrow. "Cargo-mediated regulation of a rapid Rab4-dependent recycling pathway." **Mol Biol Cell** v.20, n.11, p.2774-2784, (2009).

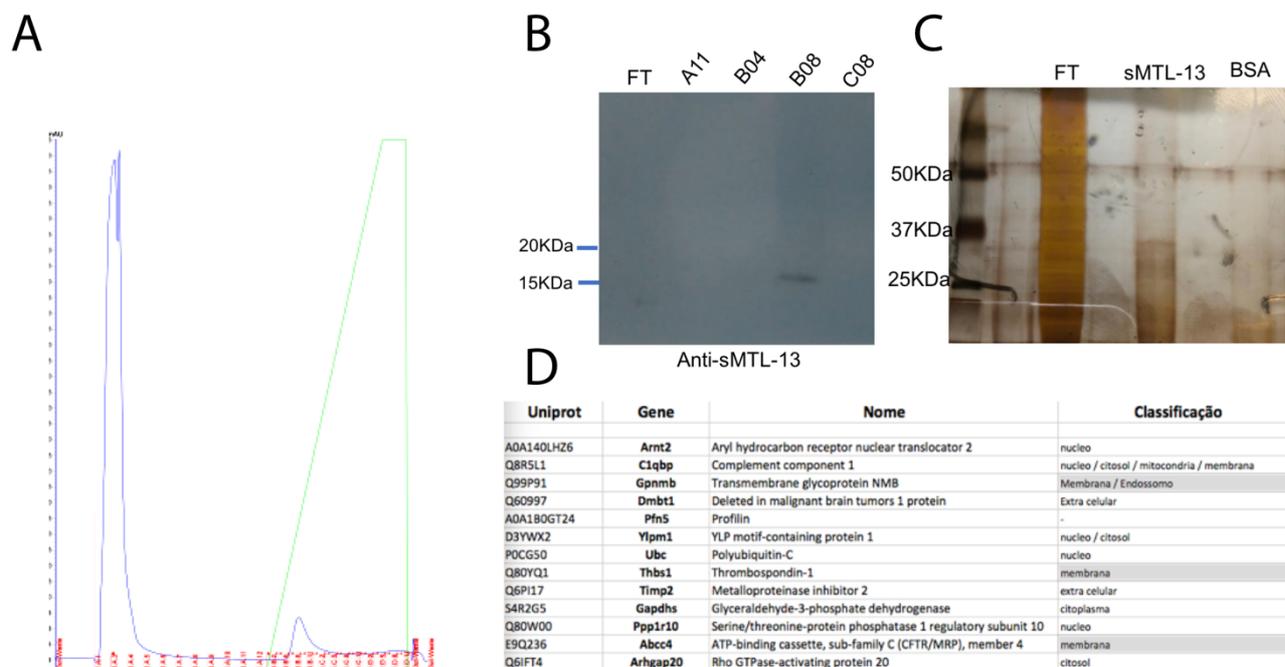
Zelensky, A. N. and J. E. Gready. "The C-type lectin-like domain superfamily." **FEBS J** v.272, n.24, p.6179-6217, (2005).

Zhu, Y., P. M. Ng, L. Wang, B. Ho and J. L. Ding. "Diversity in lectins enables immune recognition and differentiation of wide spectrum of pathogens." **Int Immunol** v.18, n.12, p.1671-1680, (2006).

9. ANEXO

9.1. (AN-1) A sMTL-13 de Mtb liga-se a diferentes proteínas intracelulares e extracelulares de macrófagos

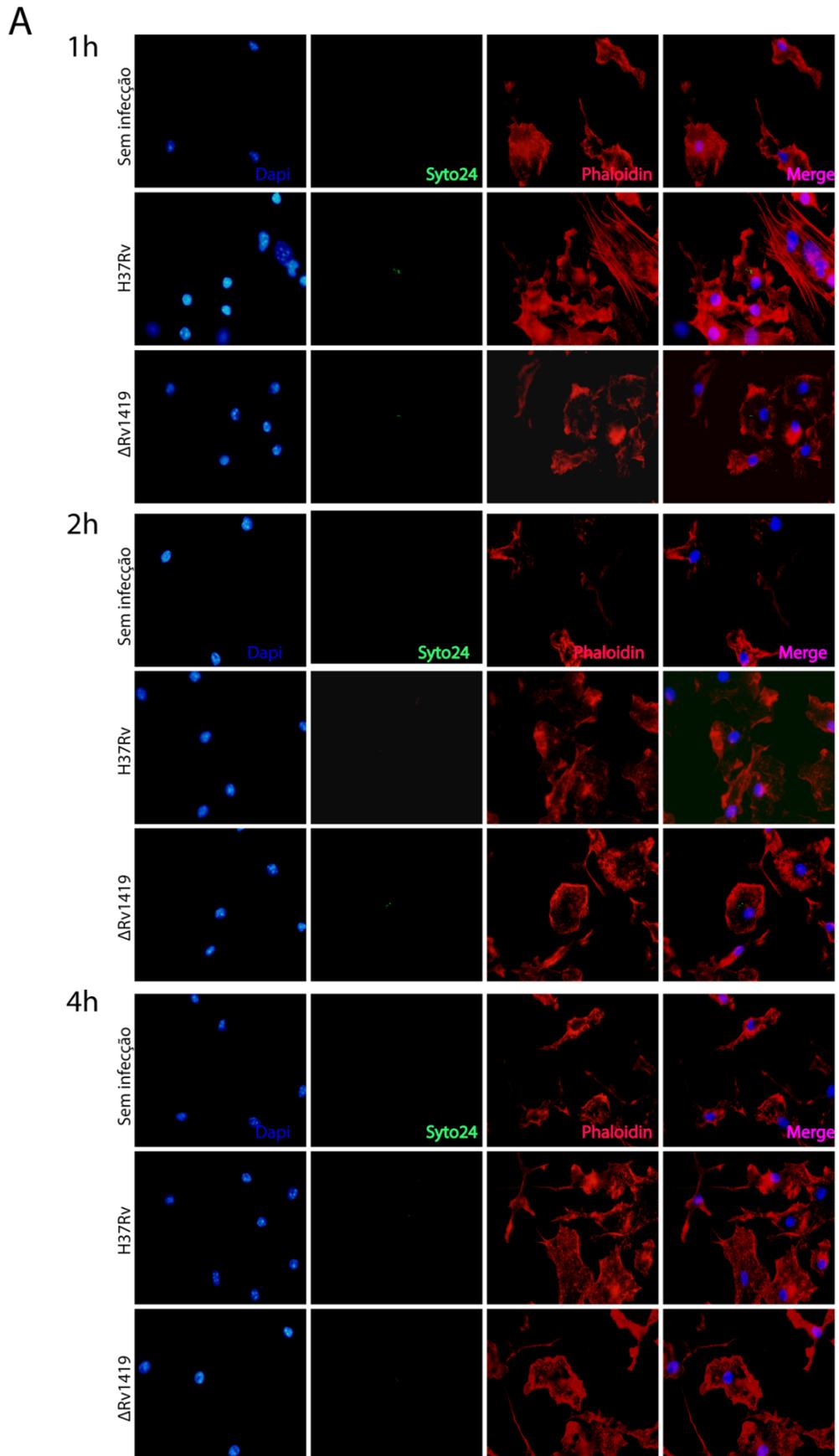
Para identificar uma proteína de macrófago responsável pela sinalização gerada pela sMTL-13 de Mtb durante a infecção, realizamos um pull down de proteínas utilizando a sMTL-13 purificada com extrato total de macrófagos, sendo esse complexo, purificado por cromatografia de afinidade (FPLC). A avaliação dessa purificação, demonstrou uma eficiente purificação através de coluna de níquel, para afinidade com a calda de histidina presente na porção n-terminal da sMTL-13 recombinante (Fig A). Para avaliar a eficiência dessa purificação, foi realizado um Western blot para sMTL-13, onde esse apresentou a proteína apenas no pico de eluição (Fig B). Para avaliar a presença de outras proteínas carregadas pela purificação da sMTL-13, foi realizada uma análise por coloração de prata. A presença de diferentes pesos moleculares, sugerem que diferentes proteínas estejam em interação com a sMTL-13 (Fig C), sendo confirmado pela espectrometria de massa, a qual identificou 13 proteínas, distribuídas entre as porções intra e extracelulares de macrófagos murinos



AN-1 sMTL-13 de Mtb interage com diferentes proteínas de macrófagos. (A) Foi realizado um pull down a partir da purificação por afinidade, utilizando uma coluna de

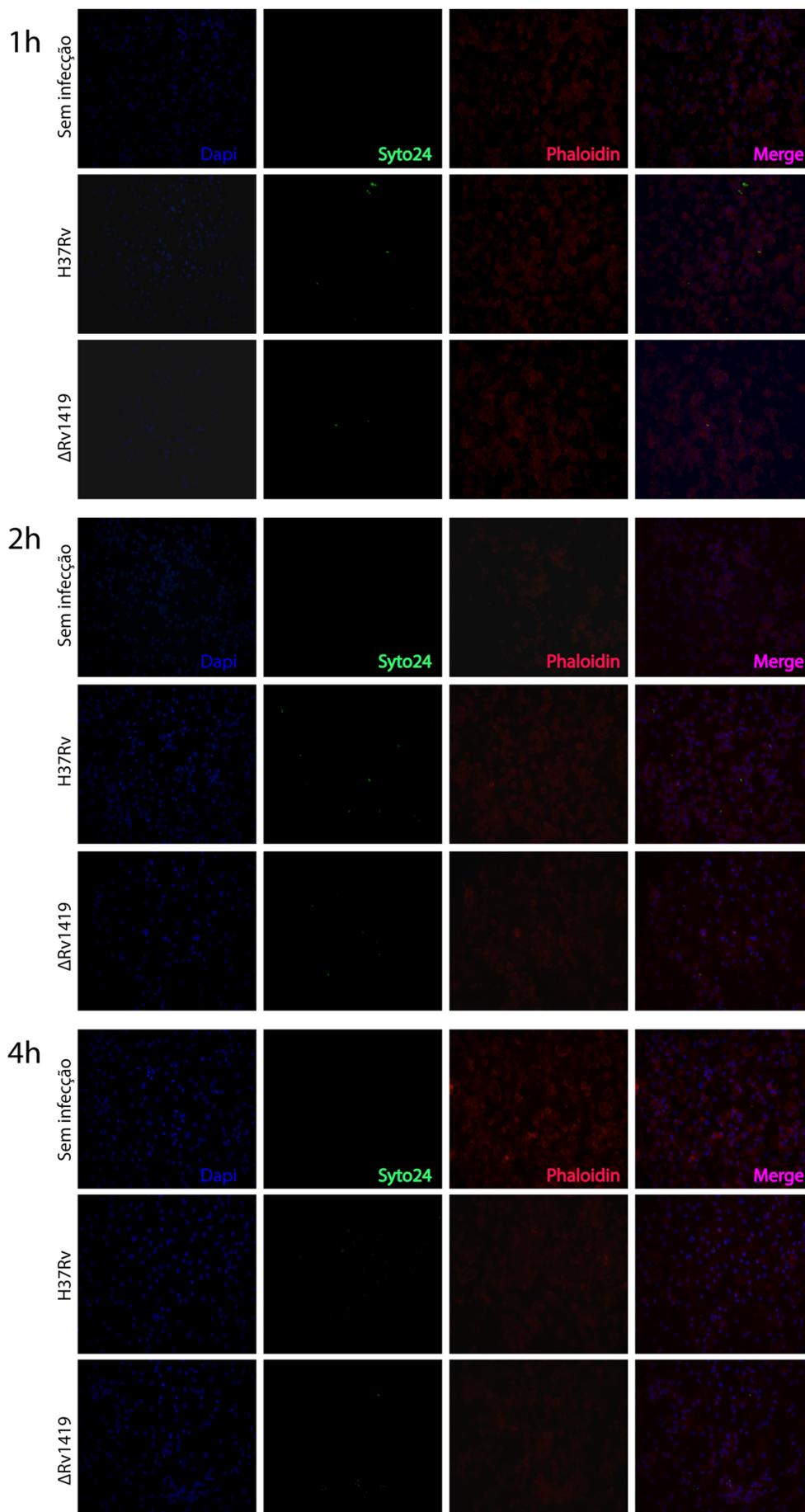
níquel Histrap FF. (B) A confirmação da eficiência na purificação foi através de Western blot para sMTL-13. (C) A coloração por prata em gel de poliacrilamida para confirmação de moléculas com diferentes pesos moleculares. (D) A análise da espectrometria foi analisada a partir do softwer Patternlab.

9.2. (AN-2) - O processo de polimerização de actina mediada pela *M. tuberculosis* é independente da presença da sMTL-13



B

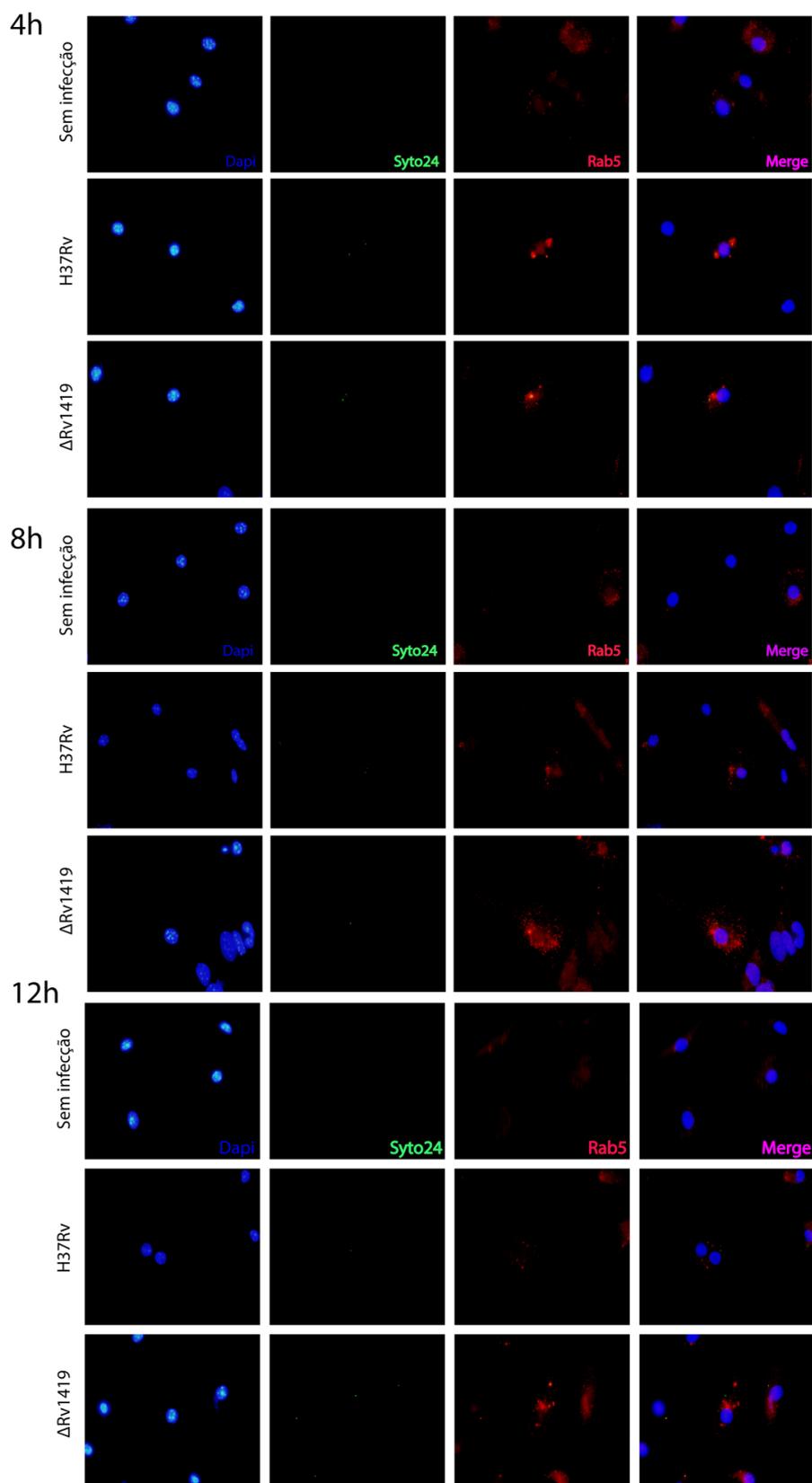
137



(AN-2) A polimerização de actina é similar durante a infecção com Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv. A avaliação qualitativa da polimerização de actina, foi realizada através

da análise das células infectadas, coradas com *Phaloidin* e analisadas por microscopia de fluorescência. Em A, observa-se as células infectadas em aumento de 100X, demonstrando que a célula apresenta um processo de polimerização similar em ambas as infecções. Já em B, observa-se uma população total com aumentos de 40x, onde o perfil das células em ambas as infecções, apresentam semelhantes entre elas. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul), a Mtb syto24 (verde), a *Phaloidin* (vermelho) e o marge das imagens (Roxo).

9.3. (AN-3) - A infecção por Mtb Δ Rv1419 induz o recrutamento de Rab5 semelhante a infecção por Mtb H37Rv

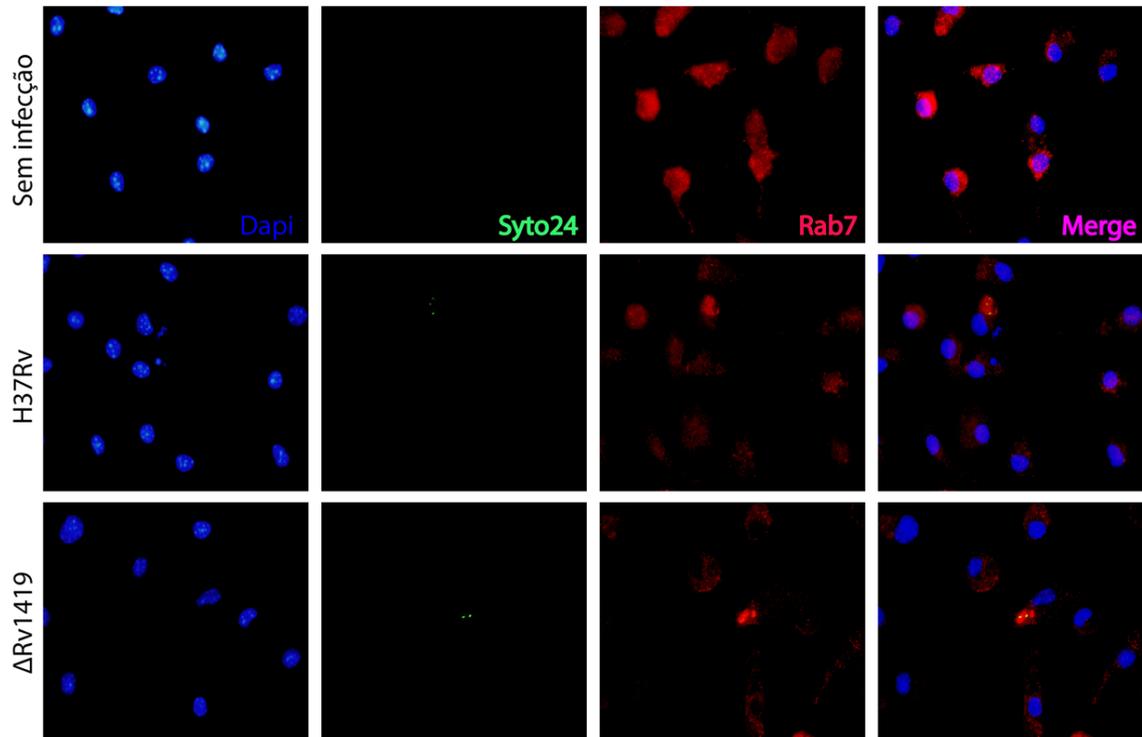


(AN-3) O recrutamento de Rab5 é semelhante durante a infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv. O Recrutamento endossomal foi avaliado pela localização e a

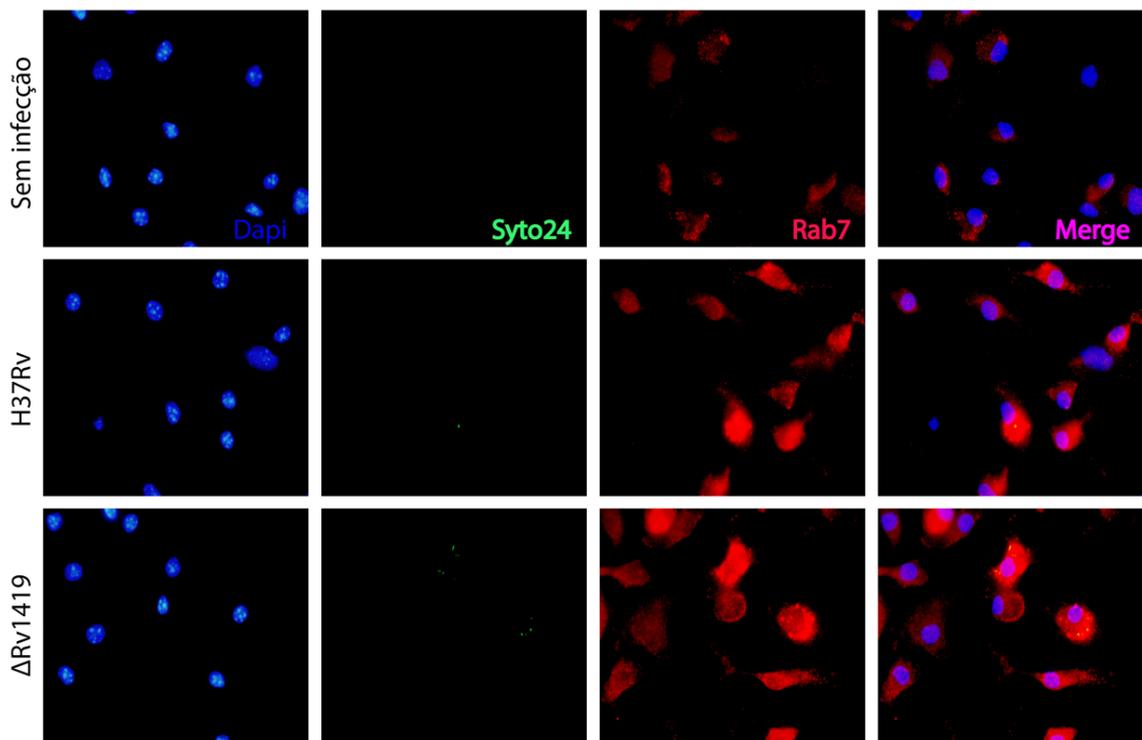
intensidade de endossomos caracterizados pela marcação da proteína Rab5, durante a infecção pela Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, em MOI 10. As imagens foram dispostas apresentando o DAPI (azul), syto24+ (verde), Rab5 (vermelho) e o merge das imagens (Roxo).

9.4. (AN-4) - A infecção por Mtb Δ Rv1419 induz produção e recrutamento de Rab7 em macrófago semelhante a infecção por Mtb H37Rv

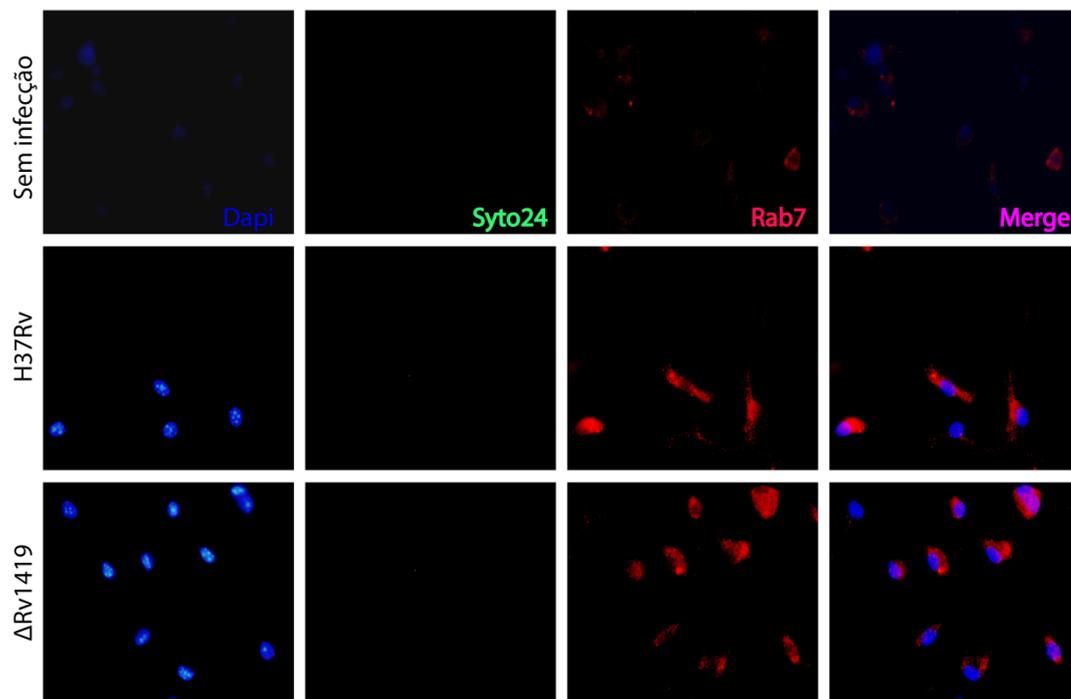
4h



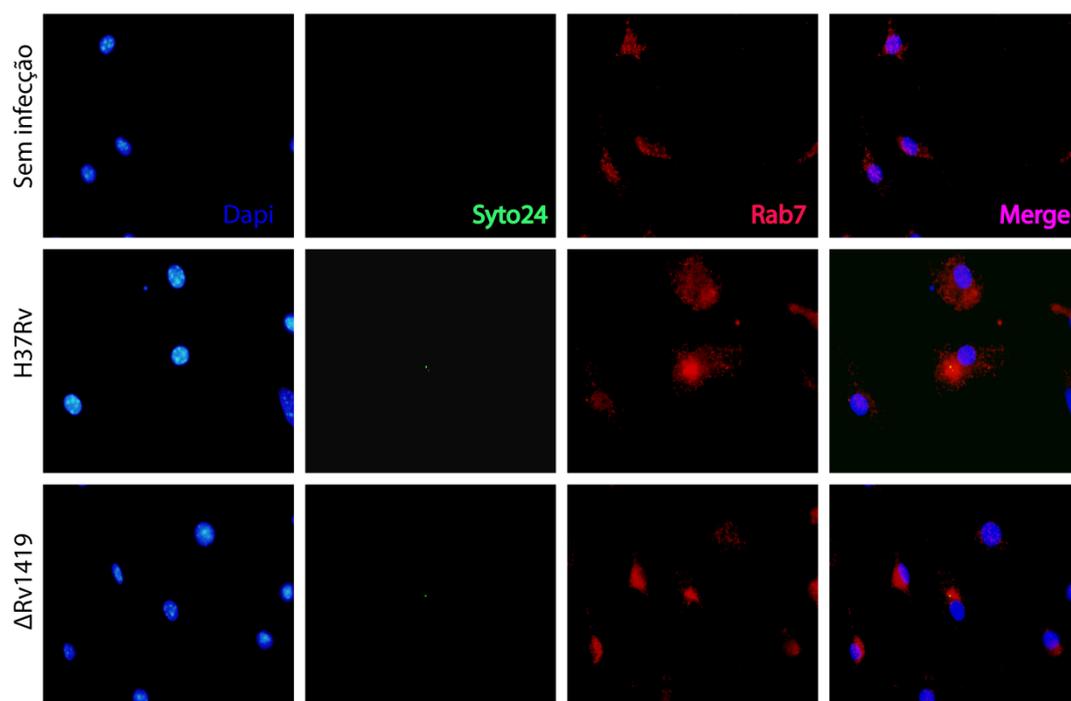
24h



48h

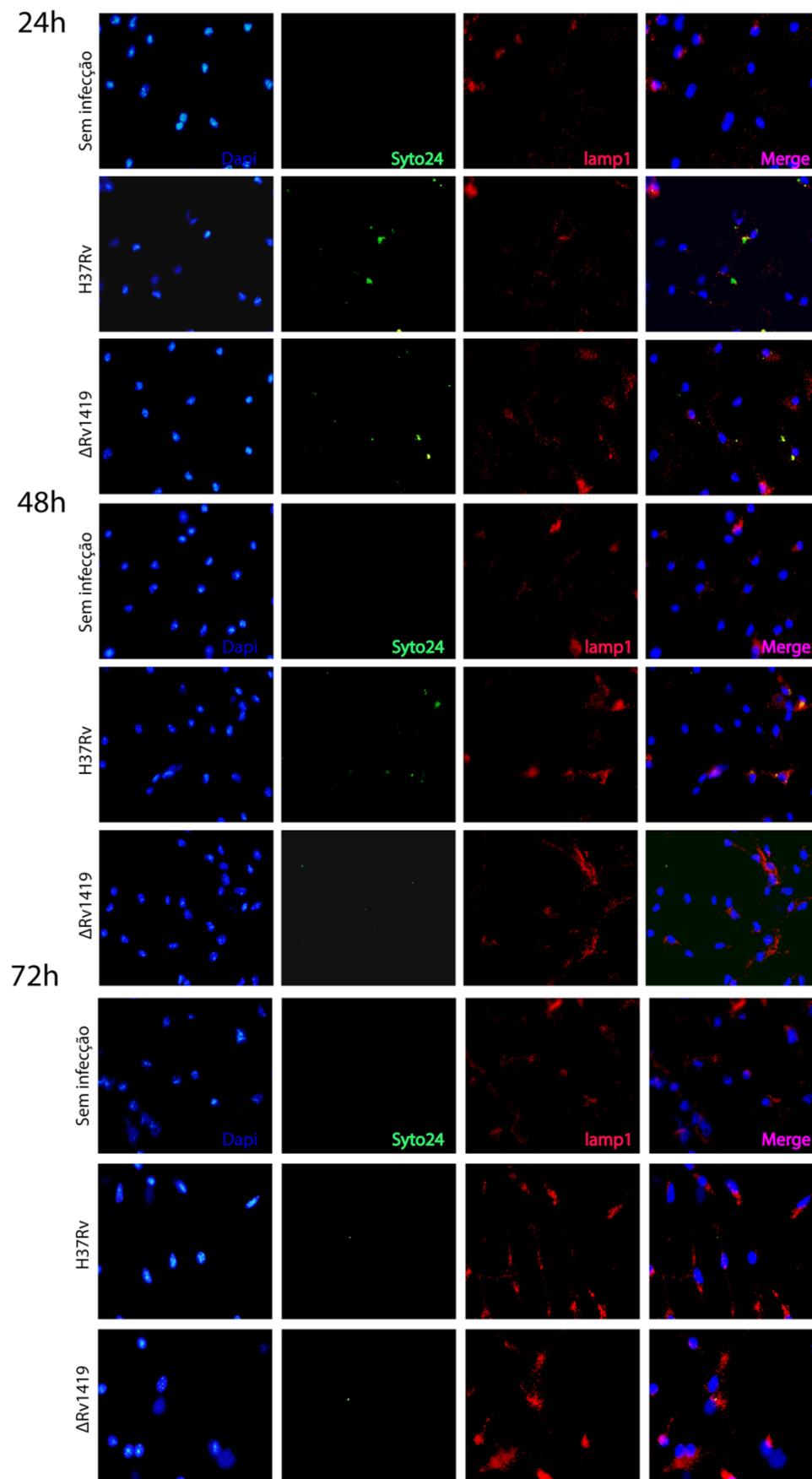


72h



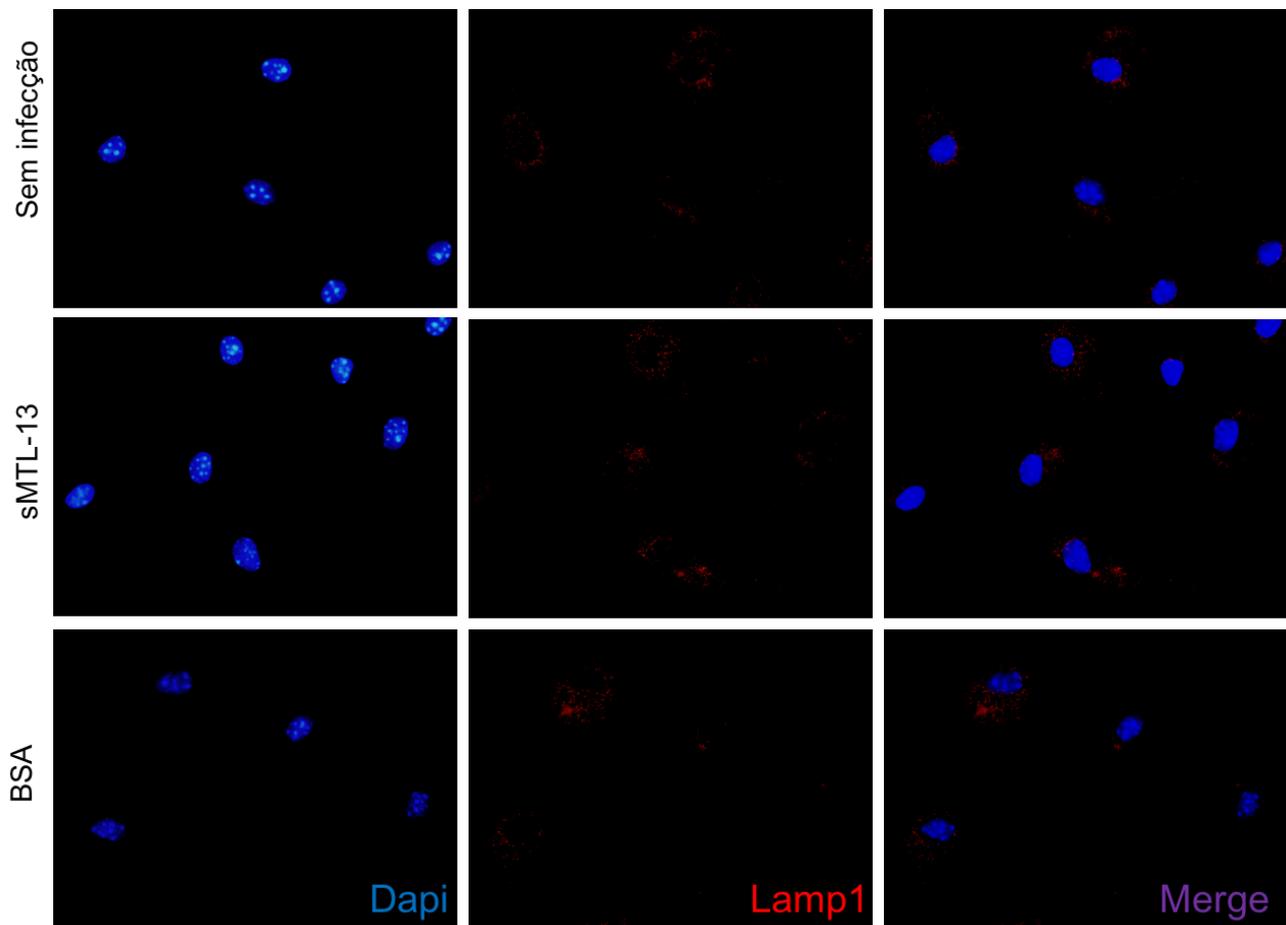
(NA-4) A infecção por Mtb Δ Rv1419 e Mtb H37Rv induz recrutamento similar de fagossomos maduros. O recrutamento de fagossomos são demonstrados pela localização e intensidade de fluorescência de proteínas Rab7 intracelulares. A análise desse recrutamento foi realizado durante a infecção pela Mtb H37Rv e Mtb Δ Rv1419, em MOI 10, apresentando o núcleo em DAPI (azul), syto24 (verde), Rab7 (vermelho) e o merge das imagens (Roxo).

9.5. (AN-5) - A infecção por Mtb Δ Rv1419 induz o acúmulo de lisossomos intracelulares de macrófagos 72h após infecção

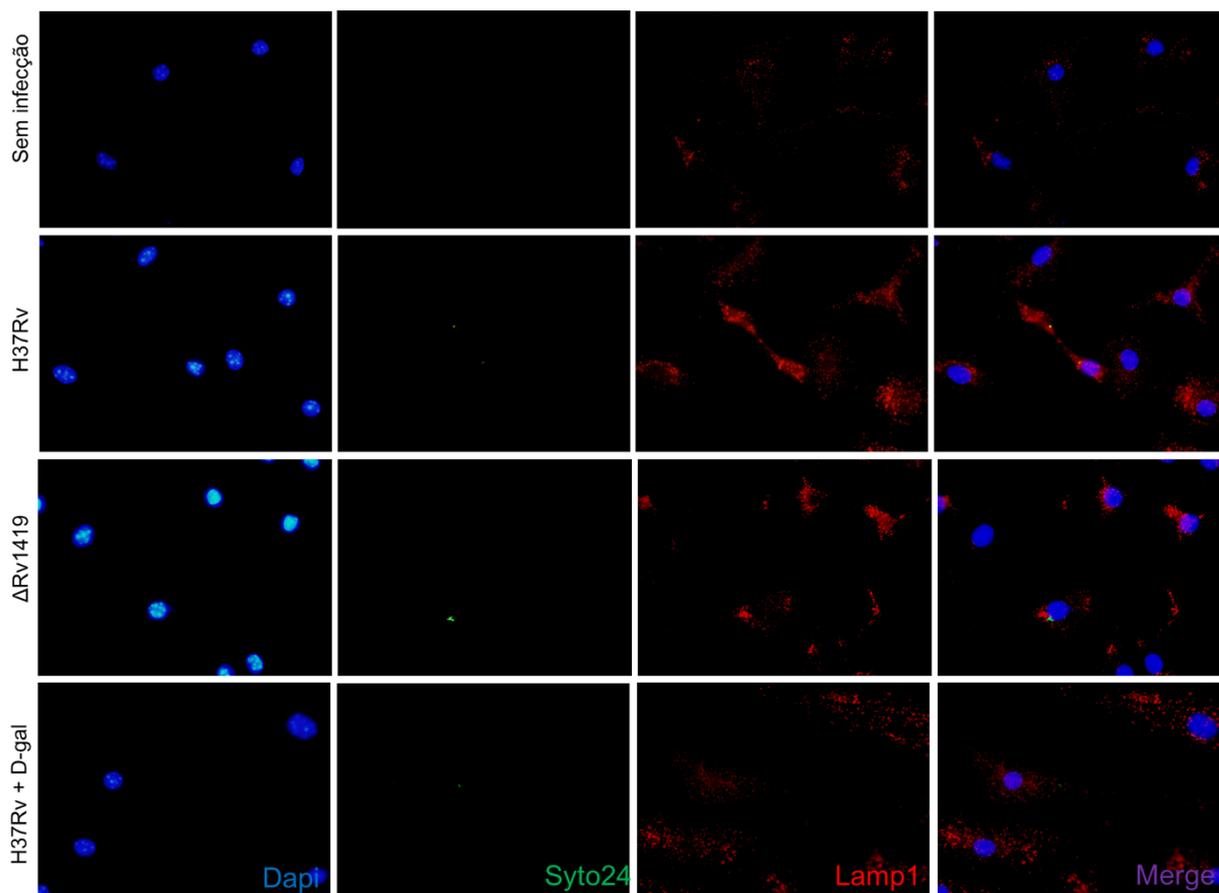


AN-5 - A Mtb Δ Rv1419 leva a um aumento do recrutamento de lisossomos tardios em macrófagos durante a infecção. O recrutamento e acúmulo de lisossomos intracelulares foram avaliados através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul), a Mtb syto24 (verde), a proteína Lamp1 (vermelho) e o merge em Roxo

9.6. (AN-6 e 7) - sMTL-13 de Mtb induz o recrutamento de Lamp1 durante a fagocitose



AN-6 - A sMTL-13 de Mtb, provoca o recrutamento de lisossomos no início da infecção. O recrutamento de lisossomos intracelulares foi avaliado através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul), syto24 (verde), Lamp1 (vermelho) e o merge (Roxo). Dessa obtemos a infecção pela Mtb H37Rv, Mtb Δ Rv1419 e pela Mtb H37Rv pré incubado com 20 mM de D-gal por 1h, em MOI 10.



(AN-7) - A sMTL-13 purificada não é capaz de estimular o recrutamento de lamp1. O recrutamento de lisossomos intracelulares foi avaliado através da proteína Lamp1. As imagens foram dispostas apresentando o núcleo em DAPI (azul) e a proteína Lamp1 (vermelho). Dessa obtemos o estímulo pela sMTL-13 10 ug/ml e pelo BSA 10 ug/ml, por 4h.