

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIA BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Giuliana Xavier De Medeiros

**ENVOLVIMENTO DA VITAMINA D NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG:
Análise da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores
inflamatórios**

Juiz de Fora

2020

GIULIANA XAVIER DE MEDEIROS

**ENVOLVIMENTO DA VITAMINA D NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG:
Análise da formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores
inflamatórios**

Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-graduação em Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Juiz de Fora para
obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas na área de concentração

Orientador: Dra. Heloísa D'Ávila da Silva Bizarro

Co-orientadora: Juciane Maria de Andrade Castro

Juiz de Fora

2020

Medeiros, Giuliana Xavier de.

ENVOLVIMENTO DA VITAMINA D NA RESPOSTA
INFLAMATÓRIA DURANTE INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
Mycobacterium bovis BCG : Análise da formação de corpúsculos
lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios / Giuliana Xavier de
Medeiros. -- 2020.

66 f. : il.

Orientadora: Heloísa D'Avila da Silva Bizarro

Coorientadora: Juciane Maria de Andrade Castro

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz
de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética,
2020.

1. Tuberculose. 2. Corpúsculos lipídicos. 3. Vitamina D. I. Bizarro,
Heloísa D'Avila da Silva, orient. II. Castro, Juciane Maria de Andrade,
coorient. III. Título.

GIULIANA XAVIER DE MEDEIROS

**ENVOLVIMENTO DA VITAMINA D NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DURANTE
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Mycobacterium bovis* BCG: ANÁLISE DA
FORMAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS E SÍNTESE DE MEDIADORES
INFLAMATÓRIOS**

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/10/2020.

BANCA EXAMINADORA:



Prof.ª Dr.ª Heloisa D'Avila da Silva Bizarro

Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora



Prof.ª Dr.ª Juciane Maria de Andrade Castro

Universidade Federal de Juiz de Fora



Dr. Daniel Afonso de Mendonça Toledo

Instituto Federal de Minas Gerais

“Questions you cannot answer are usually far better for you than answers you cannot question.”

Yuval Noah Harari

RESUMO

A tuberculose (TB) é a principal causa de morte por agente infeccioso no mundo, com cerca de 10 milhões de novos casos anualmente. É uma doença causada por micobactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, caracterizada pela infecção de células do sistema imunológico inato residentes do pulmão. Os macrófagos são as primeiras células envolvidas na tentativa de controlar a infecção, através da síntese de citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), peptídeos antimicrobianos, mediadores lipídicos, como a prostaglandina E₂, e recrutamento de outras células. O patógeno, porém, é capaz de subverter a maquinaria macrofágica a seu favor, levando à inibição das respostas antimicrobianas e favorecendo um perfil anti-inflamatório e adipogênico, que permite sua sobrevivência dentro da célula. O tratamento da TB é feito com antibióticos, porém devido ao tratamento inadequado ou descontínuo, novas linhagens multi-droga resistentes surgiram. Na era pré-antibiótico, a vitamina D era usada como forma de tratamento para a TB. Estudos mostram que esta é capaz de potencializar a produção de peptídeos antimicrobianos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos e síntese de mediadores inflamatórios durante a infecção experimental *in vivo* e *in vitro* por *M. bovis* BCG. Para tal, foi realizada a pleurisia induzida por BCG em camundongos machos C57BL/6 tratados ou não com 2,5UI da forma ativa da vitamina D (1,25(OH)₂D₃). Paralelamente, realizamos a infecção *in vitro* de macrófagos murinos, tratados ou não com vitamina D. Nossos resultados demonstraram que a vitamina D inibe a migração de neutrófilos nos animais infectados, bem como inibe a formação de corpúsculos lipídicos e síntese de PGE₂, tanto na infecção *in vivo*, quanto *in vitro*. Além disso, a vitamina D inibe parcialmente a expressão de PPAR-γ nos macrófagos infectados e potencializa a síntese de TNF-α. Esses dados sugerem um papel protetivo da vitamina D durante a infecção por *M. bovis* BCG, uma vez que parece potencializar uma resposta mais pró-inflamatória nos macrófagos.

Palavras-chave: Tuberculose. Corpúsculos lipídicos. Vitamina D.

ABSTRACT

Tuberculosis is the leading cause of death from a single infectious agent in the world, responsible for 10M new cases annually. It is a disease caused by mycobacteria from the *Mycobacterium tuberculosis* complex, characterized by the infection of innate immune cells in the lung. Macrophages are the main cells involved in resolution of infection, through cell recruitment and synthesis of cytokines, reactive oxygen and nitrogen species, antimicrobial peptides and lipid mediators, such as prostaglandin E₂. The pathogen is able to subvert the cell's machinery to its advantage, leading to inhibition of antimicrobial responses and favoring an adipogenic and anti-inflammatory environment that allows its survival within the cell. TB treatment is done with a 4 antibiotic regimen, but due to inadequate or discontinued treatment, drugresistent lineages have risen. In the pre-antibiotic era, vitamin D was used to treat TB. Studies have shown that it was able to potentiate antimicrobial peptide production. Thus, the aim of this work is to evaluate the effect of vitamin D on lipid body formation and lipid mediator synthesis during experimental *M. bovis* BCG infection *in vivo* and *in vitro*. For that, C57/BL6 mice were intrapleurally injected with BCG and treated or not with 2.5IU vitamin D. Also, murine macrophages were infected *in vitro*, treated or no with 1, 10 or 100nM of vitamin D. Our results demonstrate that vitamin D is inhibits neutrophil migration in infected mice, as well as lipid body formation and PGE₂ synthesis, both *in vivo* and *in vitro*. Also, vitamin D was able to partially inhibit PPAR- γ expression in infected macrophages and potentiated TNF- α production. These data suggest a protective role for vitamin D during *M. bovis* BCG infection, as it seems to potentiate a pro-inflammatory response.

Keywords: Tuberculosis. Lipid bodies. Vitamin D

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata de transmissão da tuberculose. Adaptado de: Churchyard et al., 2017

Figura 2: Células envolvidas na resposta imune inata contra *M. tb*. Adaptado de: Lerner et al., 2015.

Figura 3: Modelo ilustrativo da formação e função dos granulomas de TB. Adaptado de: Lugo-Villarino et al., 2013.

Figura 4: Composição do corpúsculo lipídico. Adaptado de: Melo e Dvorak, 2012.

Figura 5: Biogênese de corpúsculos lipídicos. Adaptado de: Walther et al., 2017.

Figura 6: Metabolismo do ácido araquidônico. Retirado de: Martínez-Colón et al, 2018.

Figura 7: Visão geral do metabolismo da vitamina D. Adaptado de: Jeon e Shin, 2018.

Figura 8: Delineamento experimental do trabalho.

Figura 9: Migração de células 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

Figura 10: Morfologia das células do lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

Figura 11: Quantificação das células apoptóticas no lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

Figura 12: Morfologia das células apoptóticas no lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

Figura 13: Formação de corpúsculos lipídicos nas células pleurais 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

Figura 14: Dosagem de TNF- α e IL-10 no lavado pleural.

Figura 15: Morfologia dos macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

Figura 16: Quantificação dos corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

Figura 17: Quantificação da produção de PGE₂ por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

Figura 18: Expressão de PPAR- γ em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

Figura 19: Dosagem de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e tratados *in vitro*.

LISTA DE ABREVIações

AA – Ácido aracdônico

ADRP – Proteína relacionado à diferenciação do adipócito (do inglês, Adipose differentiation-related protein)

AIDS – Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida

ATGL – lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL)

ATG5 – proteína de autofagia 5 (do inglês, autophagy protein 5)

BCG – Bacilo de Calmette-Guérin

CL – Corpúsculo lipídico

COX - Ciclooxygenase

DC – Célula dendrítica (do inglês, dendritic cell)

DGAT2 - Diacilglicerol aciltransferase 2

DNA – Ácido desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimático (do inglês, Enzyme linked Immunosorbent Assay)

EPM – Erro padrão da média

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HSL – lipase hormônio-sensível

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, Inducible nitric oxide synthase)

kDa - quilodalton

LOX – Lipoxigenase

LTB – tuberculose latente (do inglês, *latent tuberculosis*)

LXA4 – Lipoxina A4

MAITs – Células T invariantes associadas à mucosa (do inglês, mucosal associated invariant T)

MAPK – Proteíno-quinases ativadas por mitógenos (do inglês, mitogen activated protein kinases)

M. tb – *Mycobacterium tuberculosis*

NF-κB – Fator nuclear kappa B (do inglês, nuclear factor kappa B)

NK – Célula matadora natural (do inglês, natural killer)

NO – Óxido nítrico (do inglês, nitric oxide)

IGRA - Ensaio de liberação de interferon-gama (do inglês, IFN- γ release assay)

i.pl. – Intrapleural

PAMPs – Padrões molecular associados ao patógeno

PBS – Tampão Fosfato-Salina (do inglês, phosphate buffered saline)

PCR – Reação em cadeia da enzima polimerase (do inglês, Polymerase chain reaction)

PGE₂– Prostaglandina E₂

p.i. – Pós infecção

PLIN – Perilipina

PPD – Derivado Protéico Purificado (do inglês, tuberculin-protein purified derivative)

PRR – Receptores de reconhecimento de padrão molecular (do inglês, pattern recognition receptor)

RE – Retículo endoplasmático

RNS – Espécies reativas de nitrogênio (do inglês, reactive nitrogen species)

ROS – Espécies reativas de oxigênio (do inglês, reactive oxygen species)

RXR – Receptor do ácido retinoico

SE – ésteres de esterol

TAG – triacilglicerol

TB – tuberculose

TDO – Tratamento diretamente observado

TGF- β - Fator transformador de crescimento- β (do inglês, transforming growth factor beta)

TLR – Receptor do tipo toll (do inglês, toll-like receptor)

TNF- α – Fator de necrose tumoral- α (do inglês, tumor necrosis factor-alpha)

TRM-TB - Teste Rápido Molecular para Tuberculose

VD – Vitamina D

VDBP – Proteína ligante de vitamina D (do inglês, vitamin D binding protein)

WT – Animal do tipo selvagem (do inglês, wild type)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
1.1.	Tuberculose.....	11
1.2.	Resposta imunológica na tuberculose.....	14
1.2.1.	Corpúsculos lipídicos.....	18
1.2.2.	Mediadores lipídicos.....	22
1.3.	Vitamina D.....	24
1.3.1.	Vitamina D e tuberculose.....	25
2.	OBJETIVOS.....	28
2.1.	Objetivo geral.....	28
2.2.	Objetivos específicos.....	28
3.	METODOLOGIA.....	29
3.1.	Delineamento experimental.....	29
3.2.	Animais.....	30
3.3.	Obtenção de Mycobacterium bovis BCG.....	30
3.4.	Experimento <i>in vivo</i> – Pleurisia induzida por BCG.....	30
3.5.	Experimento <i>in vitro</i> - infecção de macrófagos peritoneais.....	30
3.6.	Contagem diferencial.....	31
3.7.	Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos.....	31
3.8.	Quantificação de células apoptóticas.....	32
3.9.	Dosagem de citocinas.....	32
3.10.	Dosagem de prostaglandina E ₂	32
3.11.	Western Blot.....	32
3.12.	Análise estatística.....	33
4.	RESULTADOS.....	34
4.1.	Experimento <i>in vivo</i> – Pleurisia induzida por BCG.....	34
4.1.1.	Efeito do tratamento com vitamina D na migração de células induzida pela infecção por BCG.....	34
4.1.2.	Efeito do tratamento com vitamina D na indução da apoptose durante pleurisia induzida por BCG.....	37
4.1.3.	Efeito do tratamento com vitamina D na indução de corpúsculos lipídicos durante pleurisia induzida por BCG.....	38

4.1.4. Efeito do tratamento com a vitamina D na síntese de citocinas durante pleurisia induzida por BCG.....	39
4.2. Experimentos <i>in vitro</i>	40
4.2.1. Efeito do tratamento com a vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados <i>in vitro por BCG</i>	40
4.2.2. Efeito do tratamento com a vitamina D na produção de prostaglandina E ₂ em macrófagos infectados <i>in vitro por BCG</i>	42
4.2.3. Efeito do tratamento com a vitamina D na expressão de PPAR-g em macrófagos infectados <i>in vitro por BCG</i>	43
4.2.4. Efeito do tratamento com a vitamina D na síntese de citocinas em macrófagos infectados <i>in vitro por BCG</i>	44
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	49
REFERÊNCIAS.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tuberculose

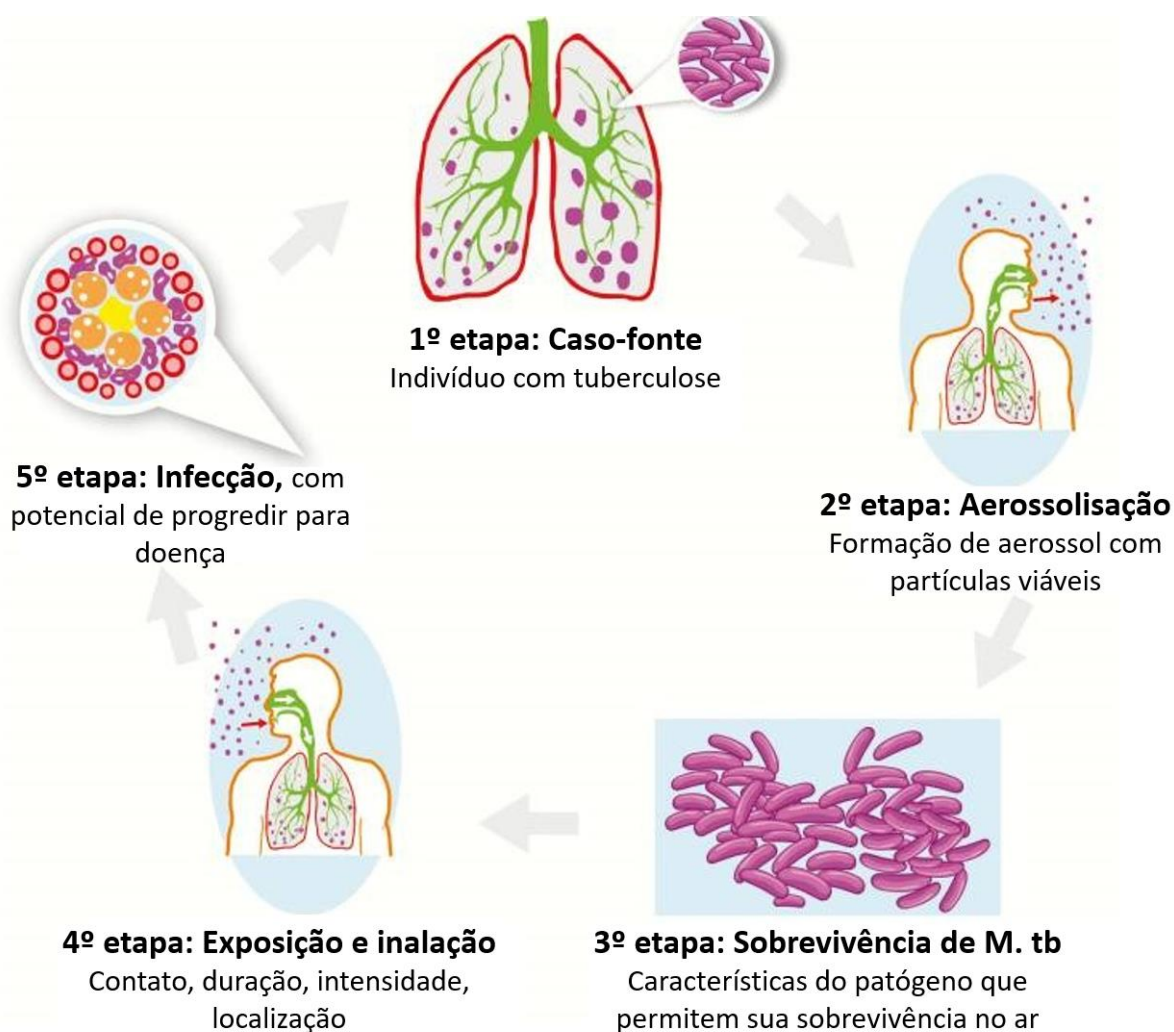
Atualmente, a tuberculose (TB) é a principal causa de morte por agente infeccioso no mundo, superando o vírus da imunodeficiência humana (HIV), causador da AIDS (OMS, 2018). O relatório mais recente da Organização Mundial da Saúde revela que, anualmente, tem-se 10 milhões de novos casos de TB e 1,2 milhões de pessoas morrem por complicações da doença no mundo todo. De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, referente ao ano de 2017, no Brasil, foram diagnosticados 76 mil novos casos e registrados 4.534 óbitos pela doença (BRASIL, 2019).

A tuberculose é causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium tuberculosis*, pertencente ao complexo homônimo do qual fazem parte *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* (mais comum na África subsaariana), *Mycobacterium microti* (causa TB em ratazanas) e *Mycobacterium canettii* (SAKAMOTO, 2012). Foram descritas primeiramente por Robert Koch em 1882 e por isso são conhecidas também como bacilos de Koch. São bacilos retos com 1 a 10µm de comprimento e 0,2-0,6µm de espessura, fracamente Gram positivas e álcool-ácido resistentes (FERRI et al., 2014; SAKAMOTO, 2012)

A transmissão da doença ocorre pela via aérea, a partir da inalação de aerossóis propagados durante a fala, espirro ou tosse de uma pessoa com tuberculose ativa, que contém bacilos infectantes (Figura 1) (O’GARRA et al., 2013; CRUMP et al., 2017). O risco de transmissão da TB perdura enquanto o paciente eliminar bacilos no escarro. A exposição ao agente etiológico não necessariamente leva ao desenvolvimento da forma ativa/sintomática da doença. Quando uma pessoa saudável é exposta ao bacilo da TB, tem 30% de chance de ser infectada, dependendo do grau de exposição (proximidade, condições do ambiente e tempo de convivência), da infectividade do caso índice (quantidade de bacilos eliminados) e de fatores imunológicos individuais. As pessoas infectadas, em geral, permanecem saudáveis por anos, com imunidade parcial ao bacilo, caracterizando o caso de infecção latente (LTB) (GETAHUN et al., 2015). A OMS estima que um quarto da população mundial tenha LTB. Esses indivíduos não apresentam nenhum sintoma e não transmitem a doença, mas são reconhecidos por testes que detectam a imunidade contra o bacilo. O diagnóstico da forma latente é feito após a exclusão da possibilidade de TB ativa.

Entretanto, estima-se que 5-15% dos indivíduos com tuberculose latente irão desenvolver a forma ativa ao longo da vida, sendo esta porcentagem ainda maior entre imunocomprometidos (COMSTOCK, LIVESAY, WOOLPERT, 1974).

Figura 1– Cascata de transmissão da tuberculose.



Fonte: Churchyard et al., 2017.

A maioria dos casos de TB afetam os pulmões (cerca de 70%), porém a doença pode se desenvolver em outros órgãos (tuberculose extrapulmonar), dentre os quais destacam-se linfonodos, ossos e meninges (MILBURN, 2007). Os sintomas mais comuns são tosse persistente seca ou produtiva, febre, perda de peso e sudorese noturna; outros sintomas podem surgir dependendo do sítio de infecção (MILBURN, 2007; O'GARRA et al., 2013; OMS, 2018).

O diagnóstico da tuberculose ativa ainda é um desafio, apesar dos diversos sintomas. Sua apresentação clínica é inespecífica e pode ser confundida com outras doenças que acometem o pulmão, como pneumonia, câncer de pulmão e sarcoidose (STORLA; YIMER; BJUNE, 2008). No caso de suspeita de tuberculose em pacientes sintomáticos, este deve passar por exames laboratoriais para confirmação do diagnóstico. Dentre os mais utilizados estão: *i.* baciloscopia, método que visa identificar bacilos álcool-ácido resistentes em amostras do trato respiratório, com eficácia de 60% a 80% dos casos de TB pulmonar em adultos; *ii.* radiografia do tórax, que tem como objetivo buscar por padrões radiológicos sugestivos de atividade de doença, excluir outra doença pulmonar associada, avaliar a extensão do acometimento e a evolução radiológica durante o tratamento (CHANG et al., 2008).

Apesar de muito utilizados, pacientes com TB extrapulmonar e/ou abacilares não são contemplados por estes testes e, por isso, o diagnóstico de certeza bacteriológica só é obtido com a cultura da micobactéria (padrão ouro) e/ou testes moleculares (BRASIL, 2019). Dentre eles, destaca-se o Teste Rápido Molecular para Tuberculose (TRM-TB), que é um teste de amplificação de ácidos nucleicos utilizado para detecção de DNA dos bacilos do complexo *M. tuberculosis* e cepas resistentes à rifampicina pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (SHIN et al., 2008; DELOCCO, 2011). A sensibilidade do TRM-TB em amostras de escarro de adultos é de cerca de 90% sendo superior à da baciloscopia, porém devido ao seu alto custo, não está disponível em toda rede pública de saúde. A cultura da micobactéria, seguido por teste de sensibilidade aos antimicrobianos, é um método de elevada especificidade e sensibilidade no diagnóstico da TB. Nos casos pulmonares com baciloscopia negativa, a cultura do escarro pode aumentar em até 30% a eficiência do diagnóstico bacteriológico da doença.

A prova tuberculínica (PT) é utilizada para diagnóstico de LTB e pode também auxiliar o diagnóstico de tuberculose ativa em crianças. Consiste na inoculação intradérmica de um derivado protéico purificado do *M. tuberculosis* para medir a resposta imune celular a esses antígenos (LIGHTER; RIGAUD, 2009).

Confirmada a infecção pela micobactéria, é realizado o tratamento com antibióticos. Este consiste na combinação de quatro medicamentos: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Para que o tratamento seja feito corretamente, a OMS implementou o regime de tratamento diretamente observado (TDO), que inclui a observação da ingestão do medicamento pelo paciente por um profissional da

saúde. A adesão a este método garantiu a conclusão do tratamento pelos pacientes, incluindo aqueles de populações de alto risco, como moradores de rua (ZHANG et al., 2016; NWANA et al., 2019). Este tipo de precaução é necessária, pois o tratamento irregular pode resultar no desenvolvimento de tuberculose drogaresistente, que vem crescendo exponencialmente nos últimos anos (OMS, 2018).

A única forma de prevenção da doença é através da vacina com Bacilo Calmette Guérin (BCG), introduzida pela primeira vez em 1921 (CALMETTE, 1931; GREENWOOD, 1928). A vacina começou a ser desenvolvida em 1908 a partir de uma linhagem bovina de *M. tuberculosis*, cultivada em meio de cultura contendo bile, batata e glicerina. Após 231 subculturas nesse meio, 13 anos depois, o bacilo tornou-se não patogênico, mas indistinguível da linhagem virulenta quanto as outras características. Em 1921, portanto, a vacina foi testada e tornou-se a única forma de imunização contra a tuberculose (LUCA; MIHAESCU, 2013).

Desde então, a eficácia da vacina foi testada em inúmeras ocasiões e apresenta uma porcentagem de imunização de 60-80% contra formas graves de TB na infância e a proteção contra a forma pulmonar varia geograficamente, dependendo da subcepa utilizada, política de vacinação, número de doses, etc (ZWERLING et al., 2011). Com isso, a busca por novos alvos terapêuticos e adjuvantes torna-se cada vez mais urgente.

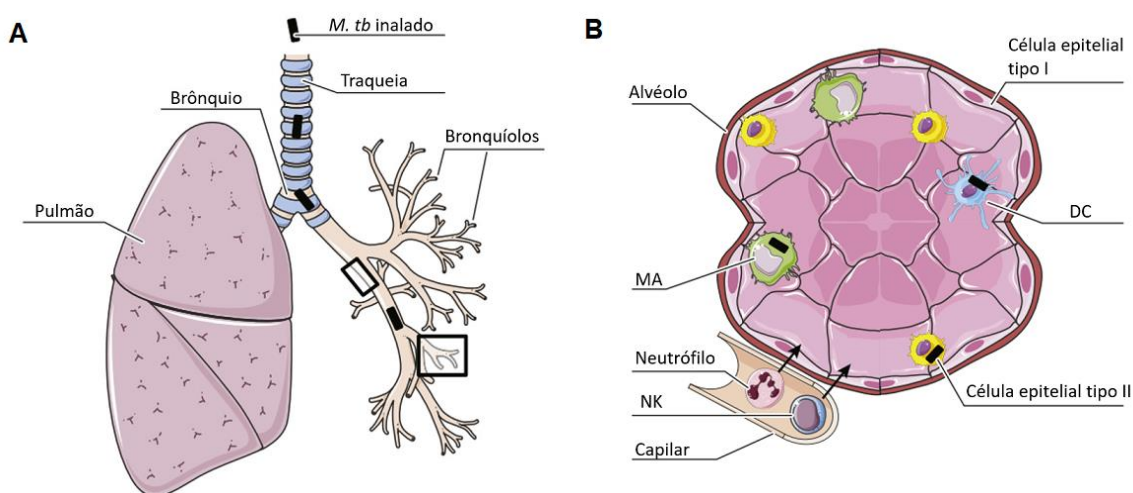
A vacina BCG também é utilizada como modelo experimental da infecção por *M. tuberculosis*, pois a resposta ao bacilo não virulento leva ao aumento da carga bacilar no pulmão, seguida da eliminação do patógeno, similar ao que ocorre na infecção primária por *M.tb* (COSTELLO; LD; IZUMI, 1970). Em camundongos, a alta carga bacilar persiste associada à inflamação celular robusta, o que permite que sejam feitos estudos relacionados ao desenvolvimento da resposta imune utilizando este modelo (FULTON et al., 2000).

1.2. Resposta imunológica na tuberculose

O *Mycobacterium tuberculosis* é um patógeno intracelular bem sucedido por ser capaz de manipular a resposta imunológica do hospedeiro ao seu favor, permitindo sua sobrevivência e replicação dentro das células (LIU; LIU; GE, 2017; PHILIPS; ERNST, 2012). O estabelecimento de uma infecção por *M. tuberculosis* depende, principalmente, das interações do patógeno com as células do sistema imune inato, como macrófagos, células dendríticas (DCs), natural killers (NK) e neutrófilos (SIA;

GEORGIEVA; RENGARAJAN, 2015), apesar de outros mecanismos de defesa existirem antes deste encontro. Ao ser inalada, a micobactéria passa pela laringe, traqueia, brônquios e bronquíolos que são revestidos pela mucosa respiratória (Figura 2A). A mucosa é formada por células epiteliais, que impedem a penetração no tecido, e pela lâmina própria, que contém camadas de tecidos intercaladas por células imunes, como linfócitos e macrófagos (LAI et al., 2015). As células epiteliais reconhecem os padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) presente na superfície do bacilo e iniciam a resposta imunológica, recrutando células T invariáveis associadas à mucosa (MAITs) (GOLD; NAPIER, 2015).

Figura 2 – Células envolvidas na resposta imune inata contra *M. tb*.



Fonte: Lerner et al., 2015.

(A) Após a inalação, a micobactéria (bastão preto) desce pela traqueia, brônquios e bronquíolos até os alvéolos. **(B)** Os alvéolos são formados por células epiteliais dos tipos I e II. Macrófagos alveolares (MA) e células dendríticas (DCs) são células de defesa residentes dos alvéolos.

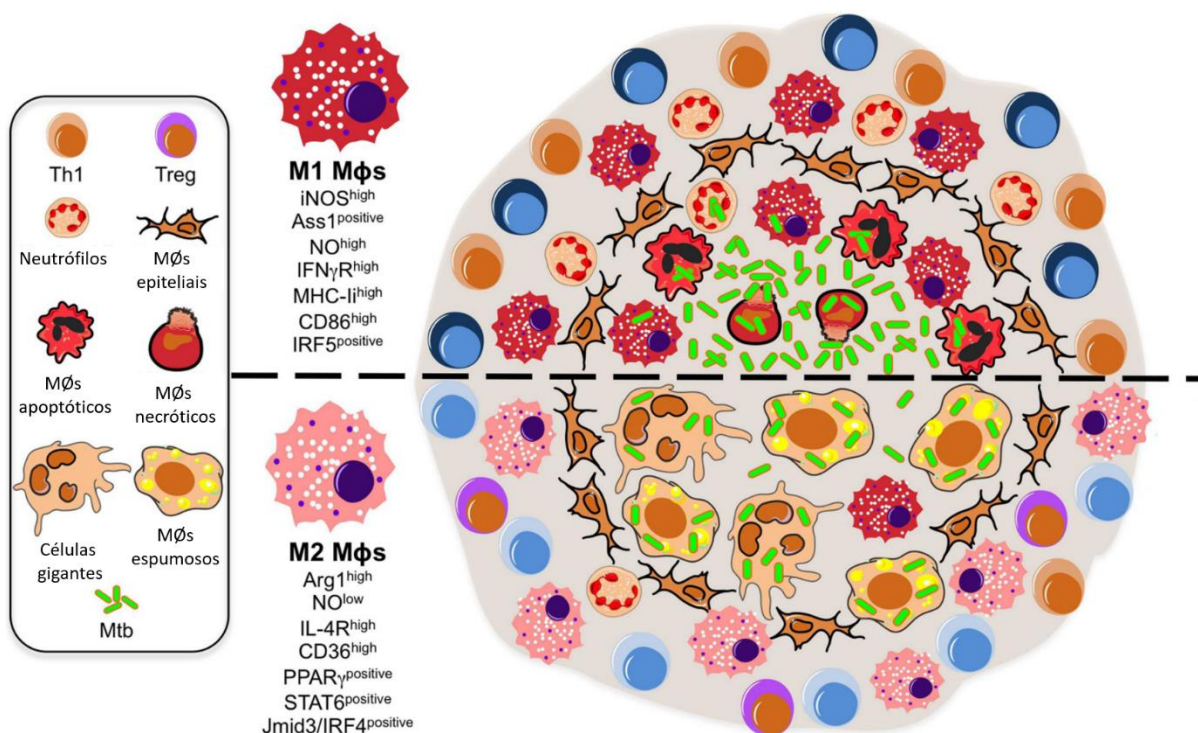
As micobactérias que conseguem se esquivar das defesas das vias respiratórias superiores, chegam até os alvéolos, onde são fagocitadas por macrófagos alveolares (MA; Figura 2B). O reconhecimento do *M.tb* por macrófagos se dá pela interação dos PAMPs bacterianos, como glicolipídeos, lipoproteínas e carboidratos, com receptores de reconhecimento de padrão molecular (PRRs) presente na superfície dessas células (BRIGHTBILL et al., 1999). Os receptores do tipo toll (TLRs) fazem parte de uma família de receptores transmembrana e os TLR-1,2,4,6 e 9 estão envolvidos com reconhecimento de *M. tb* (KILLICK et al., 2013). A

ativação desses receptores leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras que participam da ativação das vias de sinalização de NF- κ B, MAPK e PI3K/AKT, as quais culminam na síntese de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina 6 (IL-6), IL-1 β , quimiocinas e/ou IFN tipo I, necessárias na resposta antimicrobiana, no recrutamento de outras células da imunidade inata e ativação da resposta adaptativa (SARAAV; SINGH; SHARMA, 2014). Outra família de receptores que participa da resposta contra micobactérias são receptores de lectina tipo C (CLRs), dos quais destaca-se o receptor de manose (MR), que reconhece lipoarabinomananas (LAM) da superfície do patógeno e leva à expressão do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma (PPAR)- γ , envolvido no metabolismo lipídico e adipogênese (ALMEIDA et al., 2009; GUIRADO et al., 2018).

Os macrófagos são capazes de eliminar patógenos intracelulares através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), citocinas pró-inflamatórias, acidificação do fagossomo, autofagia, apoptose e recrutamento de outras células da imunidade inata e da adaptativa (HMAMA et al., 2015). Após a fagocitose, o fagossomo no qual o patógeno se encontra é fundido com lisossomos, formando o fagolisossomo, que se acidifica devido à presença de hidrolases lisossomais e peptídeos antimicrobianos, como catelicidinas e defensinas, levando à morte do patógeno (BOTELLA et al., 2011; PLÜDDEMANN; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2011). Oxido nítrico sintase induzível (iNOS) expressa após a ativação dos macrófagos também auxilia na potencialização da resposta (PLÜDDEMANN; MUKHOPADHYAY; GORDON, 2011). Apesar deste arsenal de respostas microbicidas, estudos mostram que 70% micobactérias são capazes de sobreviver dentro dos macrófagos, através da (i) inibição da acidificação do fagossoma (ii) bloqueio da fusão do fagossomo com o lisossomo, evitando degradação proteolítica e o início da resposta adaptativa (VAN DER WEL et al., 2007; HMAMA et al., 2015), (iii) induzindo macrófagos a um perfil anti-inflamatório (M2) em detrimento de um pró-inflamatório (M1) (BENOIT; DESNUES; MEGE, 2008; LABONTE; TOSELLO-TRAMPONT; HAHN, 2014), (iv) modulando a composição do granuloma (Figura 3) (LUGO-VILLARINO et al., 2012) e (v) induzindo a síntese de corpúsculos lipídicos, organelas armazenadoras de lipídios e proteínas que atuam na sinalização celular, tráfego de lipídios e servem como fonte de carbono para o patógeno (BARISCH; SOLDATI, 2017; SILVA MIRANDA et al., 2012).

Macrófagos infectados secretam citocinas para recrutar diferentes populações celulares, incluindo mais macrófagos, para o sítio de infecção. Dentre elas, as DCs, que são importantes pois apresentam antígenos para células T nos linfonodos, onde uma resposta adaptativa será iniciada. Esses eventos de sinalização levam à formação de um granuloma, um marcador histológico típico da tuberculose (RUSSELL et al., 2010; SILVA MIRANDA et al., 2012)(RUSSELL et al., 2010). Os granulomas são compostos por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células T e B, fibroblastos e células epiteliais (RAMAKRISHNAN, 2012), sendo caracterizados, principalmente, pelas diversas populações de macrófagos em seu interior. Destas, destacam-se os macrófagos espumosos, que perderam a habilidade bactericida e fagocítica, e acumulam lipídios no interior de corpúsculos lipídicos.

Figura 3 – Modelo ilustrativo da formação e função dos granulomas de TB.



Fonte: Lugo-Villarino et al., 2013.

Apesar do papel central dos macrófagos durante a infecção por micobactérias, os neutrófilos são as células recrutadas em maior quantidade para os pulmões. Neutrófilos são capazes de fagocitar patógenos e produzir mediadores, que iniciam a resposta imune contra a micobactéria. A capacidade de neutrófilos de induzir respostas protetoras ou patogênicas depende de sua quantidade e atividade no sítio

de infecção (FULTON et al., 2000). Um papel protetor dessas células foi proposto devido ao fato de que a neutropenia aumenta o crescimento de *M. avium* (APPELBERG et al., 1995), a depleção completa de neutrófilos leva à redução da capacidade de contenção do crescimento bacteriano (MARTINEAU et al., 2007) e depleção induzida por anticorpo leva ao aumento de *M.tb* nos pulmões (PEDROSA et al., 2000). Em contraste, foi demonstrado que, em comparação aos macrófagos, os neutrófilos tem pouca capacidade de controlar o crescimento microbiano, indicando que a prevalência de neutrófilos durante a tuberculose pode contribuir para a patogênese da doença (ERUSLANOV et al., 2005).

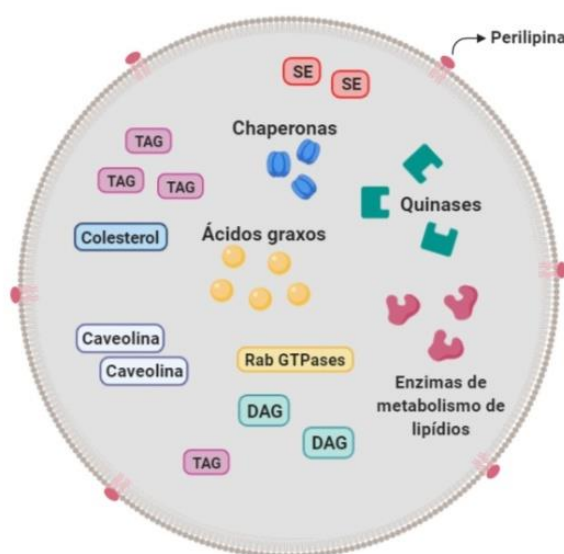
Foi observado que em animais suscetíveis, neutrófilos migram para o sítio de infecção, engolfam os patógenos e sofrem apoptose (ALEMÁN et al., 2002), através de mecanismos dependentes de TLR2 e p38 MAPK (ALEMÁN et al., 2004, 2005). Diversos trabalhos mostram que apoptose de neutrófilos, seguido do reconhecimento e retirada dos corpos apoptóticos, está associada à atenuação da resposta inflamatória e impede dano tecidual (FADOK et al., 1998; HUYNH; FADOK; HENSON, 2002; KEANE; REMOLD; KORNFELD, 2000; MOLLOY; LAOCHUMROONVORAPONG; KAPLAN, 1994; SLY et al., 2003). Neutrófilos infectados, quando em processo de apoptose, podem ser rapidamente ingeridos por células vizinhas não-infectadas, através de um processo chamado eferocitose e, uma vez que o conteúdo celular encontra-se encerrado nos corpos apoptótico, a micobactéria não é capaz de infectar a célula fagocítica (MARTIN et al., 2012). Entretanto, outros estudos mostraram que fagocitose de neutrófilos apoptóticos por macrófagos sinergiza com a infecção por BCG induzindo formação de corpúsculos lipídicos e produção de mediadores anti-inflamatórios, como PGE₂ e TGF-β, sugerindo que a fagocitose desses neutrófilos pode favorecer a persistência bacteriana ao promover um ambiente anti-inflamatório, com desativação da resposta de macrófagos (D'ÁVILA et al., 2008).

1.2.1. Corpúsculos lipídicos

Corpúsculos lipídicos (CLs), ou gotas lipídicas, são organelas ricas em lipídios encontradas no citoplasma da maioria das células eucarióticas. Até recentemente, CLs eram considerados como armazenadores de lipídios, mas sabe-se hoje que são organelas dinâmicas, envolvidas em diversas funções, como metabolismo de lipídios, sinalização celular e inflamação (BOZZA; MELO; BANDEIRA-MELO, 2007; FARESE;

WALTHER, 2009). São organelas esféricas com tamanho variável entre alguns nanômetros a centenas de micrômetros. Dependendo do tecido em que se origina, possui proporções variáveis de lipídios neutros, como ésteres de esteroide (SE), triacilglicerol (TAG) e colesterol circundados por uma monocamada de fosfolipídios com proteínas associadas (TAUCHI-SATO et al., 2002). O conteúdo proteico dos CLs foi identificado por análise proteômica e é classificado em três grupos: *i.* proteínas estruturais (família das perilipinas; KIMMEL et al, 2010), que inclui PLIN1, PLIN2 (ADRP) e PLIN3; *ii.* Proteínas de tráfego de membrana, incluindo GTPases, proteínas da família Rab e chaperonas; *iii.* Enzimas de metabolismo de lipídios, como DGAT2, ATGL e HSL (BRASAEMLE et al, 2004; KORY et al, 2016), e assim como os lipídios, a composição proteica varia de acordo com o tipo celular e o estado fisiológico (MELO e DVORAK, 2012).

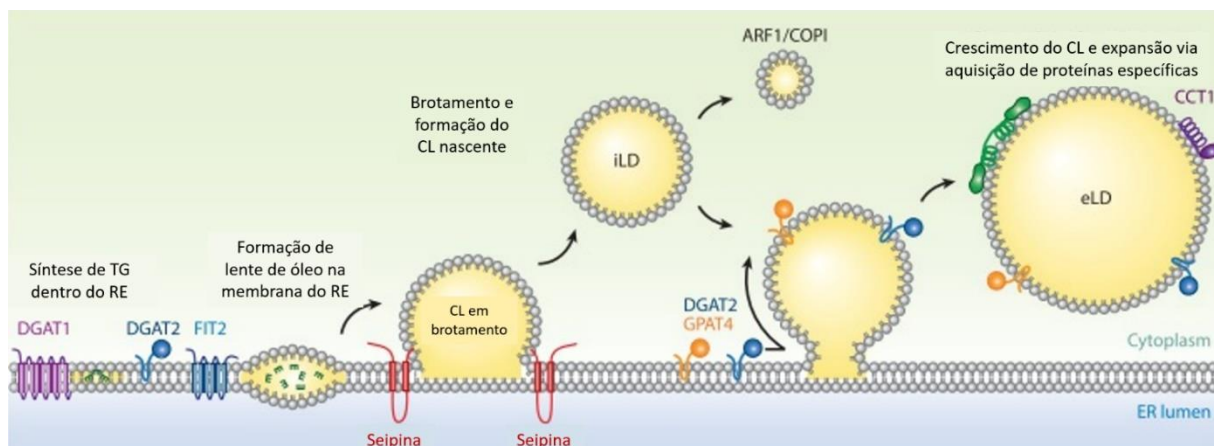
Figura 4 – Composição do corpúsculo lipídico.



Fonte: de Melo e Dvorak, 2012.

Apesar de diversos avanços quanto ao entendimento da biogênese dos CLs, muitos dos mecanismos ainda não foram completamente esclarecidos. O modelo atualmente aceito sugere a biogênese a partir do acúmulo de lipídios entre as membranas externa e interna do retículo endoplasmático (RE), num processo similar ao brotamento (MURPHY, 2001; WALTHER; CHUNG; FARESE JR, 2017). Este modelo tem boa aceitação pelo fato de o RE conter as principais enzimas responsáveis pela síntese de lipídios neutros.

Figura 5 – Biogênese de corpúsculos lipídicos.



Fonte: Walther et al., 2017.

Além dos lipídios e proteínas, é conhecido que diferentes fatores de transcrição estão envolvidos na formação dos corpúsculos lipídicos (ALMEIDA et al., 2009). Os PPARs (peroxisome proliferator-activated receptors) são fatores de transcrição da família dos receptores nucleares, que inclui 3 isoformas: PPAR- α (também chamado de NR1C1), PPAR- β/δ (NR1C2), and PPAR- γ (NR1C3) (FANALE; AMODEO; CARUSO, 2017). Apesar de diversas similaridades, cada isoforma apresenta funções distintas, devido a propriedades bioquímicas diferentes, distribuição variada nos tecidos e indução de diferentes respostas celulares (FANALE; AMODEO; CARUSO, 2017). Os PPARs regulam diretamente a transcrição de genes relacionados ao metabolismo de lipídios e glicose (ALMEIDA et al., 2009; GENOLET et al., 2005; MANDARD et al., 2007), adipogênese, diferenciação e migração celular (NADRA et al., 2006; TAN et al., 2007), estoque intracelular e oxidação de ácidos graxos e inflamação (ALMEIDA et al., 2009; BENSINGER; TONTONNOZ, 2008). A ativação de genes específicos é feita através da formação de heterodímeros com o receptor retinoide X (RXR), que se ligam à elementos responsivos no DNA de genes alvo (CHAWLA et al., 2001; GEARING et al., 1993; KELLER et al., 1993).

De especial relevância para este estudo, o PPAR- γ tem papel fundamental na diferenciação de adipócitos, mas atua também na resposta inflamatória, sendo expresso em diversas células do sistema imunológico, como monócitos/macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B e plaquetas (HEMING et al., 2018). Já foi demonstrado que este fator de transcrição é capaz de regular negativamente a expressão de genes inflamatórios, incluindo genes de citocinas pró-inflamatórias

(JIANG; TING; SEED, 1998) e da enzima óxido nítrico sintase (iNOS), através da repressão transcricional de STAT6, AP-1 e NF- κ B (ALMEIDA et al., 2012; GLASS; SAIJO, 2010), além de inibir a ativação macrófágica (RICOTE et al., 1998). Estudos realizados pelo nosso e outros grupos demonstraram que infecção micobacteriana aumenta significativamente a expressão de PPAR- γ em macrófagos humanos e murinos (ALMEIDA et al., 2009; RAJARAM et al., 2010). O aumento da expressão de PPAR- γ durante a infecção de macrófagos com *Mycobacterium bovis* BCG e *M. tuberculosis* pode ser observada 2h p.i., com pico máximo 24h após a infecção, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Interessantemente, a infecção com a micobactéria não-patogênica *M. smegmatis* não induz a maior expressão de PPAR- γ , sugerindo que este fator de transcrição pode estar relacionado à patogênese bacteriana (ALMEIDA et al., 2012). Durante a infecção, PPAR- γ é capaz de regular positivamente a expressão da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e, conseqüentemente, aumentar a síntese de prostaglandina E₂, um mediador inflamatório que inibe a resposta Th1 e atividades microbidas (D'AVILA et al., 2006; MORTENSEN et al., 2019). Devido a sua íntima relação com o metabolismo lipídico, o PPAR- γ é altamente expresso em células ricas em lipídios, como os macrófagos espumosos encontrados na infecção micobacteriana. Experimentos com o agonista de PPAR- γ , BRL49653, mostraram o aumento da formação de CLs e produção de PGE₂ durante infecção experimental por BCG. Corroborando estes resultados, experimentos com o antagonista do PPAR- γ , GW9662, inibiu a formação de CLs e síntese de PGE₂ induzida por BCG, indicando que a sinalização via PPAR é necessária para biogênese de CLs e conseqüente produção de prostanoides (ALMEIDA et al., 2009). Ainda, o trabalho de Almeida e colaboradores (2009) demonstrou que a ativação da via de sinalização de PPAR- γ durante infecção por BCG ou manLAM é dependente do receptor de reconhecimento de padrão (PRR) toll-like receptor-2 (TLR-2).

CLs se formam em resposta ao excesso de lipídios e diversos tipos de estresse, como reações inflamatórias. O aumento do acúmulo citoplasmático dessas organelas foi observado em células do sistema imunológico, tanto no contexto clínico quanto experimental de doenças inflamatórias, incluindo em macrófagos em lesões ateroscleróticas (PAUL et al., 2008; SCHMITZ; GRANDL, 2008), leucócitos de pacientes com artrite (BOZZA et al., 1996), lavado broncoalveolar de pacientes com síndrome respiratória aguda grave (TRIGGIANI et al., 1995), em eosinófilos durante resposta alérgica (VIEIRA-DE-ABREU et al., 2011), em leucócitos peritoneais de

pacientes com sepse (PACHECO et al., 2007), e no pulmão pele e granuloma de pacientes com tuberculose e lepra (D'AVILA et al., 2006; LUGO-VILLARINO et al., 2012; MATTOS et al., 2011) e infecções por parasitas (DE ALMEIDA et al., 2018; TOLEDO; D'AVILA; MELO, 2016). A presença dessas organelas no contexto inflamatório é bem caracterizada e pode influenciar o desfecho da inflamação, devido ao fato de CLs serem sítios de formação de mediadores lipídicos inflamatórios (ACCIOLY et al., 2008; BOZZA et al., 1996).

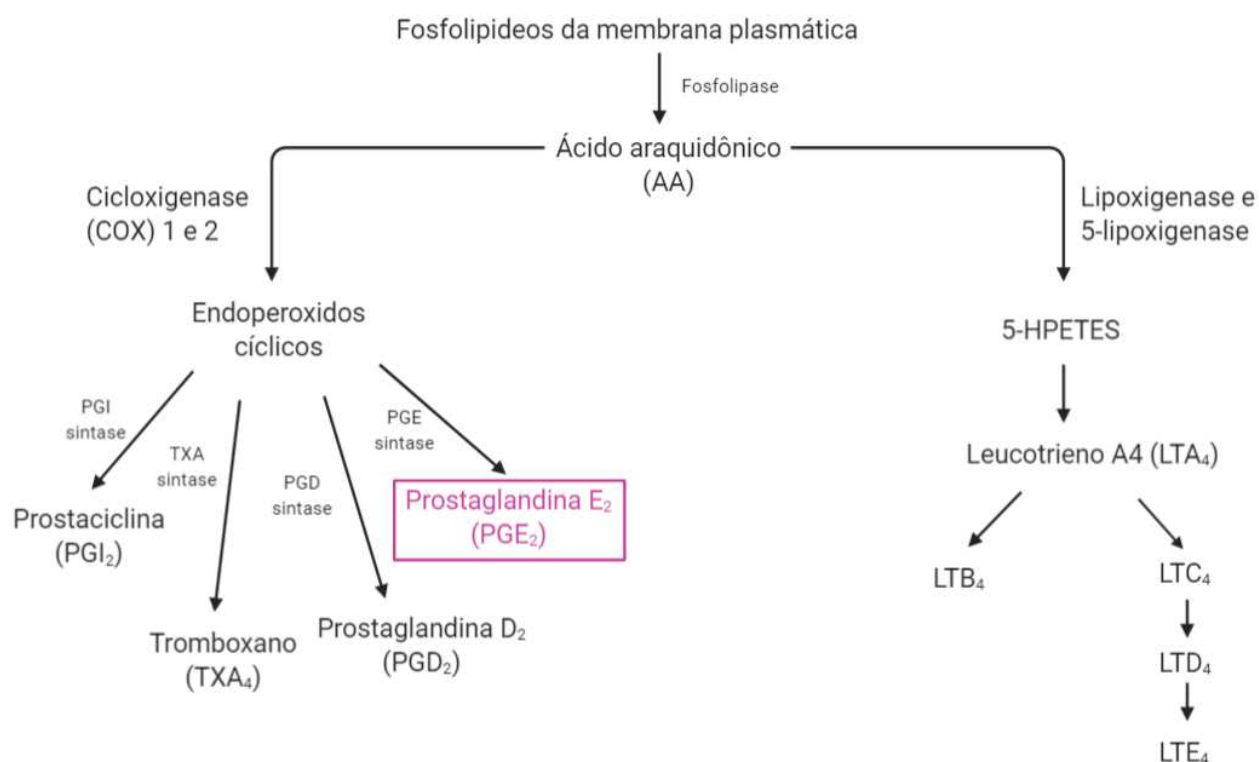
1.2.2. Mediadores lipídicos

Os eicosanoides são mediadores lipídicos que fazem parte de uma família de lipídios sinalizadores derivados do ácido araquidônico (AA) e regulam diversas etapas da patogênese de *M.tb*, incluindo a produção de citocinas, mecanismo de morte macrofágica e replicação bacteriana (CHEN et al., 2008). O metabolismo de AA em eicosanoides envolve três enzimas: (i) ciclooxigenase (COX) 1 e 2, que leva a produção de prostaglandinas e tromboxanos, (ii) lipoxigenase (e.g. 5-LOX), que catalisa a formação de leucotrienos e lipoxinas, e (iii) citocromo P450, que atua nos sistemas cardiovascular e renal (NEEDLEMAN et al., 1986). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal mediador lipídico envolvido na infecção por micobactérias e sua produção influencia tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa (MARTÍNEZ-COLÓN; MOORE, 2018).

Já foi demonstrado que a PGE₂ é capaz de modular muitos processos biológicos, incluindo proliferação celular, apoptose, angiogênese, inflamação e vigilância imunológica. Isso se deve ao fato de a PGE₂ agir de forma autócrina e parácrina, através dos receptores EP1, EP2, EP3 e EP 4 (DENNIS; NORRIS, 2015; O'CALLAGHAN; HOUSTON, 2015; REGAN, 2003; ROGERS et al., 2014; SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007). Os receptores EP diferenciam-se quanto a via de sinalização intracelular, afinidade com PGE₂ e localização tecidual e celular. Os receptores EP2 e 4 medeiam os efeitos imunomodulatórios da PGE na imunidade inata e adaptativa. Mediante ligação com PGE₂, o receptor EP4 é capaz de ativar diretamente a sinalização via PI3K/ERK, que resulta na regulação de genes controlados pelos fatores de transcrição NF-κB e AP-1 (REGAN, 2003) resultando no aumento da síntese de IL-10 e redução de TNF-α, indicando uma função anti-inflamatória (AKAOGI et al., 2004; SHINOMIYA et al., 2001).

Diversos estudos relacionados a PGE_2 e macrófagos, sugerem que este prostanóide tem capacidade de inibir ou reduzir a resposta inata, através do (i) bloqueio da sinalização via TLR, (ii) da modulação da síntese de citocina (ARONOFF; CANETTI; PETERS-GOLDEN, 2014; KUNKEL et al., 1986) e peptídeos antimicrobianos (WAN et al., 2018), (iii) da indução de necrose (CHEN et al., 2008), (iv) redução da produção de NETs por neutrófilos (SHISHIKURA et al., 2016). Interessantemente, o papel da PGE_2 durante a infecção por *M.tb* parece ser dependente do tipo celular e da virulência do patógeno, uma vez que inibição da COX-2 reduz a função efetora de células Th1 durante infecção por *M.tb in vitro* (TONBY et al., 2016). O uso de anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) foi testado como uma alternativa ao tratamento com antibióticos atualmente utilizados, por serem inibidores da enzima COX-1 e 2. Porém os resultados são conflitantes, uma vez que, apesar de reduzirem os efeitos pró-inflamatórios dos mediadores derivados das enzimas COX, interferem também nas ações homeostáticas desses mediadores (PERES-BUZALAF et al., 2011).

Figura 6 – Metabolismo do ácido araquidônico



Fonte: Martínez-Colón et al, 2018.

1.3. Vitamina D

O termo vitamina D (VD) refere-se a um hormônio esteroide, obtido através da alimentação (20%) e pela exposição da pele à luz solar (80%). Sua síntese se inicia através da formação de vitamina D₃ (colecalfiferol) a partir do 7-hidrocolesterol da pele e da ingestão de vitamina D₂ (ergocalciferol) na dieta (Figura 4).

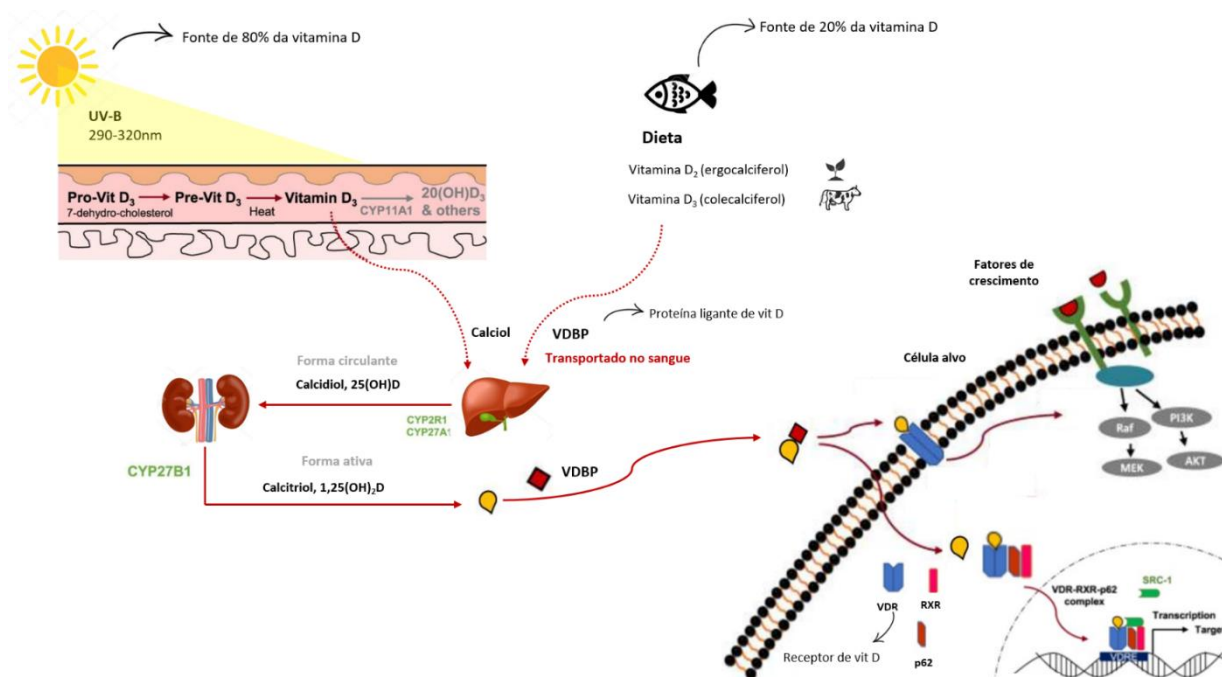
A VD é transportada na corrente sanguínea pela proteína ligante de vitamina D (VDBP) até o fígado, onde passa por hidroxilação, mediada pela enzima CYP27A1, produzindo 25-hidroxi-vitamina D (calcidiol). O calcidiol circulante é o marcador usado para detectar os níveis de VD no corpo humano, antes de ser metabolizado nos rins pela 1 α -hidroxilase (CYP27B1), produzindo o metabólito ativo calcitriol (1,25-diidroxi-colecalfiferol) (STERLING et al., 2012). A produção extrarrenal de calcitriol ocorre em diversos tecidos expressando CYP27B1 e o receptor de VD (VDR), como células epiteliais da pele, pulmão, intestino e células do sistema imune (Wang et al., 2012). O VDR é um receptor nuclear de fatores de transcrição e, ao ser ativado pelo calcitriol, se liga à elementos responsivos à VD (VDRE) no DNA, resultando na expressão ou repressão de genes (WANG et al., 2004).

Existe muita controvérsia quanto ao que deve ser considerado deficiência de vitamina D. Em geral, é aceito que deficiência se define como níveis séricos menores que 20ng/ml de 25(OH)D (BOUILLON, 2017; HOLICK, 2016), porém o valor aceito como “suficiente/saudável” varia entre valores de 25-100ng/ml, dependendo da população estudada. Entidades governamentais e científicas frequentemente atualizam a recomendação de ingestão diária de VD, especialmente para grupos que não tem muita exposição ao sol, como crianças e idosos. Existe o consenso que crianças durante os primeiros anos de vida devem receber cerca de 400UI (10ng) de suplementação de VD diariamente, sendo esse valor ainda maior para idosos, cuja recomendação é de 400-800UI, dependendo do estado de saúde (BOUILLON, 2017).

Apesar do papel bem estabelecido na manutenção óssea e homeostase do cálcio, os efeitos “não-clássicos” da VD, como a modulação do sistema imune, estão cada vez mais evidentes (ADAMS; HEWISON, 2008; WANG; ZHU; DELUCA, 2012). A vitamina D tem recebido bastante atenção como terapia hospedeiro-direcionada devido à sua capacidade induzir respostas efectoras microbidas e modular a resposta imune a fim de atenuar a inflamação patológica (BRIGHENTI; BERGMAN; MARTINEAU, 2018). A atividade microbiana da vitamina D foi primeiramente observada em experimento realizado por Rook (ROOK et al, 1986) e Crowle

(CROWLE; ROSS; MAY, 1987), no qual monócitos e macrófagos humanos infectados por *M. tuberculosis* foram tratados com a forma ativa da vitamina D e apresentaram redução da carga bacteriana. Apesar do uso de concentrações muito altas de vitamina para obter um resultado positivo, o trabalho foi um importante marco para o estudo do papel da vitamina D na resposta à tuberculose (LIU; MODLIN, 2008).

Figura 7 – Visão geral do metabolismo da vitamina D.



Fonte: Jeon e Shin, 2018.

1.3.1. Vitamina D e tuberculose

Atualmente, a tuberculose é tratada com drogas com atividade antimicrobiana direta, como inibição da síntese de parede celular e transcrição de RNA, porém a OMS estima que, a cada ano, surgem 500mil novos casos de TB resistente à antibióticos, sendo este o maior desafio para a erradicação da doença (KELLY, 2019; OMS, 2018). Na era pré-antibióticos, banho de sol e óleo de bacalhau eram indicados para pacientes com as formas cutânea (lupus vulgaris) e pulmonar, respectivamente (ZASLOFF, 2006). O mecanismo terapêutico era desconhecido na época, porém, atualmente, sabemos que se tratava da ativação da vitamina D e que esta tem um papel importante na resposta contra a tuberculose. Estudos epidemiológicos indicam que níveis baixos de VD estão associados com maior susceptibilidade à tuberculose (MARTINEAU et al., 2007; NNOAHAM; CLARKE,

2008), resultado que foi corroborado por estudos clínicos, que mostraram que indivíduos com TB ativa tem doses baixas de calcitriol em relação à controles saudáveis (YAMSHCHIKOV et al., 2010). Entretanto, resultados quanto à suplementação com vitamina D na melhora de pacientes com TB ainda são conflitantes.

Um dos alvos transcricionais da VD são os genes relacionados a produção de peptídeos antimicrobianos, incluindo a catelicidina (LL-37; LIU et al., 2006) defensina β 4 (DEFB4; RIVAS-SANTIAGO et al., 2005) e hepcidina (SOW et al., 2007). Em humanos, sabe-se que tanto a catelicidina quanto DEFB4 apresentam VDREs em suas regiões promotoras e a ativação do VDR em monócitos/macrófagos diretamente por 1,25OHD3 ou através de TLR resulta na expressão desses peptídeos, induzindo mRNA e síntese proteica. A redução da expressão de catelicidina por siRNA resultou na perda completa da atividade antimicrobiana, sugerindo um papel central dos peptídeos antimicrobianos na defesa do hospedeiro (LIU et al., 2007). Estudos mostram, ainda, que a VD é capaz de: *i.* induzir a expressão de iNOS e aumentar o *burst* oxidativo através da via de sinalização de PI3K (ROCKETT et al., 1998; SLY et al., 2001; FIGUEIREDO, 2016;); *ii.* induzir a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β e a síntese de β -defensina induzida por IL-1 β (LIU et al., 2009). Os peptídeos antimicrobianos também estão presentes nos grânulos de neutrófilos, podendo ser disponibilizados para macrófagos durante infecção por *M. tuberculosis*, o que potencializa a resposta anti-micobacteriana (SILVA; SILVA; APPELBERG, 1989; TAN et al., 2006a).

Além da atividade microbida, foi demonstrado que a pro-LL37 é capaz de induzir a autofagia, através do aumento da expressão de beclina-1 (BECN1) e ATG5, que media a ativação da sinalização via MAPK/ERK 1-2. A autofagia é capaz de contrapor a inibição da maturação do fagossomo, um dos principais mecanismos pelo qual o patógeno evade a resposta imunológica (HART et al., 1987; YUK et al., 2009), além de aumentar a apresentação de antígenos para o sistema imune adaptativo (MÜNZ, 2009).

Os efeitos antimicrobianos da vitamina D estão associados a um efeito imunomodulador, de modo a evitar inflamação excessiva. Em células específicas do sistema imune inato e do adaptativo, a VD tem papel anti-inflamatório, induzindo a síntese de IL-10 por células dendríticas (CORRIPIO-MIYAR et al., 2017) e a

diferenciação de células Treg e aumento da expressão de FoxP3 (COUSSENS; MARTINEAU; WILKINSON, 2014; KHOO et al., 2012).

A relação da vitamina D e o metabolismo lipídico também já foi investigada. Hida e colaboradores demonstraram que tratamento de células 3T3-L1 com 1,25-dihidroxitamina inibiu a diferenciação de pré-adipócitos induzida por rosiglitazona, e resultou na redução da expressão de PPAR- γ (HIDA et al., 1998). Em leucócitos humanos e macrófagos THP-1 infectados por *M.tb* foi observado, através de análise de transcriptoma, um aumento da expressão de genes regulados por VDR e uma correlação entre o VDR e o metabolismo lipídico (SALAMON et al., 2014). A adição de VD à cultura de macrófagos reduziu o número de CLs em células THP-1 infectadas em relação aos controles não infectados através da redução da expressão de PPAR- γ . Agonistas de PPAR- γ reestabeleceram a formação de CLs e antagonizaram os efeitos anti-Mtb do VDR. Esses dados demonstram que a VD está envolvida na regulação do VDR e PPAR- γ e sugere um papel importante para o VDR durante a infecção (SALAMON et al., 2014). Nosso grupo observou um resultado similar em macrófagos murinos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com diferentes concentrações de vitamina D (RODRIGUES, 2019).

Portanto, neste estudo, hipotetizamos que a vitamina D pode influenciar o desfecho da infecção através do recrutamento celular e modulação do metabolismo lipídico. A fim de elucidar esses mecanismos, nos propomos avaliar o efeito do tratamento com vitamina D no metabolismo lipídico durante infecção experimental por *M. bovis in vivo* e, considerando o papel central dos macrófagos na interação com as micobactérias, avaliamos também o efeito do tratamento em cultura de macrófagos peritoneais *in vitro*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na resposta inflamatória durante infecção experimental *in vivo* por *M. bovis* BCG em camundongos e em macrófagos murinos infectados *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

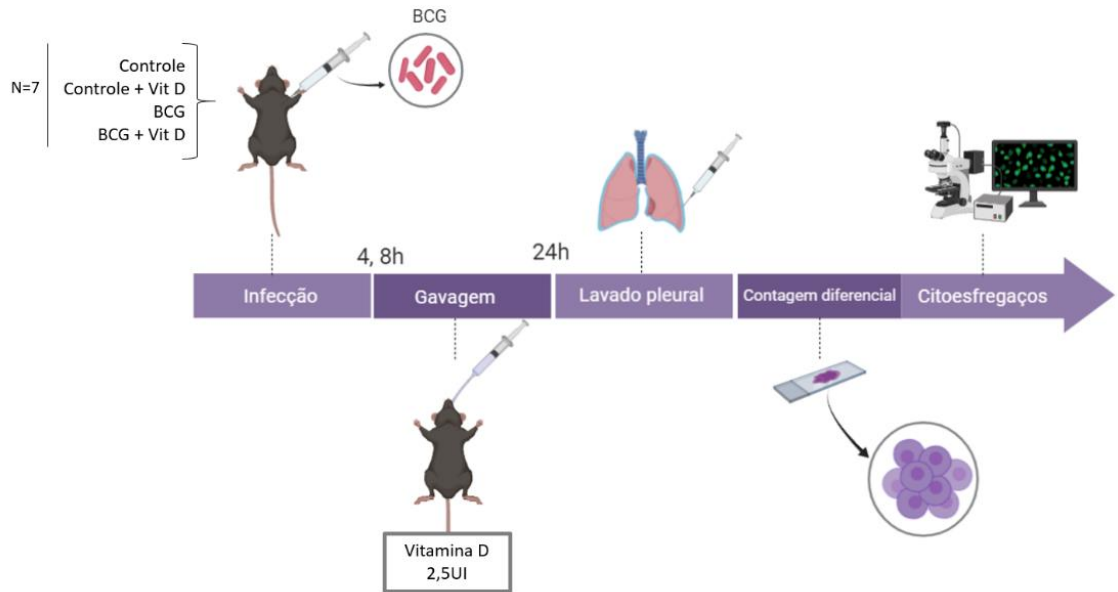
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos em animais infectados por *M. bovis* BCG e em macrófagos peritoneais infectados *in vitro*;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com vitamina D na síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias (TNF- α e IL-10) *in vivo* e *in vitro*;
- ✓ Analisar o efeito do tratamento com vitamina D na síntese de mediadores lipídicos como prostaglandina E₂, nas células infectadas *in vivo* e *in vitro*;
- ✓ Avaliar o efeito do tratamento com vitamina D na expressão do fator nuclear de transcrição PPAR- γ *in vivo* e *in vitro* e síntese de moléculas microbicidas.

3. METODOLOGIA

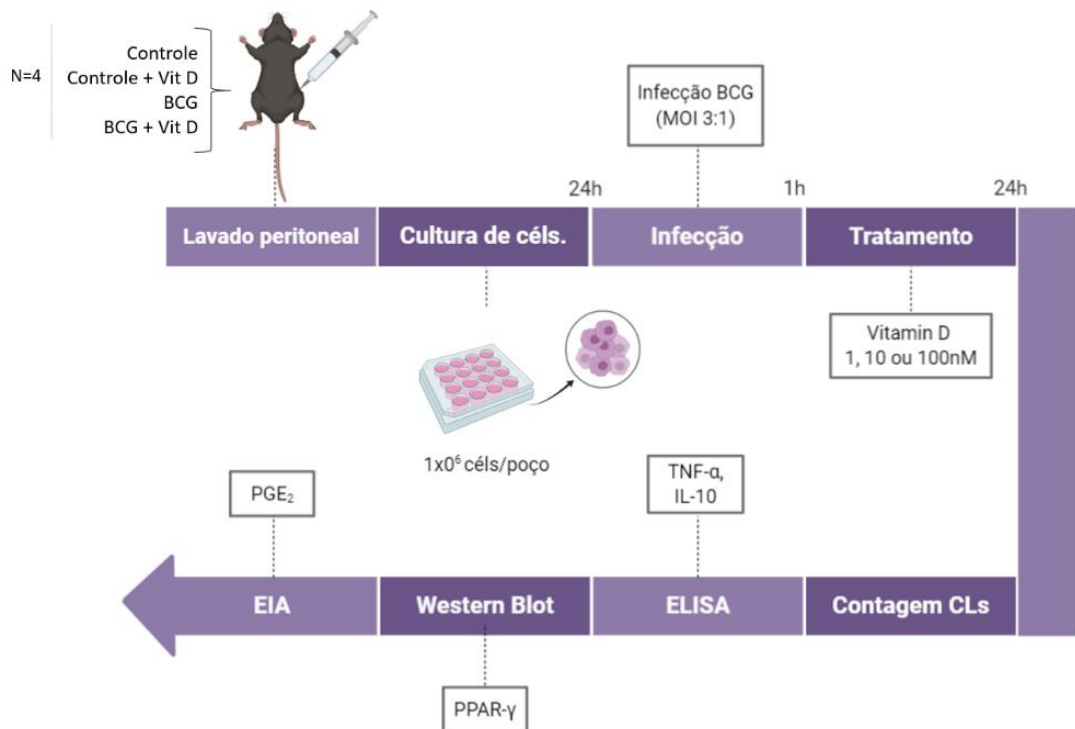
3.1. Delineamento experimental

Figura 8 – Delineamento experimental do trabalho.

In vivo



In vitro



3.2. Animais

Camundongos C57BL/6 foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno coberta com maravalha, com livre acesso à água e ração (Nuvilab, Brasil), em temperatura de 22-26°C com ciclos de claro/escuro de 12h. Camundongos machos pesando de 20 a 25g, de 6-8 semanas, foram utilizados no experimento. Todos os protocolos foram aprovados pelo CEUA-UFJF (021/2015 e 018/2018).

3.3. Obtenção de *Mycobacterium bovis* BCG

A vacina de *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin (BCG; Linhagem Moreau), fabricada pela Fundação Atauilpho de Paiva (RJ), foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. A vacina foi armazenada a 4°C e resuspendida em solução fisiológica estéril logo antes do uso.

3.4. Experimento *in vivo* – Pleurisia induzida por BCG

Para os experimentos *in vivo*, o calcitriol (Calcijex; 1mcg/mL) foi utilizado em diferentes concentrações. Para avaliar seu efeito sobre o metabolismo lipídico, camundongos foram infectados pela via intrapleural (i.pl.) com BCG (5×10^6 bacilos/cavidade) diluído em 4ml de solução fisiológica de salina (conforme D' Avila et al, 2006). Animais controles receberam o mesmo volume contendo apenas salina. Os animais foram tratados com 2,5 UI de vitamina D por gavagem duas vezes, 4h e 8h após a infecção. Após 24h de infecção, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e suas cavidades pleurais lavadas com 1ml de PBS estéril. O sobrenadante do lavado pleural foi coletado e estocado a -20°C para análises posteriores e as células utilizadas para contagens posteriores.

3.5. Experimento *in vitro* - infecção de macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais de animais normais foram plaqueados em microplacas de 6 ou 24 poços. Para análise de corpúsculos lipídicos, foram plaqueadas 1×10^6 células por poço, com lamínulas circulares no fundo, e para análise por Western Blot foram plaqueadas 2×10^6 por poço. As células resuspendidas em meio RPMI-1640 contendo 2% SFB e 1% de penicilina e estreptomicina foram incubadas a 37°C, em atmosfera com 5% CO₂, durante 24h para adesão. Após 24h, as placas foram lavadas com PBS estéril (3x) para retirada das células não aderentes. Em seguida, foi feita a

infecção das células com *M. bovis* BCG, previamente ressuspendido em solução fisiológica estéril (MOI 3:1) e diluído em meio RPMI, por 1h. As placas foram novamente lavadas e tratadas por 24h com vitamina D (Calcijex) em diferentes concentrações (1, 10 e 100nM), diluída em meio RPMI suplementado. Após esse período, as lamínulas foram coradas para contagem de CLs, o sobrenadante foi coletado e as células aderidas foram lisadas mecanicamente para análise por Western Blot.

3.6. Contagem diferencial

Para contagem total de leucócitos, 10 µl do lavado pleural foram diluídos em 390 ml de solução de Turk (cristal violeta a 0,005% em solução de ácido acético a 2% em PBS) para hemólise dos eritrócitos e coloração do núcleo dos leucócitos. Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer sob microscopia de luz. Citoesfregaços contendo cerca de 1 a 3×10^5 células/lâmina foram preparados (450 rpm/5 min). As lâminas destinadas a contagem diferencial de leucócitos, foram coradas com um kit de panótico rápido (Laborclin) para a contagem diferencial de leucócitos, sendo que cada lâmina ficou emersa em cada corante por 1 minuto. Foram contadas 100 células consecutivas em microscópio de luz, com objetiva de 100x, para o estabelecimento das porcentagens de cada tipo celular. Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

3.7. Coloração e contagem de corpúsculos lipídicos

Para coloração de CL, o citoesfregaços obtidos do experimento *in vivo* e os macrófagos aderidos nas lamínulas *in vitro* foram fixadas em formalina 3,7% por pelo menos 10 min. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com propilenoglicol e PBS 1x, e incubadas com Oil Red'O (ORO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 5min, protegidas da luz. Após subsequente lavagem, a lâmina foi montada com meio de montagem contendo 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA), um fluorocromo que se liga ao DNA, usado para visualização dos núcleos. Para determinar o número de CLs, foram contadas 50 células consecutivas/lâmina. Os corpúsculos foram contados em microscópio de fluorescência com o software CellSens (Olympus, Japão). Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

3.8. Quantificação de células apoptóticas

As lâminas destinadas à quantificação das células apoptóticas foram as mesmas utilizadas para a contagem de leucócitos totais. Foram contadas 150 células consecutivas em microscópio de luz, com objetiva de 100x, para o estabelecimento das porcentagens de morte celular. Os resultados foram expressos em média \pm EPM.

3.9. Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes do lavado peritoneal foram analisados quanto à produção de citocinas TNF- α e IL-10. A detecção foi realizada através de ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), utilizando-se anticorpos adquiridos comercialmente, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). A leitura foi realizada em leitor de microplaca (SpectraMax 190; Molecular Devices, EUA) em comprimento de onda 450nm.

3.10. Dosagem de prostaglandina E₂

O sobrenadante da cultura de macrófagos, infectados ou não com BCG e tratados ou não com VD, foi utilizado para dosagem do mediador lipídico prostaglandina E₂ (PGE₂) através do kit de Ensaio Imunoenzimático (EIA; Cayman Chemical, EUA), conforme instruções do fabricante. A leitura da fluorescência foi realizada em diferentes intervalos de tempo em λ 405nm em leitor de microplaca (Molecular Devices, EUA).

3.11. Western Blot

Macrófagos foram lisados com tampão de amostra (Almeida et al, 2009) para obtenção das proteínas celulares. O conteúdo proteico foi separado por eletroforese em gel de acrilamida 10-15% (SDS-PAGE) e transferida para membranas de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado diluído em tampão TRIS suplementado com 0,1% de Tween 20 (Sigma) (TBS-T) por 1h antes de incubação *overnight* com anticorpo primário anti-PPAR γ (Santa Cruz, cat sc-7196, diluição 1:1,000). As membranas foram lavadas com TBS-T e as proteínas detectadas com anticorpo secundário conjugado com marcador fluorescente (anti-mouse, IRDye 800CW, cat 926-32210 or anti-rabbit, IRDye 680RD cat 926-68071, LI-COR) ou

anticorpo secundário conjugado HRP (anti-rabbit, cat PI-1000 or anti-mouse, cat PI-2000; Vector).

3.12. Análise estatística

Os dados são apresentados com média e EPM. A análise estatística dos resultados foi realizado utilizando o software GraphPad Prism 7.0 e os resultados submetidos a ANOVA e posteriormente ao teste Tukey. Foram consideradas significativas diferenças com $p < 0,05$.

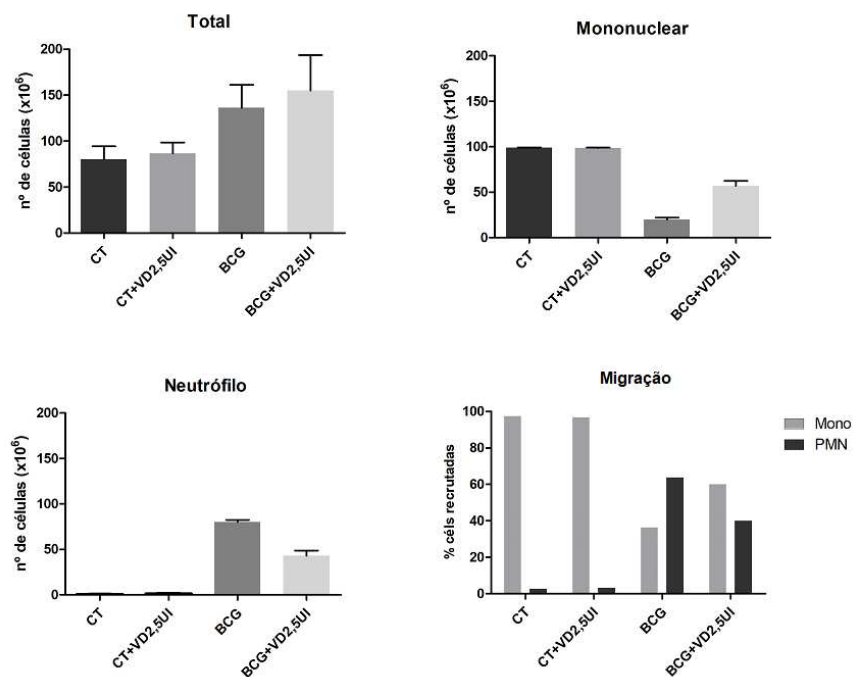
4. RESULTADOS

4.1. Experimento *in vivo* – Pleurisia induzida por BCG

4.1.1. Efeito do tratamento com vitamina D na migração de células induzida pela infecção por BCG

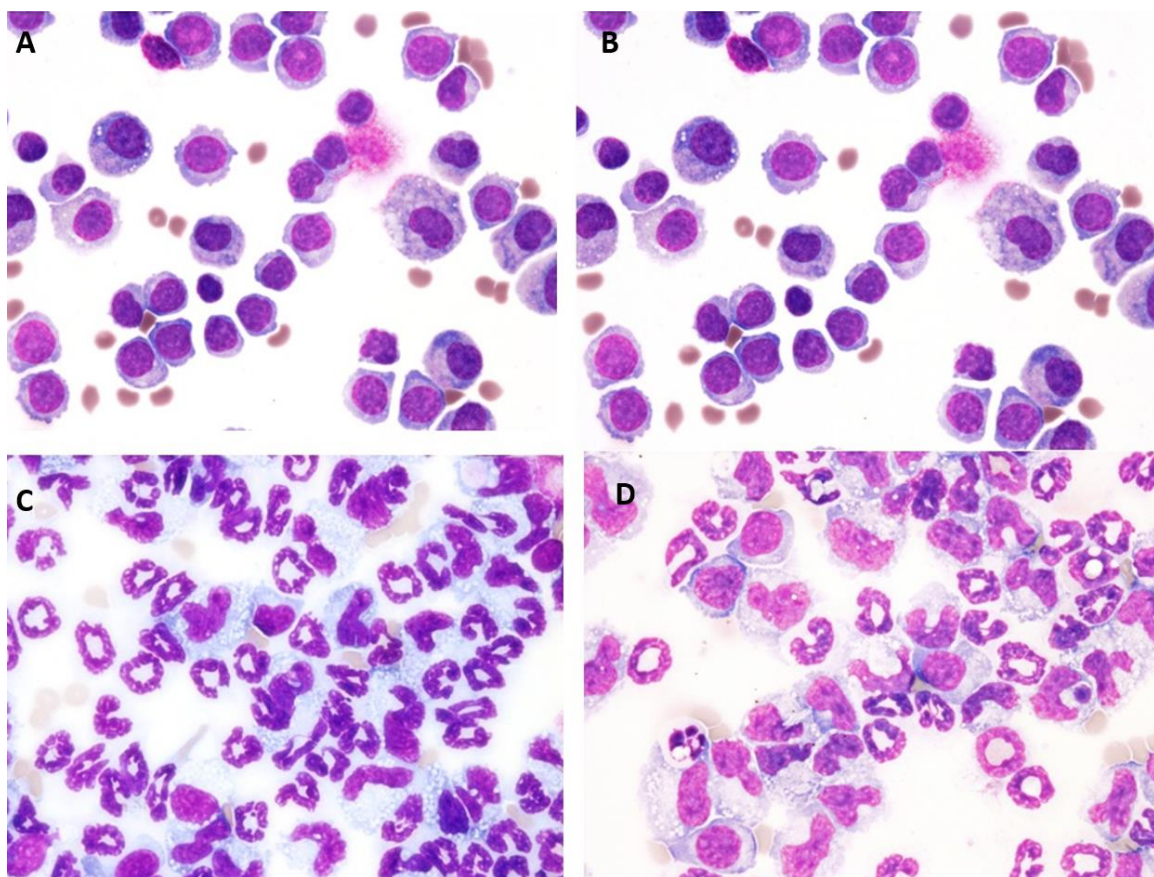
A tuberculose experimental é caracterizada por um rápido influxo de neutrófilos, seguidos por um influxo de monócitos, linfócitos e eosinófilos (ALEMÁN et al., 2005; APPELBERG, 2007; D'AVILA et al., 2006; MENEZES-DE-LIMA-JÚNIOR et al., 1997; PENIDO et al., 2003; WERNECK-BARROSO et al., 2000). Em concordância com a literatura, o modelo de pleurisia induzida por BCG desencadeou recrutamento significativo de neutrófilos no tempo de 24h (Figura 9C). Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no número total de células do controle para infectado e infectado e tratado (Figuras 9A), embora seja observado um discreto aumento de células nos grupos infectado e infectado tratado. Os grupos controle apresentaram somente células mononucleares (Figura 9B, 10A e 10B). O número de células mononucleares diminuiu no grupo infectado (Figura 9B e 10C) e a vitamina D reverteu parcialmente esta inibição (Figura 9B e 10D). Além disso, o tratamento com vitamina D inibiu parcialmente a migração de neutrófilos induzida por BCG (Figura 9C e 10D). No grupo infectado e tratado com vitamina D, vê-se, de forma geral, aumento de células mononucleares e redução dos neutrófilos (Figura 9D). Eosinófilos foram quantificados, porém não apresentaram números expressivos.

Figura 09 – Migração de células 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D. Camundongos C57Bl6 foram infectados i.pl.por BCG (5 x10⁶/cavidade) e tratados 4 e 8h, por gavagem, com Vitamina D.



Análise dos tipos celulares encontrados nas lâminas coradas com panótico. (A) Número total de células; (B) Número de células mononucleares; (C) Número de neutrófilos; (D) Percentual de migração celular. N = 7 *p<0,05

Figura 10 – Morfologia das células do lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

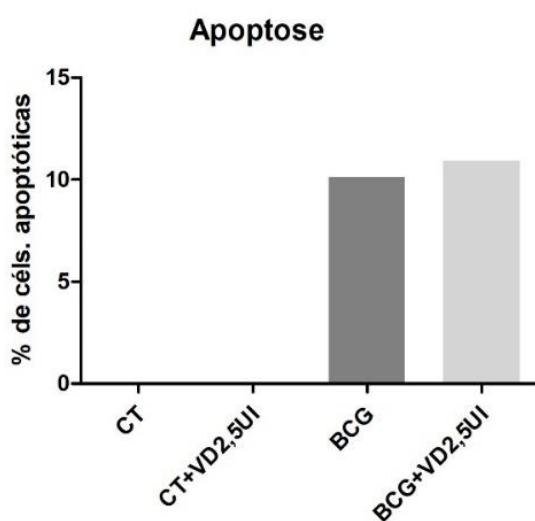


Camundongos C57Bl6 foram infectados *i.pl.* por BCG (5×10^6 /cavidade) e tratados 4 e 8h, por gavagem, com Vitamina D (2,5 U.I). **(A)** Controle; **(B)** Controle + vitamina D 2,5UI; **(C)** Infectado BCG; **(D)** Infectado + vitamina D 2,5UI. Células foram diferenciadas de acordo com a morfologia. Citoesfregaços foram observados em microscopia de luz, no aumento de 100x. Barra= 10 μ m.

4.1.2. Efeito do tratamento com vitamina D na indução da apoptose durante pleurisia induzida por BCG

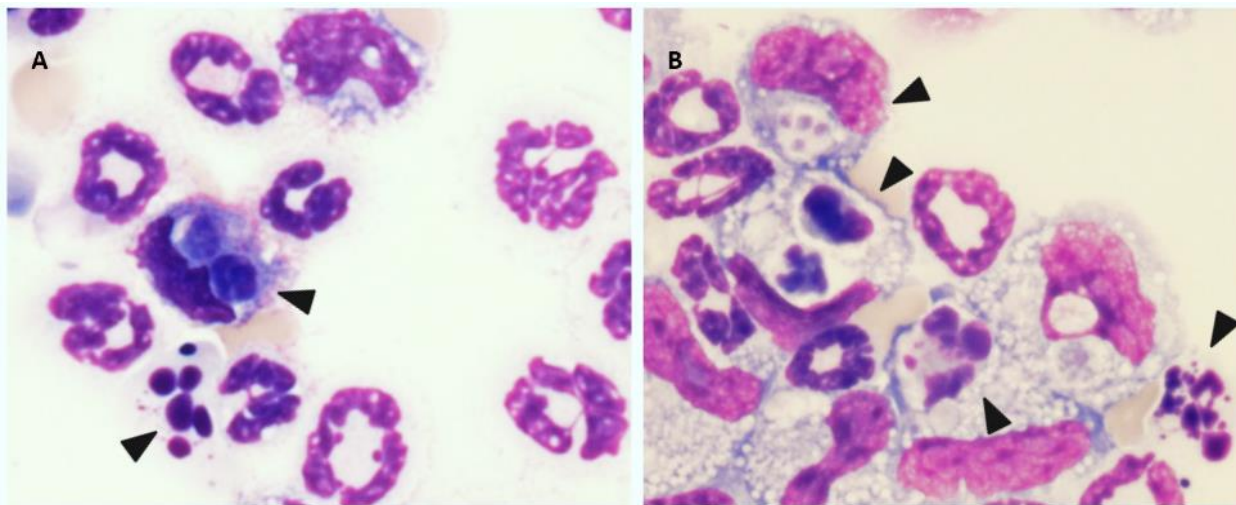
Estudos realizados por nosso grupo demonstraram que a infecção por BCG é capaz de induzir apoptose de neutrófilos *in vivo* (D'AVILA et al., 2008). Sendo assim, o efeito do tratamento com 2,5UI de VD sobre a taxa de apoptose celular *in vivo* foi investigado. Em concordância com a literatura, 24h após a infecção, um número significativo de células que migraram para cavidade pleural sofreu apoptose, como observado na Figura 12A e 12B. As células apoptóticas foram identificadas com base na morfologia característica da morte programada, como condensação nuclear, volume reduzido e citoplasma com vacúolos, observado por microscopia de luz. Não foram observadas células apoptóticas nos grupos controles. Como observado no gráfico abaixo, a porcentagem de células apoptóticas nos grupos infectado e infectado tratado foi semelhante. No entanto, como o número absoluto de neutrófilos que migraram para a cavidade foi menor no grupo tratado com vitamina D, este grupo apresentou menos células apoptóticas no sítio infeccioso (Figuras 11 e 12).

Figura 11 – Quantificação das células apoptóticas no lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.



Citoesfregaços foram observados em microscopia de luz, no aumento de 100x.

Figura 12 – Morfologia das células apoptóticas no lavado pleural 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

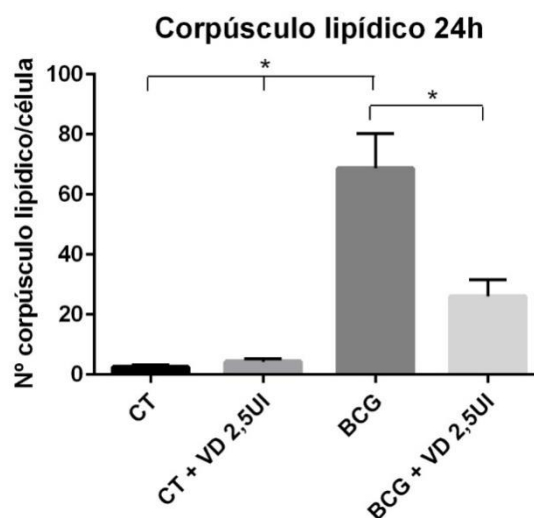


Camundongos C57Bl6 foram infectados *i.pl.* por BCG (5×10^6 /cavidade) e tratados 4 e 8h, por gavagem, com Vitamina D (2,5 U.I). (A) Infectado BCG; (B) Infectado BCG + 2,5UI de vitamina D. Citoesfregaços foram observados em microscopia de luz, no aumento de 100x. Setas indicam as células apoptóticas livres ou já fagocitadas por macrófagos. Barra=10 μ m.

4.1.3. Efeito do tratamento com vitamina D na indução de corpúsculos lipídicos durante pleurisia induzida por BCG

A formação de corpúsculos lipídicos é um fenômeno frequente em infecções por patógenos intracelulares (DE ALMEIDA et al., 2018). Sendo assim, investigamos se a vitamina D poderia modular a formação de CL nas células da cavidade pleural dos animais infectados por BCG. Os CLs foram corados com ORO e visualizados em microscópio de fluorescência para contagem. Observa-se aumento do número de CLs nas células animais infectados com BCG em relação aos controles e redução significativa naqueles infectados e tratados com VD.

Figura 13 – Formação de corpúsculos lipídicos nas células pleurais 24h após pleurisia induzida por BCG e tratamento com vitamina D.

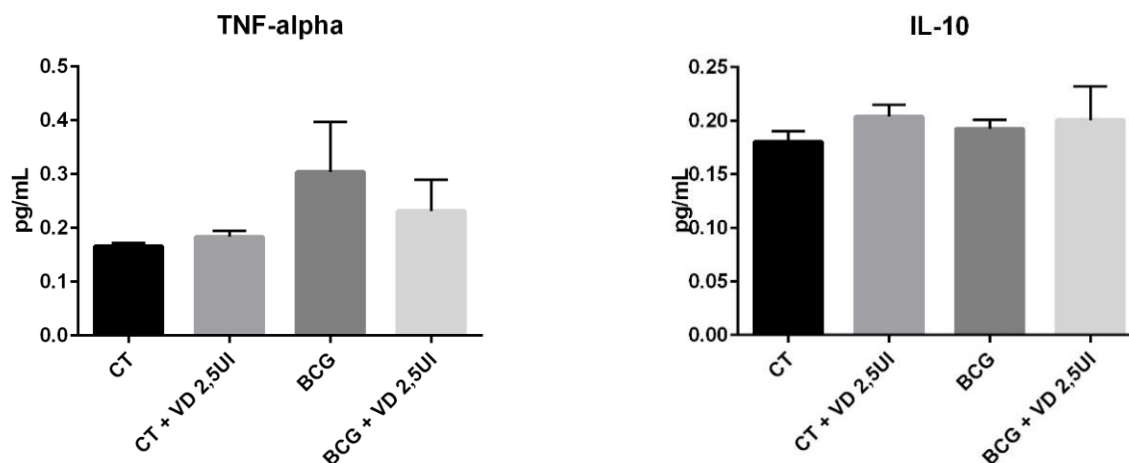


Camundongos C57Bl6 foram infectados *i.pl.* por BCG (5×10^6 /cavidade) e tratados 4 e 8h, por gavagem, com Vitamina D (2,5 U.I). Os corpúsculos lipídicos foram corados com ORO e quantificados em microscopia de luz, no aumento de 100x. Foram consideradas significativas diferenças (*) $p < 0,05$; N=7.

4.1.4. Efeito do tratamento com a vitamina D na síntese de citocinas durante pleurisia induzida por BCG

A resposta imune contra patógenos desencadeia a produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α ; bem como citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; RODRIGUES et al., 2013). Já foi demonstrado que a vitamina D é capaz de afetar a produção de citocinas por células da imunidade inata, portanto avaliamos o efeito do tratamento com VD na produção de TNF- α e IL-10. Foi observada uma tendência de redução de TNF- α nos grupos infectados e tratados com VD em relação aos animais infectados não tratados (Figura 14, lado esquerdo). Não foram observadas diferenças significativas na produção de IL-10 (Figura 14, lado direito).

Figura 14– Dosagem de TNF- α e IL-10 no lavado pleural.



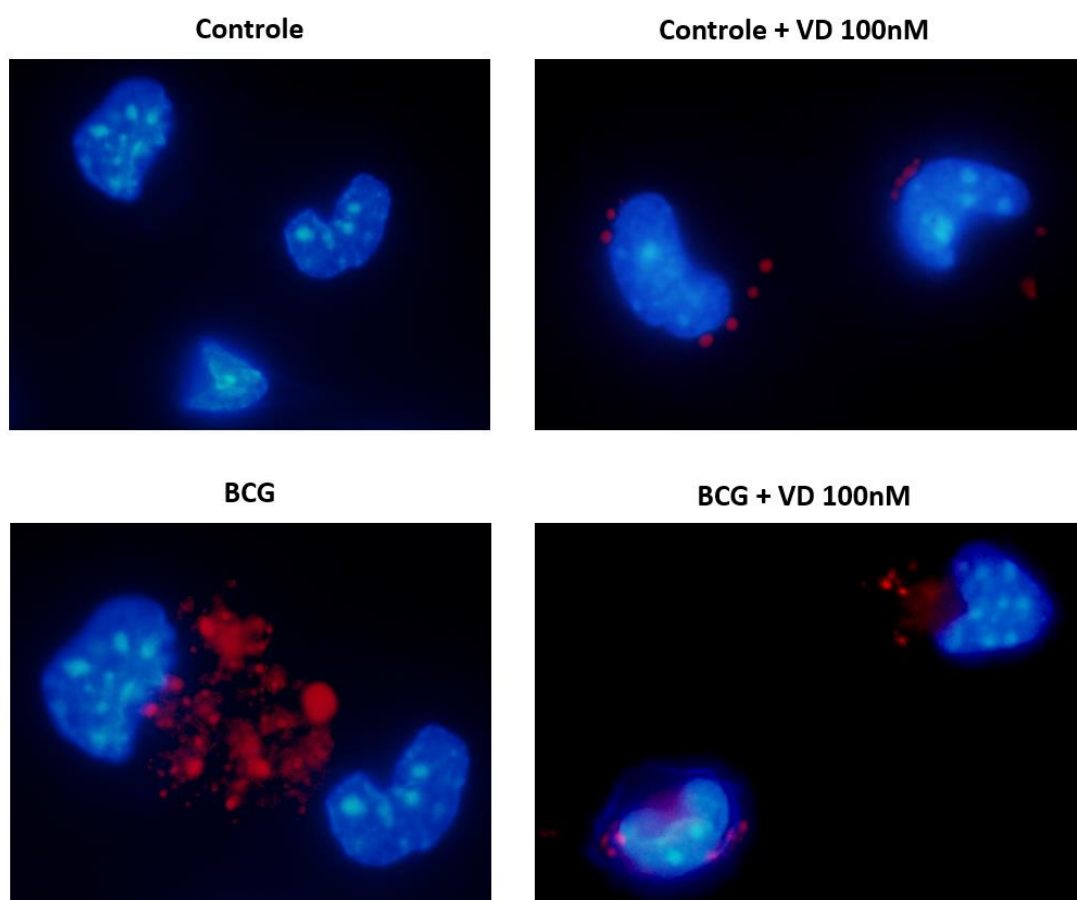
As citocinas foram dosadas por ELISA 24h após a infecção pleural com BCG. Foram consideradas significativas diferenças $p < 0,05$; $N = 7$.

4.2. Experimentos *in vitro*

4.2.1. Efeito do tratamento com a vitamina D na formação de corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados *in vitro* por BCG

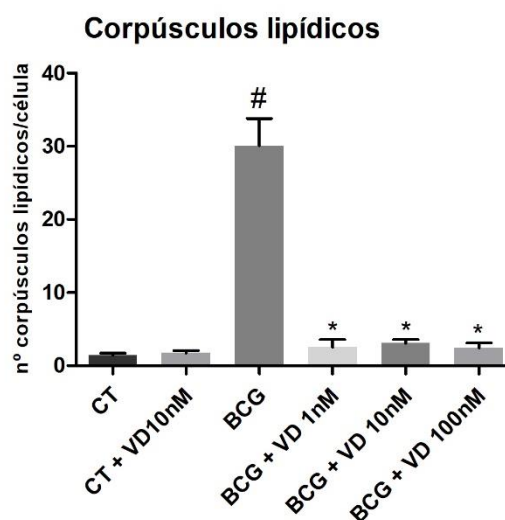
Em concordância com os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* e com dados da literatura (ALMEIDA et al., 2009; D'AVILA et al., 2006), a infecção por BCG induziu a formação de CLs nos macrófagos dos grupos infectados (Figura 16). O tratamento com 1, 10 e 100 nM de VD foi capaz de reduzir significativamente a formação de CLs nestas células (Figura 16). Imagens de microscopia de fluorescência demonstram a redução do número de CLs no grupo infectado e tratado com 100nM de VD em relação ao grupo infectado (Figura 17).

Figura 15 – Morfologia dos macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.



Macrófagos peritoneais foram infectados 24h por BCG (3:1 MOI) e tratados com 100nM de vitamina D por 24h. Células foram observadas por microscopia de fluorescência. Os corpúsculos lipídicos foram corados com ORO (vermelho) e os núcleos com DAPI (azul).

Figura 16 – Quantificação dos corpúsculos lipídicos em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

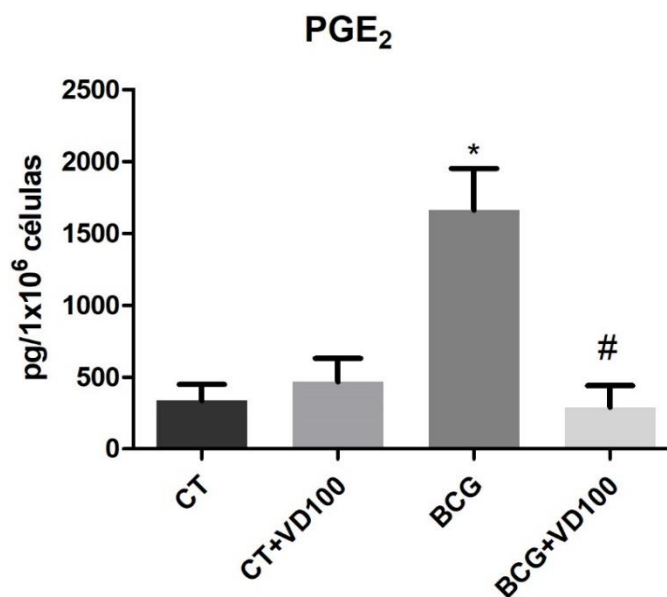


Macrófagos peritoneais foram infectados 24h por BCG (3:1 MOI) e tratados com diferentes doses de vitamina D por 24h. Os corpúsculos lipídicos foram corados com ORO e quantificados em microscopia de luz, no aumento de 100x. Foram consideradas significativas diferenças $p < 0,05$, * entre controle e infectado e # entre infectado e tratado ; N=4.

4.2.2. Efeito do tratamento com a vitamina D na produção de prostaglandina E_2 em macrófagos infectados *in vitro* por BCG

É sabido que corpúsculos lipídicos são sítios de formação de mediadores lipídicos inflamatórios, como leucotrienos e prostaglandinas (D'AVILA et al., 2006). A síntese de prostaglandina E_2 , induzida pela micobactéria, favorece a persistência do patógeno, uma vez que foi associada a redução da resposta macrofágica. Nós investigamos, então, se o tratamento com VD é capaz de modular a síntese deste eicosanoide, a fim de favorecer o hospedeiro em detrimento ao patógeno. Após 24h de infecção e tratamento *in vitro*, pode-se observar um aumento significativo na síntese de PGE_2 no grupo infectado em relação aos controles. No grupo infectado e tratado com 100nM de VD, vê-se uma redução significativa dessa produção.

Figura 17–Quantificação da produção de PGE₂ por macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

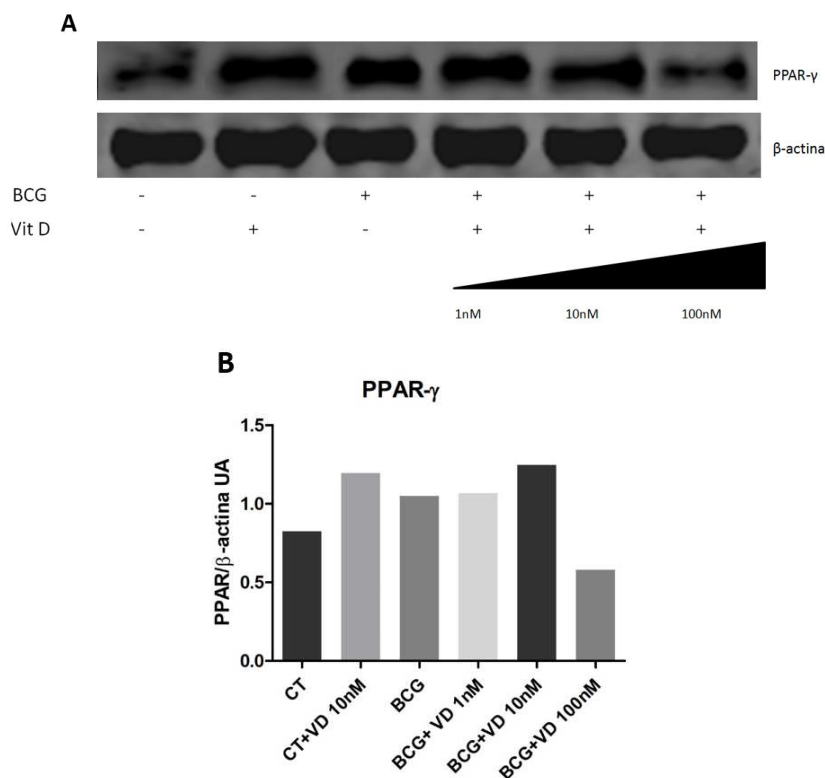


Macrófagos peritoneais foram infectados 24h por BCG (3:1 MOI) e tratados com diferentes doses de vitaminas D por 24h. PGE₂ foi dosada por ensaio imunoenzimático (EIA). Foram consideradas significativas diferenças $p < 0,05$; N=4. (*) Diferença em relação aos controles; (#) Diferença em relação ao infectado.

4.2.3. Efeito do tratamento com a vitamina D na expressão de PPAR- γ em macrófagos infectados *in vitro* por BCG

Diversas evidências sugerem que o fator de transcrição PPAR- γ tem um papel importante na patogênese da tuberculose, uma vez que regula a formação de corpúsculos lipídicos e pode reduzir a resposta macrofágica (ALMEIDA et al., 2009). Portanto, a expressão de PPAR- γ foi avaliada na cultura de macrófagos infectados e tratados *in vitro*. A análise por Western Blot mostrou que a infecção por BCG induziu aumento na expressão de PPAR- γ e que o tratamento com 100nM de vitamina D foi capaz de reduzir a expressão de PPAR- γ em relação ao grupo tratado não-infectado (Figura 18A e 18B). Nota-se que a dose de 100nM é a que se observa maior inibição na formação de CL e síntese de PGE₂ também (Figura 16 e 17). Realizamos também o Western Blott para as enzimas COX-2, iNOS e arginase, mas nenhuma diferença foi observada entre os grupos experimentais.

Figura 18 – Expressão de PPAR- γ em macrófagos peritoneais infectados *in vitro* por BCG.

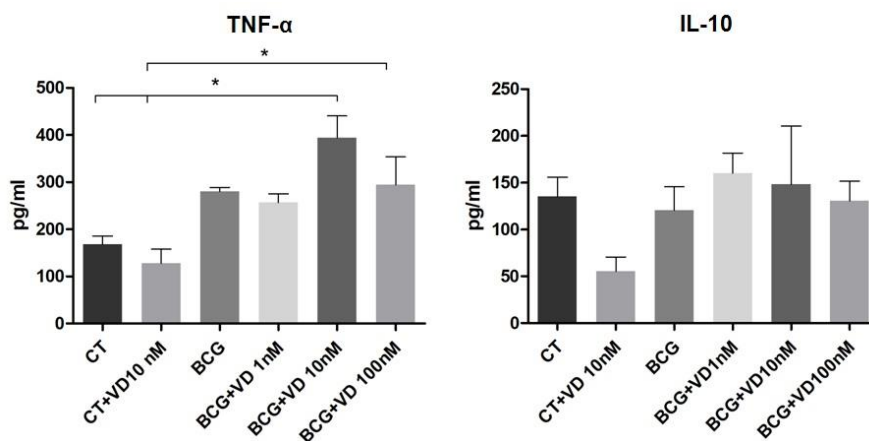


Macrófagos peritoneais foram infectados 24h por BCG (3:1 MOI) e tratados com diferentes doses de vitaminas D por 24h. (A) Bandas de Western Blot; (B) Histograma quantitativo das bandas em unidades arbitrárias (UA).

4.2.4. Efeito do tratamento com a vitamina D na síntese de citocinas em macrófagos infectados *in vitro* por BCG

Foi analisada a produção das citocinas TNF- α e IL-10 na cultura de macrófagos infectados e tratados *in vitro*, de modo a elucidar a tendência observada nos experimentos *in vivo*. Com a análise do sobrenadante da cultura de macrófagos, pode-se observar que o tratamento com vitamina na concentração de 10nM e 100nM foram capazes de potencializar a produção de TNF- α em comparação aos grupos controles. Quanto à produção de IL-10, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, porém a VD sozinha tende a reduzir essa citocina, como observado no grupo não infectado e tratado. Realizamos a dosagem da citocina TGF- β , porém os níveis desta citocina ficaram abaixo dos níveis detectados pela curva em todos os grupos experimentais.

Figura 19 – Dosagem de TNF- α e IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e tratados *in vitro*.



Macrófagos peritoneais foram infectados 24h por BCG (3:1 MOI) e tratados com diferentes doses de vitaminas D por 24h. As citocinas foram dosadas por ELISA. Foram consideradas significativas diferenças $p < 0,05$; $N=7$.

5. DISCUSSÃO

Desde o desenvolvimento da resistência à antibióticos, a busca por terapias adjuvantes, vacinas, novos medicamentos e suplementos vitamínicos é crescente. A vitamina D tem recebido bastante atenção como terapia hospedeiro-direcionada devido à sua capacidade de induzir respostas efetoras microbicidas e modular a resposta imune a fim de atenuar a inflamação patológica (BRIGHENTI; BERGMAN; MARTINEAU, 2018). Já foi demonstrado que o calcitriol (forma ativa da vitamina D) suprime a proliferação do *M. tuberculosis* em monócitos humanos (ROOK et al., 1986) através da produção de peptídeos antimicrobianos, principalmente a catelicidina, e pelo aumento da autofagia, e que a suplementação com a $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ acelera a recuperação clínica de pacientes com TB que apresentavam níveis séricos reduzidos desta vitamina (SALAHUDDIN et al., 2013) mostrando sua importância na patogênese da tuberculose, porém seus efeitos no metabolismo lipídico como um todo foi pouco explorado.

Já foi demonstrado que a infecção por *Mycobacterium bovis* BCG leva à produção de corpúsculos lipídicos em macrófagos e que o aumento do número dessa organela favorece a sobrevivência do patógeno (D'AVILA et al., 2006). A presença de ácido araquidônico (AA) e mediadores lipídicos dentro de CLs demonstrada por D'Ávila e colaboradores (2006) pode ter efeitos danosos para a célula hospedeira, uma vez que o AA livre atua na indução de apoptose em macrófagos infectados por BCG e na maturação do fagossomo (ANES et al., 2003; DUAN et al., 2001). As funções e a ativação dos macrófagos dependem de sinais do microambiente, que levam à sua polarização, sendo os perfis M1 e M2 os extremos do espectro de diferenciação. Apesar da importância deste tipo celular na resposta contra infecção, os neutrófilos são as células mais abundantes no lavado bronqueoalveolar e escarro de pacientes infectados (EUM et al., 2010). Os fatores secretados por neutrófilos durante a infecção, como elastase e mieloperoxidase, causam dano indiscriminado, podendo mediar tanto a atividade anti-micobacteriana quanto a imunopatogênese (DALLENGA; SCHAIBLE, 2016). Entretanto, estudos mostram que neutrófilos apoptóticos ao serem fagocitados por macrófagos infectados, inibem a replicação bacteriana devido a presença de peptídeos antimicrobianos em seu interior (TAN et al., 2006b).

Por este motivo, avaliamos o efeito do tratamento de vitamina D no metabolismo lipídico das células da imunidade inata de animais infectados com a linhagem atenuada (BCG) de *M. bovis* e em cultura de macrófagos isolados do peritônio. Primeiramente, observamos os efeitos do tratamento com vitamina D na migração celular para o sítio de infecção. Para esse estudo utilizamos um modelo de infecção pleural por BCG, que já foi utilizado em diferentes trabalhos do grupo (D'AVILA et al., 2008, 2007 e 2006). Observa-se, no lavado pleural dos animais controle, apenas células mononucleares residentes na pleura e, mediante infecção, há um aumento significativo no número de neutrófilos. O tratamento com vitamina D reduziu o infiltrado neutrofílico e restaurou parcialmente a população de células mononucleares, corroborando o estudo de Mora e colaboradores (2008) no qual é demonstrado que a VD é responsável pela proliferação de monócitos e macrófagos *in vitro* (MORA; MAKOTO; ULRICH, 2010; OHTA et al., 1985). A redução do número de neutrófilos pelo tratamento com vitamina D durante a infecção pode ser benéfica ao hospedeiro, uma vez que o recrutamento excessivo dessas células leva ao dano tecidual indiscriminado. Quanto à indução da apoptose observada nos grupos infectados e infectados e tratados *in vivo*, apresenta-se como uma resposta possivelmente protetiva, considerando que relatos da literatura sugerem que neutrófilos apoptóticos ao serem fagocitados, não infectam os macrófagos responsáveis por sua eliminação (DALLENGA; SCHAIBLE, 2016; TAN et al., 2006a).

Já foi demonstrado que a produção de corpúsculos lipídicos pela célula infectada é benéfica ao patógeno, que poderiam utilizar os lipídios como fonte de carbono e plataforma de síntese de mediadores lipídicos anti-inflamatórios (D'AVILA et al., 2006). Corroborando resultados de estudos *in vitro* com *M. tuberculosis* (SALAMON et al., 2014), a VD foi capaz de reduzir a formação dessa organela em células de animais infectados por BCG, tanto nos experimentos *in vivo* quanto *in vitro*. A produção do principal produto do metabolismo do AA encontrado em CLs, a PGE₂, também foi investigada. A infecção de macrófagos por BCG induziu a síntese de PGE₂, que foi significativamente reduzida com o tratamento com 100nM de VD. Este resultado demonstra que a VD não só é capaz de modular a formação de CLs, mas também atua reduzindo a produção de eicosanoides derivados desta organela que seriam desfavoráveis para a resposta macrofágica. A produção de PGE₂ pode ainda ter influenciado na síntese de TNF- α por macrófagos infectados *in vitro*, uma vez que esta já foi relacionada a redução a produção de citocinas pró-inflamatórias via inibição

de NF- κ B. Esta hipótese se vale do fato que o tratamento de animais infectados com VD apresenta um aumento dessa citocina ao mesmo tempo que apresentam uma redução significativa de PGE₂.

A fim de investigar outro possível mecanismo pelo qual a vitamina D exerce seu efeito protetivo, investigamos a via de sinalização do PPAR- γ , uma importante via inibitória da atividade de macrófagos, que está relacionada com a biogênese de corpúsculos lipídicos e produção de prostaglandinas em infecções por patógenos intracelulares, como *M. bovis* (ALMEIDA et al., 2009). O tratamento com 100nM de VD foi capaz de inibir parcialmente a expressão desse fator de transcrição, induzido pela infecção por BCG, indicando que a VD é capaz de modular a expressão de genes relacionados à adipogênese.

Durante a infecção por micobactérias patogênica, as células fagocíticas produzem citocinas que irão auxiliar no combate ao patógeno. Durante a resposta imunológica, o equilíbrio da produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias irá determinar a eliminação ou sobrevivência do patógeno (RUSSELL et al., 2010). Neste estudo, utilizamos o sobrenadante do lavado pleural de camundongos C57BL/6 e o sobrenadante de cultura de macrófagos para avaliar a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α e da anti-inflamatória IL-10. Foi observado um aumento de TNF- α e uma tendência na diminuição de IL-10 nos macrófagos cultivados, que pode ser vista como estratégia favorável de combate ao patógeno, pois já foi demonstrado que TNF- α é uma citocina importante para ativação da resposta adaptativa e que a produção excessiva de IL-10 é prejudicial ao controle da infecção (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008; ROY et al., 2014). Não foram observadas diferenças significativas na produção dessas citocinas *in vivo*, possivelmente devido aos diversos fatores envolvidos durante a infecção *in vivo*, como a diversa gama de células e moléculas que atuam no patógeno, características específicas do animal e pela dose de VD utilizada (2,5UI). Os experimentos *in vitro* foram realizados justamente a fim de investigar se as tendências observadas nesses resultados poderiam ser mais ou menos pronunciadas em um tipo celular específico, no caso os macrófagos, que de acordo com a literatura e nossos resultados, possuem um papel fundamental no desfecho da infecção.

6. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados demonstram que as concentrações utilizadas de vitamina D neste trabalho foram capazes de inibir a formação de CLs induzidos pela infecção por BCG tanto *in vivo* quanto *in vitro* e reduzir significativamente a síntese do principal mediador lipídico produzido durante a infecção, a prostaglandina E₂, possivelmente através da inibição da expressão de PPAR- γ . Além disso, a vitamina D é capaz de potencializar a síntese de TNF- α durante a infecção por BCG em macrófagos *in vitro*.

Ainda se fazem necessários estudos complementares de modo a elucidar os mecanismos moleculares pelos quais a vitamina D é capaz de modular a migração de células para sítio de infecção e seus efeitos em outros mediadores lipídicos. Estudos como esse possuem relevância clínica, uma vez que a identificação de novos alvos terapêuticos, como o metabolismo lipídico, pode levar a melhora de tratamentos já existentes ou abrir caminho para estudos que visam o aumento da resistência à tuberculose.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, M. T. et al. Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. **Cancer Research**, v. 68, n. 6, p. 1732–1740, 2008.

ADAMS, J. S.; HEWISON, M. Unexpected actions of Vitamin D: new perspectives on the regulation of Innate and Adaptive Immunity. **Nat Clin Pract Endocrinol Metab.**, v. 4, n. 2, p. 80–90, 2008.

AKAOGI, J. et al. Prostaglandin E 2 receptors EP2 and EP4 are up-regulated in peritoneal macrophages and joints of pristane-treated mice and modulate TNF- α and IL-6 production . **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 1, p. 227–236, 2004.

ALEMÁN, M. et al. Mycobacterium tuberculosis-induced activation accelerates apoptosis in peripheral blood neutrophils from patients with active tuberculosis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 27, n. 5, p. 583–592, 2002.

ALEMÁN, M. et al. Mycobacterium tuberculosis triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving Toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 9, p. 5150–5158, 2004.

ALEMÁN, M. et al. In Tuberculous Pleural Effusions, Activated Neutrophils Undergo Apoptosis and Acquire a Dendritic Cell–Like Phenotype. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 192, n. 3, p. 399–409, 2005.

ALMEIDA, P. E. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin Infection Induces TLR2-Dependent Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Expression and Activation: Functions in Inflammation, Lipid Metabolism, and Pathogenesis. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 2, p. 1337–1345, 2009.

ALMEIDA, P. E. et al. PPAR γ expression and function in mycobacterial infection: Roles in lipid metabolism, immunity, and bacterial killing. **PPAR Research**, v. 2012, 2012.

ANES, E. et al. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. **Nature Cell Biology**, v. 5, n. 9, p. 793–802, 2003.

APPELBERG, R. et al. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: Role of neutrophils. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3381–3387, 1995.

APPELBERG, R. Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 87–92, 2007.

ARONOFF, D. M.; CANETTI, C.; PETERS-GOLDEN, M. Prostaglandin E2 Inhibits Alveolar Macrophage Phagocytosis through an E-Prostanoid 2 Receptor-Mediated Increase in Intracellular Cyclic AMP. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 1, p. 559–565, 2014.

BARISCH, C.; SOLDATI, T. Breaking fat! How mycobacteria and other intracellular pathogens manipulate host lipid droplets. **Biochimie**, v. 141, p. 54–61, 2017.

BENOIT, M.; DESNUES, B.; MEGE, J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 6, p. 3733–9, 2008.

BENSINGER, S. J.; TONTONOZ, P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 470–477, 2008.

BOTELLA, H. et al. Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. **Cell Host and Microbe**, v. 10, n. 3, p. 248–259, 2011.

BOUILLON, R. Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 8, p. 466–479, 2017.

BOZZA, P. T. et al. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: Cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin (nonsteroidal antiinflammatory

agents/cyclooxygenase knockout/leukotrienes/prostaglandin endoperoxide H synthase/lipoxygenase). **Medical Sciences**, v. 93, n. October, p. 11091–11096, 1996.

BOZZA, P. T.; MELO, R. C. N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 113, n. 1, p. 30–49, 2007.

BRASIL. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose**. [s.l.: s.n.].

BRIGHENTI, S.; BERGMAN, P.; MARTINEAU, A. R. Vitamin D and tuberculosis: where next? **Journal of Internal Medicine**, v. 284, n. 2, p. 145–162, 2018.

BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. **Science**, v. 285, n. 5428, p. 732–736, 1999.

CALMETTE, A. Preventive Vaccination Against Tuberculosis with BCG. **Proceedings of The Royal Society of Medicine**, p. 6–7, 1931.

CHANG, K. C. et al. Supervised and induced sputum among patients with smear-negative pulmonary tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v. 31, n. 5, p. 1085–1090, 2008.

CHAWLA, A. et al. Nuclear Receptors and Lipid Physiology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1866–1870, 2001.

CHEN, M. et al. Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE₂ and LXA₄ in the induction of macrophage death. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 12, p. 2791–2801, 2008.

COMSTOCK, G W; LIVESAY, V T; WOOLPERT, S. F. The Prognosis of a Positive Tuberculin Reaction in Childhood. **American Journal of Epidemiology**, v. 99, n. 2, p. 131–138, 1974.

CORRIPIO-MIYAR, Y. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ modulates the phenotype and function of Monocyte derived dendritic cells in cattle. **BMC Veterinary Research**, v.

13, n. 1, p. 1–10, 2017.

COSTELLO, B. Y. R.; LD, P.; IZUMI, A. T. TUBERCULOSIS IN ALBINO MICE THE IMMUNE PHASE *, : ~ (From The Rockefeller University , New York 10021) Animals . --The NCS strain of Swiss albino mice were used in the majority of experiments. p. 362–375, 1970.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D. G.; RILEY, E. M. IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771–5777, 2008. COUSSENS, A. K.; MARTINEAU, A. R.; WILKINSON, R. J. Anti-Inflammatory and Antimicrobial Actions of Vitamin D in Combating TB/HIV. **Scientifica**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

CROWLE, A. J.; ROSS, E. J.; MAY, M. H. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 12, p. 2945–2950, 1987.

CRUMP, J. A. et al. Major Infectious Diseases. **Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 6): Major Infectious Diseases**, p. 365–385, 2017.

D'AVILA, H. et al. Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E₂ production by macrophages. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 2589–2604, 2008.

D'AVILA, H. D. et al. Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin Induces TLR-2 Mediated Formation of Lipid Bodies: Intracellular Domains for Eicosanoid Synthesis In Vivo. **Journal of Immunology**, v. 3, 2006.

DALLENGA, T.; SCHAIBLE, U. E. Neutrophils in tuberculosis--first line of defence or booster of disease and targets for host-directed therapy? **Pathogens and disease**, v. 74, n. 3, p. 1–8, 2016.

DE ALMEIDA, P. E. et al. Lipid bodies as sites of prostaglandin E₂ synthesis during Chagas disease: Impact in the parasite escape mechanism. **Frontiers in**

Microbiology, v. 9, n. MAR, p. 1–8, 2018.

DELOCCO, B. A. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde. **Brats**, n. 16, p. 14, 2011.

DENNIS, E. A.; NORRIS, P. C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 8, p. 511–523, 2015.

DUAN, L. et al. Cytosolic Phospholipase A2 Participates with TNF- in the Induction of Apoptosis of Human Macrophages Infected with Mycobacterium tuberculosis H37Ra. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 12, p. 7469–7476, 2001.

ERUSLANOV, E. B. et al. Neutrophil Responses to. **Society**, v. 73, n. 3, p. 1744–1753, 2005.

EUM, S. Y. et al. Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. **Chest**, v. 137, n. 1, p. 122–128, 2010.

FADOK, V. A. et al. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. **Journal of Clinical Investigation**, v. 101, n. 4, p. 890–898, 1998.

FANALE, D.; AMODEO, V.; CARUSO, S. The Interplay between Metabolism, PPAR Signaling Pathway, and Cancer. **PPAR Research**, v. 2017, p. 2–4, 2017.

FARESE, R. V.; WALTHER, T. C. Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 855–860, 2009.

FERRI, A. O. et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, v. 15, n. 24, p. 145–2012, 2014.

FULTON, S. A. et al. Pulmonary immune responses during primary Mycobacterium bovis-Calmette-Guerin bacillus infection in C57B1/6 mice. **American Journal of**

Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 22, n. 3, p. 333–343, 2000.

GEARING, K. L. et al. Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 4, p. 1440–1444, 1993.

GENOLET, R. et al. Promoter rearrangements cause species-specific hepatic regulation of the glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 24143–24152, 2005.

GETAHUN, H. et al. Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2127–2135, 2015.

GLASS, C. K.; SAIJO, K. Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 5, p. 365–376, 2010.

GOLD MC, NAPIER RJ, L. D. MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to Mtb. **Immunology Rev**, v. 264, n. 1, p. 154–166, 2015.

GREENWOOD, M. Professor Calmette's Statistical Study of BCG Vaccination. **The British Medical Journal**, v. 54, n. 1923, p. 793–795, 1928.

GUIRADO, E. et al. Deletion of PPAR γ in lung macrophages provides an immunoprotective response against *M. tuberculosis* infection in mice. **Tuberculosis**, v. 111, p. 170–177, 2018.

HART, B. Y. P. D. A. et al. EXPLAINED BY INHIBITION OF LYSOSOMAL MOVEMENTS OBSERVED AFTER PHAGOCYTOSIS MACROPHAGES BY CERTAIN MYCOBACTERIA CAN BE INHIBITION OF PHAGOSOME-LYSOSOME FUSION IN After phagocytosis of certain pathogenic microorganisms by cultured macro- phages or monocytes. v. 166, n. October, 1987.

HEMING, M. et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ modulates the

response of macrophages to lipopolysaccharide and glucocorticoids. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.

HIDA, Y. et al. Counteraction of retinoic acid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on up-regulation of adipocyte differentiation with PPAR γ ligand, an antidiabetic thiazolidinedione, in 3T3-L1 cells. **Life Sciences**, v. 62, n. 14, p. PL205–PL211, 1998.

HMAMA, Z. et al. Immuno-evasion and immunosuppression of the macrophage by Mycobacterium tuberculosis. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 220–232, 2015.

HOLICK, M. F. **Vitamin D: Physiology, molecular biology and clinical applications**. [s.l.: s.n.].

HUYNH, M. L. N.; FADOK, V. A.; HENSON, P. M. Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 1, p. 41–50, 2002.

JIANG, C.; TING, A. T.; SEED, B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokine. **Nature**, v. 391, n. January, p. 82–86, 1998.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages . **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2016–2020, 2000.

KELLER, H. et al. Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 6, p. 2160–2164, 1993.

KELLY, A. M. Tuberculosis. **Nursing Clinics of North America**, 2019.

KHOO, A. L. et al. Seasonal variation in vitamin D₃ levels is paralleled by changes in the peripheral blood human T cell compartment. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2012.

KILLICK, K. E. et al. Receptor-mediated recognition of mycobacterial pathogens. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 9, p. 1484–1495, 2013.

KUNKEL, S. L. et al. Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 137, n. 1, p. 404–410, 1986.

LABONTE, A. C.; TOSELLO-TRAMPONT, A.-C.; HAHN, Y. S. The Role of Macrophage Polarization in Infectious and Inflammatory Diseases. **Mol. Cells**, v. 37, n. 4, p. 275–285, 2014.

LAI, R. et al. Mucosal immunity and novel tuberculosis vaccine strategies: route of immunisation-determined T-cell homing to restricted lung mucosal compartments. **European Respiratory Review**, v. 24, n. 136, p. 356–360, 2015.

LIGHTER, J.; RIGAUD, M. Diagnosing Childhood Tuberculosis: Traditional and Innovative Modalities. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 39, n. 3, p. 61–88, 2009.

LIU, C. H.; LIU, H.; GE, B. Innate immunity in tuberculosis: Host defense vs pathogen evasion. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 14, n. 12, p. 963–975, 2017.

LIU, P. T. et al. Toll-Like Receptor Triggering of a Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Response. **Science**, v. 311, n. March, p. 1770–1773, 2006.

LIU, P. T. et al. Cutting Edge: Vitamin D-Mediated Human Antimicrobial Activity against Mycobacterium tuberculosis Is Dependent on the Induction of Cathelicidin. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 4, p. 2060–2063, 2007.

LIU, P. T. et al. Convergence of IL-1 β and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, 2009.

LIU, P. T.; MODLIN, R. L. Human macrophage host defense against Mycobacterium tuberculosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 4, p. 371–376, 2008.

LUCA, S.; MIHAESCU, T. History of BCG Vaccine. **Maedica**, v. 8, n. 1, p. 53–8, 2013.
LUGO-VILLARINO, G. et al. Emerging trends in the formation and function of

tuberculosis granulomas. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–9, 2012.

MANDARD, S. et al. Glycogen synthase 2 is a novel target gene of peroxisome proliferator-activated receptors. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 9, p. 1145–1157, 2007.

MARTIN, C. J. et al. Efferocytosis is an innate antibacterial mechanism. **Cell Host and Microbe**, v. 12, n. 3, p. 289–300, 2012.

MARTINEAU, A. R. et al. A single dose of vitamin D enhances immunity to mycobacteria. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 176, n. 2, p. 208–213, 2007.

MARTÍNEZ-COLÓN, G. J.; MOORE, B. B. Prostaglandin E2 as a Regulator of Immunity to Pathogens. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 185, n. December 2017, p. 135–146, 2018.

MATTOS, K. A. et al. Modulation of lipid droplets by Mycobacterium leprae in Schwann cells: A putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 259–273, 2011.

MENEZES-DE-LIMA-JÚNIOR, O. et al. Effects of inhibitors of inflammatory mediators and cytokines on eosinophil and neutrophil accumulation induced by Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin in mouse pleurisy. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 62, n. 6, p. 778–785, 1997.

MILBURN, H. Key issues in the diagnosis and management of tuberculosis. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 2000, 2007.

MOLLOY, A.; LAOCHUMROONVORAPONG, P.; KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular Bacillus Calmette-Guérin. **J. Exp. Med**, v. 180, n. 94, p. 1499–1509, 1994.

MORA, R.; MAKOTO, I.; ULRICH, A. Vitamin effects on the immune system: vitamins

A and D take centre stage. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, n. 9, p. 685–698, 2010.

MORTENSEN, R. et al. Cyclooxygenase inhibitors impair CD4 T cell immunity and exacerbate Mycobacterium tuberculosis infection in aerosol-challenged mice. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2019.

MÜNZ, C. Enhancing Immunity Through Autophagy. **Annual Review of Immunology**, v. 27, n. 1, p. 423–449, 2009.

MURPHY, D. J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325–438, 2001.

NADRA, K. et al. Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α . **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 8, p. 3266–3281, 2006.

NEEDLEMAN, P. et al. Arachidonic acid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 4, p. 69–102, 1986.

NNOAHAM, K. E.; CLARKE, A. Low serum vitamin D levels and tuberculosis: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, n. 1, p. 113–119, 2008.

NWANA, N. et al. Treatment of latent Mycobacterium tuberculosis infection with 12 once weekly directly-observed doses of isoniazid and rifapentine among persons experiencing homelessness. **PloS one**, v. 14, n. 3, p. e0213524, 2019.

O'CALLAGHAN, G.; HOUSTON, A. Prostaglandin E2 and the EP receptors in malignancy: Possible therapeutic targets? **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 22, p. 5239–5250, 2015.

O'GARRA, A. et al. **The Immune Response in Tuberculosis**. [s.l.: s.n.]. v. 31

OHTA, M. et al. 1,25-Dihydroxivitamin D3(calcitriol) Stimulates Proliferation of Human Circulating Monocytes in vitro. **FEBS**, v. 185, n. 1, p. 1–5, 1985.

OMS. **Tuberculosis Report 2018**. [s.l: s.n.].

PACHECO, P. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 Controls Microtubule-Driven Biogenesis and Leukotriene B₄-Synthesizing Function of Macrophage Lipid Bodies Elicited by Innate Immune Response . **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 12, p. 8500–8508, 2007.

PAUL, A. et al. Deficiency of Adipose Differentiation-Related Protein Impairs Foam Cell Formation and Protects Against Atherosclerosis. **Circ Res.**, v. 102, n. 12, p. 1492–1501, 2008.

PEDROSA, J. et al. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic Mycobacterium tuberculosis infection of mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, p. 577–583, 2000.

PENIDO, C. et al. Role of Monocyte Chemotactic Protein-1/CC Chemokine Ligand 2 on $\gamma\delta$ T Lymphocyte Trafficking during Inflammation Induced by Lipopolysaccharide or Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin . **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 12, p. 6788–6794, 2003.

PERES-BUZALAF, C. et al. Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 85, n. 2, p. 75–81, 2011.

PHILIPS, J. A.; ERNST, J. D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 7, n. 1, p. 353–384, 2012.

PLÜDDEMANN, A.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Innate immunity to intracellular pathogens: Macrophage receptors and responses to microbial entry. **Immunological Reviews**, v. 240, n. 1, p. 11–24, 2011.

RAJARAM, M. V. S. et al. Mycobacterium tuberculosis Activates Human Macrophage Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Linking Mannose Receptor Recognition

to Regulation of Immune Responses . **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 929–942, 2010.

RAMAKRISHNAN, L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v. 12, n. 5, p. 352–366, 2012.

REGAN, J. W. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling. **Life Sciences**, v. 74, n. 2–3, p. 143–153, 2003.

RICOTE, M. et al. The peroxisome proliferator- activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation. **Nature**, v. 391, n. 1, p. 79–81, 1998.

RIVAS-SANTIAGO, B. et al. Human β -defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 8, p. 4505–4511, 2005.

ROCKETT, K. A. et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Induces Nitric Oxide Synthase and Suppresses Growth of. **Society**, v. 66, n. 11, p. 5314–5321, 1998.

RODRIGUES, G. A Vitamina D como potencializadora da atividade de macrófagos na infecção in vitro por Trypanosoma cruzi. **Tese de Doutorado**, v. UFJF, 2019.

RODRIGUES, M. F. et al. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent Mycobacterium bovis. **Immunology**, v. 139, n. 4, p. 503–512, 2013.

ROGERS, L. M. et al. EP4 and EP2 Receptor Activation of Protein Kinase A by Prostaglandin E2 Impairs Macrophage Phagocytosis of Clostridium sordellii. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 1, p. 34–43, 2014.

ROOK, G. A. et al. Vitamin D₃, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. **Immunology**, v. 57, n. 1, p. 159–63, 1986.

ROY, A. et al. Effect of BCG vaccination against Mycobacterium tuberculosis infection

in children: Systematic review and meta-analysis. **BMJ (Online)**, v. 349, n. August, p. 1–11, 2014.

RUSSELL, D. G. et al. Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma. **Nat Immunol**, v. 10, n. 9, p. 943–948, 2010.

SAKAMOTO, K. The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 3, p. 423–439, 2012.

SALAHUDDIN, N. et al. Vitamin D accelerates clinical recovery from tuberculosis: Results of the SUCCINCT Study [Supplementary Cholecalciferol in recovery from tuberculosis]. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of vitamin D supplementation in patients with pulmonar. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

SALAMON, H. et al. Cutting Edge: Vitamin D Regulates Lipid Metabolism in Mycobacterium tuberculosis Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 1, p. 30–34, 2014.

SARAAV, I.; SINGH, S.; SHARMA, S. Outcome of Mycobacterium tuberculosis and Toll-like receptor interaction: Immune response or immune evasion? **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 9, p. 741–746, 2014.

SCHMITZ, G.; GRANDL, M. Lipid homeostasis in macrophages - Implications for atherosclerosis. **Review in Physiological Biochemistry Pharmacology**, v. 160, p. 93–125, 2008.

SHINOMIYA, S. et al. Regulation of TNF α and interleukin-10 production by prostaglandins I₂ and E₂: Studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype-selective synthetic agonists. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, n. 9, p. 1153–1160, 2001.

SHISHIKURA, K. et al. Prostaglandin E₂ inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. **British Journal of Pharmacology**, v. 173, n. 2, p.

319–331, 2016.

SIA, J. K.; GEORGIEVA, M.; RENGARAJAN, J. Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium tuberculosis* and Innate Immune Cells . **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

SILVA, M. T.; SILVA, M. N.; APPELBERG, R. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defence against mycobacterial infections. **Microbial Pathogenesis**, v. 6, n. 5, p. 369–380, 1989.

SILVA MIRANDA, M. et al. The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–14, 2012.

SLY, L. et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃-Induced Monocyte Antimycobacterial Activity is Regulated by Phosphatidylinositol 3-kinase and Mediated by the NADPH-dependent Phagocyte Oxidase. v. 5, 2001.

SLY, L. M. et al. Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in Host Macrophages Involves Resistance to Apoptosis Dependent upon Induction of Antiapoptotic Bcl-2 Family Member Mcl-1 . **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 1, p. 430–437, 2003.

SOW, F. B. et al. Expression and localization of hepcidin in macrophages: a role in host defense against tuberculosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, n. 4, p. 934–945, 2007.

STERLING, K. A. et al. The immunoregulatory function of vitamin D: Implications in chronic kidney disease. **Nature Reviews Nephrology**, v. 8, n. 7, p. 403–412, 2012.

STORLA, D. G.; YIMER, S.; BJUNE, G. A. A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. **BMC Public Health**, v. 8, p. 1–9, 2008.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 16, p. 11613–11617, 2007.

TAN, B. H. et al. Macrophages Acquire Neutrophil Granules for Antimicrobial Activity against Intracellular Pathogens. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1864–1871, 2006a.

TAN, B. H. et al. Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 177, n. 3, p. 1864–71, 2006b.

TAN, N. S. et al. The Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor / Potentiates Cell Chemotactism, Polarization, and Migration. **Molecular and Cellular Biology**, v. 27, n. 20, p. 7161–7175, 2007.

TAUCHI-SATO, K. et al. The surface of lipid droplets is a phospholipid monolayer with a unique fatty acid composition. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507–44512, 2002.

TOLEDO, D. A. M.; D'AVILA, H.; MELO, R. C. N. Host lipid bodies as platforms for intracellular survival of protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–6, 2016.

TONBY, K. et al. The COX- inhibitor indomethacin reduces Th1 effector and T regulatory cells in vitro in Mycobacterium tuberculosis infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2016.

TRIGGIANI, M. et al. Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool. **Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1181–1190, 1995.

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

VIEIRA-DE-ABREU, A. et al. Cross-talk between macrophage migration inhibitory factor and eotaxin in allergic eosinophil activation forms leukotriene C4-synthesizing lipid bodies. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 44,

n. 4, p. 509–516, 2011.

WALTHER, T. C.; CHUNG, J.; FARESE JR, R. V. Lipid droplet biogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 33, n. 14, p. 1–14, 2017.

WAN, M. et al. Prostaglandin E2 suppresses hCAP18/LL-37 expression in human macrophages via EP2/EP4: Implications for treatment of Mycobacterium tuberculosis infection. **FASEB Journal**, v. 32, n. 5, p. 2827–2840, 2018.

WANG, T.-T. et al. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 5, p. 2909–2912, 2004.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H. F. Where is the vitamin D receptor? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 523, n. 1, p. 123–133, 2012.

WERNECK-BARROSO, E. et al. Distinct ability to accumulate eosinophils during the inflammatory cellular response to M. bovis BCG in the mouse pleural cavity. **Inflammation Research**, v. 49, n. 5, p. 206–213, 2000.

YAMSHCHIKOV, A. et al. Vitamin D status and antimicrobial peptide cathelicidin (LL-37) concentrations in patients with active pulmonary tuberculosis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, n. 3, p. 603–611, 2010.

YUK, J. M. et al. Vitamin D3 Induces Autophagy in Human Monocytes/Macrophages via Cathelicidin. **Cell Host and Microbe**, v. 6, n. 3, p. 231–243, 2009.

ZASLOFF, M. Fighting infections with vitamin D. **Nature Medicine**, v. 12, n. 4, p. 388–390, 2006.

ZHANG, H. et al. Impact of community-based DOT on tuberculosis treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–19, 2016.

ZWERLING, A. et al. The BCG World Atlas: A Database of Global BCG Vaccination Policies and Practices. **PLoS Medicine**, v. 8, n. 3, p. e1001012, 2011.