

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ALEXANDRE SILVA CHAVES**

**EFEITO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ESAT6:CFP10 E DO ANTÍGENO  
RECOMBINANTE Rv1733 NA MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  
TNF- $\alpha$  E EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES EM CÉLULAS  
RAW264.7**

Juiz de Fora

2014

<b>UFJF</b>	<b>ALEXANDRE SILVA CHAVES</b> <b>EFEITO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ESAT6:CFP10 E DO ANTÍGENO RECOMBINANTE Rv1733 NA PRODUÇÃO DE TNF-<math>\alpha</math> E EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES EM CÉLULAS RAW264.7</b>	<b>2014</b>
-------------	--	-------------

**ALEXANDRE SILVA CHAVES**

**EFEITO DA PROTEÍNA DE FUSÃO ESAT6:CFP10 E DO ANTÍGENO  
RECOMBINANTE Rv1733 NA MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE  
TNF- $\alpha$  E EXPRESSÃO DE SEUS RECEPTORES EM CÉLULAS  
RAW264.7**

Dissertação de mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Área: Imunologia, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias

ORIENTADOR: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira

Juiz de Fora

2014

Chaves, Alexandre Silva.

Efeito da proteína de fusão ESAT6:CFP10 e do antígeno recombinante Rv1733 na modulação da produção de TNF-a e expressão de seus receptores em células RAW264.7 / Alexandre Silva Chaves. -- 2014.

93 p. : il.

Orientador: Henrique Couto Teixeira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2014.

1. Imunologia. 2. Tuberculose. 3. Macrófagos. 4. TNF-a. 5. Receptores de TNF-a. I. Teixeira, Henrique Couto, orient. II. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo por mais esta oportunidade de evoluir e aparar as arestas...

A meus pais pelo incentivo, amor e compreensão;

À UFJF

A meu orientador Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira pela oportunidade de ampliar meus conhecimentos, explorando uma área até então nova para mim, a imunologia. Não esquecendo toda a experiência na área de ensino que me foi concedida;

À minha co-orientadora não-oficial, Michele, que sempre me ajudou no desenvolvimento do projeto e análise das possibilidades,

Ao meu primeiro orientador, Prof. Raúl Marcel Gonzalez Garcia por ter aberto as portas da pesquisa para mim em seu laboratório de Biologia Celular;

Aos meus parceiros de grupo de pesquisa, Ana Márcia, Bárbara, Tayná, e mais recentemente Carol por conseguirem conviver pacificamente comigo nesses pouco mais de dois anos de trabalho...

Ao Caio e Sandra por sempre estarem dispostos a tirar minhas dúvidas;

E todos os outros membros da equipe do Imunocet: Érick, Luan, Alyria, Ana Cláudia, Fernanda, Flávia, Alessa, Leandra, Patrícia Elkiki, Leidiana... e mais um monte de gente que não vou lembrar o nome!

Aos meus parceiros de longa e não tão longa data assim... Gabriel, Arthur, Tat, Larissa, Thaís, Lucas Monteiro, Thales Pereira, Sandra Neves e Juarez... e também para aqueles que, também, não vou lembrar o nome!

## RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa cujo principal agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Macrófagos constituem a primeira linha de defesa contra a tuberculose, bem como o habitat preferencial para o Mtb. Antígenos específicos do Mtb tais como ESAT-6, CFP-10 e Rv1733 podem modular a produção de citocinas, influenciando o curso da infecção. Macrófagos infectados liberam uma grande quantidade de citocinas incluindo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ). As ações do TNF- $\alpha$  são iniciadas por seus dois receptores de membrana, mTNF-R1 e mTNF-R2, os quais podem sofrer clivagem proteolítica, resultando nas formas solúveis sTNF-R1 e sTNF-R2, respectivamente. No presente estudo, macrófagos RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram estimulados com a proteína de fusão ESAT6:CFP10 ou com o antígeno recombinante DosR, Rv1733, na concentração de 5 $\mu$ g/mL por 24 e 48 horas e a produção de TNF- $\alpha$ , bem como a expressão dos mTNF-Rs e concentração dos sTNF-Rs foram investigadas. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-10, sTNF-R1 e sTNF-R2 foram avaliados por ELISA, enquanto que os níveis de óxido nítrico (NO) foram analisados pela reação de Griess. A determinação da viabilidade celular foi realizada pelo ensaio de MTT. Níveis de mTNF-R1 e mTNF-R2 foram analisados por citometria de fluxo e a expressão de iNOS e Arg-1 determinada por imunocitoquímica. Os resultados mostraram que ambos os antígenos induziram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) sem afetar os níveis de NO, IL-10, iNOS e Arg-1. A expressão elevada de mTNF-R1 ( $p < 0,05$ ) em células RAW264.7 foi observada para ambos os antígenos após 24 horas de cultura, mas apenas o Rv1733 foi capaz de diminuir os níveis de sTNF-R1 ( $p < 0,05$ ) nos sobrenadantes de cultura. A expressão de mTNF-R2 e a detecção de sTNF-R2 ( $p < 0,05$ ) foi maior após estimulação com Rv1733, em 24 e 48 horas de cultura. Esses resultados sugerem que a proteína de fusão ESAT6:CFP10 e o antígeno DosR, Rv1733, modulam diferentemente a produção de TNF- $\alpha$  e a expressão de seus receptores em macrófagos, o que influenciar na suscetibilidade à infecção.

**Palavras-chave:** Tuberculose. Macrófagos. ESAT6:CFP10. Rv1733. TNF- $\alpha$ . Receptores de TNF.

## ABSTRACT

Tuberculosis is a severe infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Macrophages provide a first line of defense against tuberculosis and major habitat for Mtb. Specific Mtb antigens, such as ESAT-6, CFP-10 and Rv1733, may modulate the production of cytokines, influencing the course of infection. Infected macrophages release a range of cytokines including tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  actions are triggered by its two membrane receptors, mTNF-R1 and mTNF-R2, which may undergo a shedding process, resulting in the soluble form sTNF-R1 and sTNF-R2, respectively. In the present study, RAW264.7 macrophages ( $2 \times 10^5$ /mL) were stimulated with the fusion protein ESAT6:CFP10 or the recombinant DosR antigen Rv1733 at  $5\mu\text{g}/\text{mL}$  for 24 and 48 hours and the production of TNF- $\alpha$  and expression membrane and soluble TNFRs were investigated. Culture supernatants were collected and levels of TNF- $\alpha$ , IL-10, sTNF-R1 and sTNF-R2 evaluated by ELISA, while levels of nitric oxide (NO) were assessed by the Griess reaction. To determine cell viability the MTT assay was used. Levels of mTNF-R1 and mTNF-R2 were analysed by flow cytometry and the expression of iNOS and Arg-1 were determined by immunocytochemistry. The results show that both antigens induced an increase in TNF- $\alpha$  production ( $p < 0.05$ ) without affecting levels of NO, IL-10, iNOS and Arg-1. Elevated expression of mTNFR1 ( $p < 0.05$ ) in RAW264.7 cells was observed for both antigens after 24h of culture, but only Rv1733 decreased sTNF-R1 ( $p < 0.05$ ) in culture supernatants. Expression of mTNF-R2 and detection of sTNF-R2 ( $p < 0.05$ ) was enhanced by Rv1733 after 24h and 48h of culture. These results suggest that the fusion protein ESAT6:CFP10 and the DosR antigen Rv1733 differentially modulate the production of TNF- $\alpha$  and the expression of its receptors on macrophages, which may affect the susceptibility to infection.

**Key words:** Tuberculosis. Macrophages. ESAT6:CFP10. Rv1733. TNF- $\alpha$ . TNF receptors.

## ÍNDICE DE ABREVIÇÕES

**CFP-10:** Filtrado proteico de cultura de 10kDa (do inglês “Culture filtrate protein-10kDa)

**COAP:** Contrato Organizativo de Ação Pública de Saúde

**DosR:** regulador de sobrevivência na dormência (do inglês “Dormancy survival regulator)

**ESAT-6:** Alvo antigênico secretado primariamente de 6kDa (do inglês “early secreted antigenic target-6kDa)

**HIV:** Síndrome da imunodeficiência humana adquirida (do inglês “acquired immunodeficiency syndrome)

**IL:** interleucina (do inglês “interleukin”)

**IFN:** Interferon

**iNOS:** Óxido nítrico sintase induzível (do inglês “inducible nitric oxide synthase”)

**LPS:** Lipopolissacarídeo

**MAPK:** Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês “Mitogen-activated protein kinase”)

**MBTC:** Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (do inglês “*Mycobacterium tuberculosis* Complex)

**MDR:** multi-droga resistente (do inglês “multi-drug resistant”)

**NFκB:** Fator nuclear kappa B (do inglês “nuclear factor kappa B”)

**NEMO:** Modificador essencial de NF-κB (do inglês “NF-κB essential modifier”)

**PAHO:** Organização Pan-americana da Saúde (do inglês “Pan American Health Organization”)

**PBMC:** Células mononucleares do sangue periférico (do inglês “peripheral blood mononuclear cells”)



**PMA:** Miristado de acetato de forbol (do inglês “Phobol myristate acetate”)

**PMB:** Polimixina B (do inglês “Polymixyn B”)

**RD:** Região de diferença (do inglês “Region of difference”)

**ROS:** Espécies reativas de oxigênio (do inglês “Reactive oxygen species”)

**SINAN:** Sistema Nacional de Agravos de Notificação

**SODD:** silenciador dos domínios da morte (do inglês “Silencer of death domains”)

**TACE:** Enzima conversora de TNF (do inglês “TNF-converting enzyme”)

**Th:** T auxiliar (do inglês “T helper”)

**TLR:** Receptor semelhante a Toll (do inglês “Toll-like receptor”)

**TNF:** Fator de necrose tumoral (do inglês “tumor necrosis factor”)

**TNF-R:** Receptor do fator de necrose tumoral (do inglês “tumor necrosis factor receptor”)

**TRADD:** Domínio da morte associado ao receptor de TNF (do inglês “TNF receptor associated death domain”)

**TRAF:** Fator associado ao receptor de TNF (do inglês “TNF receptor associated factor”)

**WHO:** Organização Mundial da Saúde (do inglês “World Health Organization”)

**XDR:** extensivamente resistente à droga (do inglês “extended-drug resistant”)

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> - Vias de sinalização dos receptores TNF-R1 e TNF-R2.....	19
<b>FIGURA 2</b> - Teste de citotoxicidade .....	39
<b>FIGURA 3</b> – Análise da produção de NO .....	39
<b>FIGURA 4</b> – Imunocitoquímica para detecção de iNOS e Arg-1 .....	40
<b>FIGURA 5</b> – Dosagem de TNF- $\alpha$ .....	41
<b>FIGURA 6</b> - Teste com polimixina B .....	42
<b>FIGURA 7</b> – Dosagem de IL-10 .....	43
<b>FIGURA 8</b> – Análise da expressão dos receptores mTNF-R1 e mTNF-R2 .....	44
<b>FIGURA 9</b> – Concentração dos receptores sTNF-R1 e sTNF-R2 .....	48

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1	EPIDEMIOLOGIA .....	1
1.2	COMPLEXO <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	2
1.3	ASPECTOS DA IMUNIDADE CONTRA O <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	3
1.3.1	Transmissão e microambiente .....	3
1.3.2	Reconhecimento imunológico do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	5
1.3.3	O macrófago e sua interação inicial com o <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	6
1.3.4	Da apoptose de macrófagos ao início da resposta adaptativa .....	8
1.3.5	Aspectos básicos da estrutura do granuloma.....	12
1.4	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA .....	13
1.4.1	Aspectos gerais .....	13
1.4.2	Receptores de TNF- $\alpha$ .....	14
1.4.3	TNF-R1 e sobrevivência celular .....	15
1.4.4	TNF-R1 e morte celular .....	17
1.4.5	TNF-R2 – vias gerais de ativação .....	18
1.4.6	Clivagem proteolítica da porção extracelular dos receptores de TNF- $\alpha$ .....	20
1.5	INTERLEUCINA 10 .....	22
1.5.1	Aspectos gerais.....	22
1.5.2	A IL-10 e seus receptores .....	23
1.5.3	Principais elementos das vias anti-inflamatórias da IL-10.....	24
1.6	LOCUS RD1.....	26
1.6.1	Esat6:cfp10 .....	27
1.6.2	O papel do locus RD1 no diagnóstico da tuberculose .....	28
1.7	RÉGULON DOSR .....	29
1.8	Regulon DosR e a resposta imunológica .....	33

2	<b>OBJETIVOS</b> .....	35
2.1	OBJETIVO GERAL.....	35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	35
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	36
3.1	CÉLULAS RAW264.7.....	36
3.2	ANTÍGENOS ESTUDADOS .....	36
3.2.1	Teste da Polimixina B.....	36
3.3	ANÁLISE DA CITOTOXIDADE DOS ANTÍGENOS – MTT .....	37
3.4	ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE NO .....	37
3.5	IMUNOCITOQUÍMICA.....	38
3.6	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TNFR1 E TNFR2.....	38
3.7	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RECEPTORES SOLÚVEIS DE TNF (STNFR1 E STNFR2) NO SOBRENADANTE DE CULTURA .....	39
3.8	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	40
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
4	<b>RESULTADOS</b> .....	41
4.1	CITOTOXICIDADE .....	41
4.2	PRODUÇÃO DE NO .....	42
4.3	DETECÇÃO DE INOS E ARGINASE-1.....	43
4.4	DOSAGEM DE TNF-A.....	44
4.5	DOSAGEM DE IL-10 .....	46
4.6	AVALIAÇÕES DOS RECEPTORES DE TNF- $\alpha$ NAS CÉLULAS RAW264.7 ..	46
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	50
5.1	PRODUÇÃO DE TNF-A .....	51
5.2	PRODUÇÃO DE IL-10.....	54
5.3	RECEPTORES DE TNF- $\alpha$ .....	55
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	58

REFERÊNCIAS.....	60
------------------	----

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPIDEMIOLOGIA

A tuberculose, uma doença infecciosa que tem como o principal agente etiológico o *Mycobacterium tuberculosis*, ainda permanece como um sério problema global de saúde pública. Milhões de pessoas são infectadas a cada ano, levando a patologia ao posto de segunda maior causa de morte por doença infecciosa no mundo, atrás apenas da Síndrome da Imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2013).

A despeito da disponibilidade de tratamento, as últimas estimativas apontam que no ano de 2012, cerca de 8,6 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes por tuberculose foram registradas (WHO, 2013). A emergência de cepas multidroga resistente (MDRs) e extensivamente-resistente ao tratamento quimioterápico (XRDs) contribue para o agravamento da situação, dificultando o controle da doença ou mesmo impossibilitando-o (WHO, 2013). Na região das Américas, no ano de 2010, foram estimados 267.000 novos casos de tuberculose, equivalentes a 29 casos por cada 100.00 habitantes, sendo que 69% de toda a estimativa diz respeito apenas à América do Sul, 14% ao Caribe, 12% ao México e América Central e 5,5% à América do Norte (PAHO, 2010).

No Brasil, segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), foram notificados 70047 novos casos no ano de 2012, equivalente a uma incidência de 36,1 casos a cada 10000 habitantes, levando ao país à posição de 17º no mundo em relação ao número de casos e 111ª em relação à incidência (BRASIL, 2013). Considerada como prioridade pelo Governo Federal desde 2003, a tuberculose tem sido contemplada nas principais compactuações nacionais, principalmente através do Contrato Organizativo de Ação Pública de Saúde (COAP). Mesmo havendo melhora nos indicadores de proporção de cura para os novos casos de tuberculose bacilífera e proporção de casos novos de tuberculose testados para o HIV, o Brasil ainda não conseguiu alcançar a meta estipulada pela Organização Mundial da Saúde, que é curar 85% dos casos novos bacilíferos (BRASIL, 2013).

## 1.2 COMPLEXO *Mycobacterium tuberculosis*

Os membros do gênero *Mycobacterium* são caracterizados por um envelope celular altamente complexo, que confere ao microrganismo uma baixa permeabilidade, bem como sua característica morfotintorial diferenciada, a qual é presente em todos os seus membros. Ambas as características são devidas à presença de ácidos graxos de cadeias longas  $\alpha$ -alquil,  $\beta$ -hidroxil em sua parede celular (FORRELAND *et al.*, 2013).

A identificação dos isolados do complexo *M. tuberculosis* (MBTC) é rotineiramente realizada através da análise de características fenotípicas e bioquímicas bacterianas após a cultura inicial. Contudo, sendo um processo moroso e subjetivo, vários métodos moleculares foram desenvolvidos para a realização desta identificação (BOUAKAZE *et al.*, 2010). O MBTC refere-se a um grupo de espécies (*M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* e *M. pinnipedii*) que são geneticamente similares, compartilhando sequências de rRNA 16S (16 Svedberg), além de possuírem cerca de 99% de identidade entre si (SREEVATSAN *et al.*, 1997; FORRELAND *et al.*, 2013). Além disso, é sugerido que os membros do MBTC evoluíram a partir de um ancestral comum via sucessivas deleções e inserções de DNA, resultando na atual especiação e diferenças de patogenicidade (ARANAZ *et al.*, 2003). Por outro lado, a genotipagem dos isolados do *M. tuberculosis* é útil como método de verificação de questões evolucionárias, bem como pesquisas envolvendo a dinâmica de transmissão do patógeno e possível identificação de novos surtos (BOUAKAZE *et al.*, 2010).

Embora seja convencionalmente estabelecido que tanto o *M. tuberculosis* quanto o *M. africanum* sejam isolados a partir de humanos, *M. microti* de roedores e *M. bovis* predominantemente de bovinos, há evidências de organismos pertencentes ao MBTC presentes em uma variedade de outros hospedeiros, o que impõe um desafio à sua classificação. O *M. bovis* é considerado como o de maior variedade de hospedeiros dentro do complexo, causando doença em um grande espectro de animais, porém, raramente em humanos devido à prática da pasteurização (O'REILLY; DABORN, 1995). Muito embora nas áreas onde a tuberculose seja endêmica, a exata proporção de doença em humanos causada por *M. bovis* é desconhecida (AYELE *et al.*, 2004). Neste ponto, uma relação importante a ser

realizada é a diferenciação entre a doença causada por *M. tuberculosis* e *M. bovis*, já que o último é naturalmente resistente à droga antituberculínica pirazinamida (SCORPIO; ZHANG, 1996).

### 1.3 ASPECTOS DA IMUNIDADE CONTRA O *Mycobacterium tuberculosis*

#### 1.3.1 Transmissão e microambiente

A patogênese da tuberculose é levada a cabo por uma complexa rede de inter-relações entre o sistema imunológico do hospedeiro e as estratégias de sobrevivência da bactéria. A doença tipicamente afeta os pulmões, gerando a forma pulmonar, o que não exclui a possibilidade de afetar outros sítios corporais, estabelecendo a denominada tuberculose extra-pulmonar (WHO, 2013).

O *M. tuberculosis* é um patógeno transmitido por via aérea, sua infecção na maioria dos casos é iniciada a partir da inalação de partículas aerossolizadas contendo micobactérias, originadas de pessoas portadoras da forma pulmonar ativa da doença (WHO, 2013). A transmissão aerogênica da micobactéria se apoia em fatores múltiplos, incluindo intensidade de contato, dependente da duração da exposição e distância dentro do espaço de ar compartilhado; carga micobacteriana nas secreções respiratórias do portador da doença; e do status imunológico tanto do portador, quanto do receptor, além da variação interespecífica do *M. tuberculosis*. Em casos raros, também pode ocorrer infecção através do contato com animais doentes, ou exposição ao aerossol gerado em laboratório (SCHWANDER; DHEDA, 2011).

Após a inalação das partículas contendo o *M. tuberculosis*, este entrará em contato com um compartimento imunológico de características únicas, representado pelo trato respiratório e os espaços bronco-alveolares, onde interações específicas entre tecidos e células dão forma à primeira linha de defesa contra o patógeno. Tais interações são interligadas com o ciclo de vida micobacteriano, incluindo o espectro da infecção e o impacto resultante sobre os métodos de diagnóstico disponíveis (BARRY III *et al.*, 2009; DHEDA *et al.*, 2010). É convencionalmente que as primeiras células a fazerem contato com a micobactéria em ambiente pulmonar são os macrófagos alveolares e células dendríticas intra-epiteliais, responsáveis por sua fagocitose, e as células epiteliais respiratórias do tipo I e tipo II (BERMUDEZ;



GOODMAN, 1996). Interações dependentes de contato entre as células do compartimento regulam e limitam os processos inflamatórios dentro do microambiente alveolar através de múltiplos mecanismos, incluindo CD200 e receptor de CD200, interleucina 10 (IL-10) e fator de transformação do crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (HOLT *et al.*, 2008).

Neste aspecto, as células componentes do tecido epitelial mucoso executa um papel de grande importância, pois produzem uma grande variedade de substâncias com ação antimicrobiana (LI *et al.*, 2012). Dentre tais substâncias, algumas possuem um papel mais pronunciado, as mucinas, secretadas em grandes quantidades pelo epitélio mucoso, participam da acomodação da flora comensal residente, limitando assim, doenças infecciosas (LINDEN *et al.*, 2008); as defensinas possuem atividade contra um grande espectro de patógenos, podendo agir no envelope celular da micobactéria, fazendo com que a sua estrutura entre em colapso, acarretando na morte do bacilo (RIVAS-SANTIAGO *et al.*, 2006); as espécies reativas de nitrogênio, tais como o óxido nítrico (NO), produzidas por macrófagos alveolares, também auxiliam na defesa do hospedeiro contra a infecção micobacteriana (GOMEZ; PRINCE, 2008). Além disso, as células mucosas epiteliais podem, também, secretar uma série de citocinas pró-inflamatórias contra o *M. tuberculosis*, podendo erradicar o microrganismo, bem como células por ele infectadas através do recrutamento e ativação dos fagócitos (PETERS; ERNST, 2003). As células mucosas epiteliais também podem produzir outros compostos importantes para o hospedeiro quando da invasão pelo *M. tuberculosis*, como por exemplo, as proteínas surfactantes A e D, as quais são produzidas por células pulmonares epiteliais e participam ativamente no processo inato através da influência sobre fagocitose dos patógenos pelas células do hospedeiro ou sua eliminação pelos mecanismos de defesa do organismo (HALL-STOODLEY; WATTS; CROWTHER, 2006). Juntamente com a família de receptores semelhantes a Toll (TLRs), as proteínas surfactantes também executam um papel chave no reconhecimento e ligação de patógenos às células epiteliais durante a infecção micobacteriana (LI; WANG; LIU, 2012).

Outro componente importante do microambiente é a imunoglobulina A (IgA) em sua forma secretada (sIgA), o anticorpo produzido em maior quantidade no tecido mucoso. A sIgA executa um papel de primeira linha de defesa contra patógenos nas áreas de mucosas através de seu potencial aglutinante, facilitando a eliminação de

patógenos locais, juntamente com os movimentos peristálticos e mucociliares (MESTECKY; RUSSEL; ELSON, 1999). Em estudo realizado por Brown et al. (2003), verificou-se que a vacinação por *M. bovis* BCG em humanos poderia induzir aumentos nas quantidades de sIgA, o que foi atestado por um estudo no qual camundongos vacinados com o uma vacina de DNA contendo Ag85A-ESAT6-IL-21, demonstraram um aumento nos níveis de sIgA no lavado broncoalveolar (TEN BERGE *et al.*, 2012). Além disso, um estudo utilizando camundongos mostrou que o *M. tuberculosis* teve sua entrada nos pulmões bloqueada pela sIgA (TJÄRNLUND *et al.*, 2006).

### 1.3.2 Reconhecimento imunológico do *Mycobacterium tuberculosis*

Tanto o *M. tuberculosis* quanto seus componentes são reconhecidos pelos receptores presentes na superfície celular do hospedeiro, incluindo receptores TLRs, receptores semelhantes a domínios de oligomerização de ligação de nucleotídeos (NLRs), e lectinas do tipo C, tais como receptores de manose (CD207); molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular e específica das células dendríticas (DC-SIGN) e detectina-1 (JO, 2008; HARDING; BOOM, 2010). Os receptores responsáveis pelo reconhecimento micobacteriano são expressos nas células do sistema imunológico, como granulócitos e linfócitos. Estão presentes também em células não pertencentes ao sistema imunológico, como hepatócitos e células epiteliais intestinais. Dentre os receptores de interesse, os TLRs, especialmente os TLR-2 e TLR-4, são particularmente importantes, pois iniciam as cascatas de sinalização intracelular que culmina em uma resposta pró-inflamatória, a princípio benéfica para o hospedeiro, contudo, a bactéria também desenvolveu ao longo de sua evolução, estratégias que levam à modulação da resposta imune inata (JO, 2008; HARDING; BOOM, 2010).

Dos componentes da parede celular micobacteriana, os mais importantes a interagir com os TLRs e outros receptores, são as lipoproteínas de 19 e 27kDa, glicoproteína de 38kDa, lipomanana (LM) e o lipoarabinomanana recoberta por manose (ManLAM) (NOSS *et al.*, 2001; EUN-KYONG *et al.*, 2007). As interações dos ligantes da micobactéria com os TLRs eventualmente resultam na ativação do fator nuclear de transcrição  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-1, IL-12, quimiocinas e NO através de uma via dependente ou não da proteína primária de diferenciação da resposta

mielóide 88 (MyD88) (YAMAMOTO *et al.*, 2003; XU *et al.*, 2007). Contudo, a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios pode levar à lesão tecidual, e por isso, o hospedeiro dispõe de mecanismos com os quais possa realizar o “*feedback*” negativo da resposta imunológica, tais como o receptor da família das tirosina-quinases denominado Tyro3/Axl/Mer (TAM), que participa regulando a resposta dos TLR2 e TLR4 (XU *et al.*, 2007). Tal propriedade de imunorregulação é amplamente explorada pelo *M. tuberculosis*. Um exemplo é a lipoproteína de 19kDa, que é um agonista TLR2 (NOSS *et al.*, 2001), que após um prolongado período de exposição ao ligante, e conseqüentemente de sinalização dá início à inibição da expressão do complexo maior de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e à capacidade de processamento de antígenos pelos macrófagos (PAI *et al.*, 2004). Com isso, o grupo de macrófagos nos quais a apresentação de antígenos encontra-se diminuída, torna-se inapto à apresentação de antígenos presentes no *M. tuberculosis* para as células T CD4<sup>+</sup>, resultando em ativação insuficiente das células efetoras, e conseqüente evasão do sistema imunológico, criando nichos onde a bactéria sobrevive e persiste (NOSS *et al.*, 2001; JO, 2008). Interessantemente, a molécula de ManLAM está associada à resposta antiinflamatória, já que sua interação com o receptor de manose inibe a produção de IL-12 através desta via, além de exercer efeitos sobre a maturação dos fagolisossomos limitando o processo de fusão fagolisossomal (NIGOU *et al.*, 2001; KANG *et al.*, 2005).

### 1.3.3 O macrófago e sua interação inicial com o *Mycobacterium tuberculosis*

O *M. tuberculosis*, bem como outras micobactérias patogênicas como o *M. bovis* e *M. avium*, são patógenos intracelulares facultativos, os quais sobrevivem, proliferam-se e persistem no interior dos macrófagos. Enquanto esta estratégia de sobrevivência demonstra-se não menos do que essencial para a patogênese micobacteriana, também representa uma característica potencialmente utilizável para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas (AXELROD *et al.*, 2008).

Em termos de imunidade inata, os macrófagos executam um papel chave, pois possuem a habilidade de fagocitar e eliminar bactérias, sendo que no contexto pulmonar, os macrófagos alveolares são os primeiros tipos celulares a reconhecerem o *M. tuberculosis*, constituindo, assim, a primeira linha de defesa contra a micobactéria (APPELBERG; ORME, 1993). Com a bactéria no interior dos fagossomos, duas

possibilidades podem surgir: a destruição da micobactéria através de um mecanismo dependente da produção de espécies reativas de nitrogênio (RNI) (DENIS, 1991), ou a sobrevivência e crescimento do patógeno no interior dos macrófagos através de seus mecanismos de subversão imunológica (ROOK *et al.*, 1986; LOEUILLET *et al.*, 2006). Como descrito anteriormente, vários receptores estão envolvidos no processo de reconhecimento e internalização da micobactéria, cada um relacionando-se a uma característica específica da complexa parede celular das micobactérias (BRENNAN; NIKAIDO, 1995).

Após o processo de fagocitose micobacteriana, tem-se convencionado que as vesículas fagossômicas contendo o patógeno sofrem processo de maturação. Inicialmente os fagossomos ainda detêm características endossomais, possuindo marcadores como a GTPase Rab5, transferrina, receptor de transferrina e pH não menos do que 6,5; devido à ausência da bomba de prótons com atividade ATPase (v-ATPase) (RUSSELL, 2005). O término do processo de maturação dá-se após uma complexa série de eventos de fusão e fissão de vesículas endocíticas, culminando no chamado fagolisossomo (VIEIRA; BOTELHO; GRINSTEIN, 2002). Com isso, tem-se o ambiente necessário para o recrutamento da v-ATPase, que permitirá a diminuição do pH vesicular, favorecendo então, a atividade das enzimas hidrolases ácidas, aumentando sua eficiência na atividade microbicida (CHAN *et al.*, 1992; YATES; HERMETTER; RUSSEL, 2005).

Como parte de sua evolução como patógeno, o *M. tuberculosis* aperfeiçoou diversas estratégias para evitar a destruição pelas enzimas fagolisossomais, através do mecanismo de sequestro de maturação dos fagossomos nos quais está contido, como a exclusão do sistema v-ATPase (STURGILL-KOSZYCKI *et al.*, 1994), modulação das vias de sinalização do Ca<sup>2+</sup> (KUSNER, 2005), e inibição da fusão das vesículas através de um mecanismo dependente da fosfatase lipídica SapM, que participa do processo clivando moléculas de fosfatidilinositol 3-fosfato na membrana fagossomal (VEGNE *et al.*, 2005). Componentes da parede celular micobacteriana como o ManLAM, podem afetar a maturação fagossômica através de sua interação com mecanismos de ancoragem vesicular, fusão e transporte nas células de mamíferos promovendo assim, a persistência bacteriana no interior do macrófago, tendo como alvos principais moléculas como GTPases da família Rab (KUSNER, 2005).

Como descrito anteriormente, um importante mecanismo de defesa antimicobacteriano utilizado pelos macrófagos envolve a geração de NO e outras RNIs, que são altamente tóxicas para o bacilo. Citocinas derivadas de células T, especialmente o IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  agem promovendo a ativação dos macrófagos, os quais passam a produzir NO e outras espécies de radicais livres através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (SCANGA *et al.*, 2001). A ativação dos macrófagos dentro de um contexto pró-inflamatório é denominada ativação clássica, onde enquadra-se o fenótipo de macrófagos M1 (KAHNERT *et al.*, 2006). A inibição da atividade da iNOS ou interferência direta sobre o gene da enzima, não apenas abole o efeito protetor das RNIs, mas também leva à reativação da doença, como demonstrado em modelos murinos de infecção (SCANGA *et al.*, 2001). Neste ponto, demonstrou-se que o *M. tuberculosis* possui a habilidade de inibir o recrutamento da enzima iNOS, que originalmente encontra-se no citoplasma, não permitindo sua fusão com os fagolisossomos (MILLER *et al.*, 2004). Tal característica é compatível com o fenótipo dos macrófagos alternativamente ativados, pertencentes ao perfil M2, sendo a enzima Arginase-1 um marcador característico (KAHNERT *et al.*, 2006). Além deste mecanismo, a região RD1, descrita em maiores detalhes posteriormente, possui uma função de extrema importância, o colapso das membranas fagossômicas através da ação de seus componentes secretados, permitindo assim, a saída do *M. tuberculosis* para o citoplasma do macrófago (DE JONGE *et al.*, 2007).

#### **1.3.4 Da apoptose de macrófagos ao início da resposta adaptativa**

A morte celular de macrófagos infectados por *M. tuberculosis* via apoptose é reconhecidamente uma estratégia do hospedeiro para limitar o crescimento micobacteriano, privando-o dos nichos intracelulares requeridos para a replicação (BUTLER *et al.*, 2012).

A molécula considerada como a principal iniciadora do processo apoptótico em macrófagos infectados pela micobactéria é o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (KEANE *et al.*, 1997). Nas seções posteriores será discutido em detalhes o papel desta molécula tanto nos papéis de apoptose quanto de sobrevivência celular. Em termos gerais, quando ocorre a ligação do TNF- $\alpha$  ao receptor TNF-R1, há o recrutamento de moléculas associadas ao domínio da morte, culminando com o recrutamento das pró-

caspases 8 e 10, culminando na ativação da caspase-3, ocorrendo então, a morte celular via apoptose (WARE; VANASRDAL; VANARSDALE, 1996).

O conceito de que a apoptose de fato exerce uma resposta direta sobre a micobactéria foi comprovada em experimentos nos quais se demonstrou que a viabilidade de muitas cepas micobacterianas indutoras de apoptose como *M. bovis* BCG, *M. kansasii* e *M. tuberculosis* H37Ra foi reduzida conforme se dava a morte dos macrófagos do hospedeiro (KEANE *et al.*, 2000). Tal fato contrastaram com os resultados gerados por cepas virulentas de *M. tuberculosis*, as quais provocaram pouca ou nenhuma apoptose de macrófagos, demonstrando crescimento intracelular em cultura (RIENDEAU; KORNFELD, 2003). Em experimento realizado por Fratazzi *et al.* (1997), no qual utilizou-se cepas virulentas de *M. avium*, verificou-se que a perda de viabilidade apenas se concretizou quando da adição de macrófagos “naïve” à cultura de macrófagos infectada. Tal fato tornou-se ainda mais marcante quando a cultura inicial já estava sofrendo processo de necrose secundária, o que comprovou o processo como sendo dependente de contato, ou seja, haveria a necessidade de fagocitose dos corpúsculos apoptóticos para que a viabilidade bacteriana decaísse. Neste ponto, a participação dos corpúsculos apoptóticos é imprescindível, pois tais vesículas envolvem as proteínas micobacterianas bem como lipídeos de sua parede celular enquanto o processo de morte celular está em progresso. A lipoproteína micobacteriana de 19kDa representa um exemplo de conteúdo predominante nestas vesículas, podendo ativar receptores do tipo TLR2, além de conter epítomos para linfócitos TCD8<sup>+</sup> (HERMANN *et al.*, 1996; LOPEZ *et al.*, 2003).

Tanto macrófagos quanto células dendríticas possuem papéis proeminentes no processo de fagocitose e processamento de corpúsculos apoptóticos derivados de células vizinhas, e ambos os tipos celulares estão intimamente relacionados no processo de ativação de células T antígeno específicas (WINAU; KAUFMANN; SCHAIBLE, 2004). Diversos receptores que reconhecem estruturas das membranas apoptóticas foram identificados na superfície dos fagócitos, dentre eles os receptores para fosfatidilserina, receptores do tipo *scavenger*, e integrinas  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$  e CD14 (HENSON *et al.*, 2001). Outra função que cabe a estes receptores é a de transmitir sinais silenciadores em direção ao fagócito, de modo que haja supressão da resposta inflamatória através da secreção de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10, evitando assim, uma potencial auto-reatividade (HENSON *et al.*, 2001). Contudo, um quadro diferente

ocorre quando os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) contidos no material apoptótico entram em contato com TLR (TAKEDA *et al.*, 2003). Deste modo, tem-se a indução de citocinas polarizadoras de células T como IL-12, IL-18, produção de quimiocinas e maturação e migração de células dendríticas em direção aos linfonodos (MAZZONI; SEGAL, 2003). Estas, após o contato com os antígenos micobacterianos e estimulação adicional através dos TLRs, expressam alta densidade de moléculas de MHCI, MHCII e CD1, bem como moléculas co-estimulatórias CD40, CD54, CD80 e CD86 (SHORTMAN; LIU 2002), favorecendo a ativação de LT.

Após a migração das células dendríticas em direção aos linfonodos e subsequente apresentação de antígenos para os linfócitos T, temos a atuação efetiva da imunidade adaptativa no processo de controle da infecção micobacteriana. As células TCD4 desempenham diversas funções no controle da infecção e na formação e manutenção dos granulomas, além de possuir a capacidade de induzir a apoptose em macrófagos infectados através da via de contato Fas-Fas ligante. Diversos subtipos de células TCD4<sup>+</sup> são importantes na imunidade contra o *M. tuberculosis*, sendo as Th1 as melhor caracterizadas, as quais dependem da citocina IL-12 e do fator transcricional *t-bet* para seu desenvolvimento e manutenção (GALLEGOS; PAMER; GLICKMAN, 2008). A citocina padrão, secretada por este subtipo é o IFN- $\gamma$ , embora tais células também possam secretar TNF- $\alpha$ , IL-2, linfotoxina e certas quimiocinas da família CCL. Além do papel de potencializar a atividade antimicrobiana dos macrófagos, o IFN- $\gamma$  faz com que o macrófago aumente a expressão de MHCII, agindo também, sobre células não hematopoiéticas, de modo que haja a regulação da inflamação causada por IL-17 nos sítios de infecção (DESVIGNES; ERNST, 2009). A depleção de células TCD4<sup>+</sup> está associada à reativação da infecção, como comprovado em modelos murinos de infecção crônica, mesmo que os níveis de IFN- $\gamma$  ainda estivessem elevados devido à resposta das células TCD8<sup>+</sup>, e os níveis de iNOS encontrassem-se em normalidade (SCANGA *et al.*, 2000). Evidências substanciais indicam que o *M. tuberculosis* possui diversos mecanismos para a inibição da apresentação de antígenos via MCH II para as células TCD4<sup>+</sup>, incluindo a diminuição da expressão gênica na bactéria, inibição da expressão de MHC II induzida por IFN (HARDING; BOOM, 2010). Outros subtipos de células TCD4<sup>+</sup>, tais como as células Th17, ainda estão para ter seu papel melhor estabelecido no contexto da doença, porém, sabe-se que são células necessárias para a maturação da estrutura

granulomatosa, enquanto que sua citocina padrão, a IL-17, está associada a respostas inflamatórias patológicas em infecções micobacterianas (BLANCO *et al.*, 2011). Células T regulatórias (Tregs) cujo desenvolvimento é dependente de TGF- $\beta$  e do fator de transcrição FoxP3, também estão emergindo como importantes contribuintes no contexto da tuberculose, sendo encontradas em altas frequências em humanos com a doença ativa e em forma extra-pulmonar (SHARMA *et al.*, 2009).

As vias que levam à apresentação de peptídeos do *M. tuberculosis* via MHC I para os linfócitos TCD8<sup>+</sup> ainda estão em sendo debatidas. Apesar de observações iniciais de que o *M. tuberculosis* pode escapar do fagossomo (KANG *et al.*, 2005), as últimas atenções tem sido voltadas para o papel da apoptose e apresentação cruzada, nos quais células dendríticas não infectadas processam os antígenos contidos nos corpúsculos apoptóticos apresentando-os para as células TCD8<sup>+</sup> via MHC I. Estudos mais recentes em camundongos tem demonstrado que o aumento da apoptose de células infectadas pela micobactéria resultam em maior estimulação e expansão mais robusta dos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, o que leva a um maior suporte ao papel da apoptose e apresentação cruzada para a imunidade contra o *M. tuberculosis* (VAN DER WEL *et al.*, 2007). Em termos de participação no processo imunológico, em experimentos realizados em camundongos, células TCD8<sup>+</sup> participam da proteção contra a infecção rápida e progressiva pelo *M. tuberculosis*, sendo que animais deficientes neste tipo celular tendem a sucumbir à infecção de modo mais rápido do que os animais controle, porém, ainda mais vagarosamente do que aqueles que são deficientes em LT CD4<sup>+</sup> (MORGUES *et al.*, 2001). Em humanos não há evidências totalmente conclusivas de que tais células são essenciais para a resposta imunológica contra a micobactéria, embora, quando da administração de anticorpos anti-TNF em pacientes com artrite reumatoide, parte das células TCD8<sup>+</sup> são depletadas, o que predispõe à progressão da forma latente da tuberculose para a forma ativa (BRUNS *et al.*, 2009). Células TCD8<sup>+</sup> antígeno-específicas para o *M. tuberculosis* produzem citocinas como IFN- $\gamma$  após estímulo e podem lisar células apresentadoras de antígeno infectadas. Além disso, células TCD8<sup>+</sup> humanas podem também reconhecer antígenos apresentados pelas moléculas não polimórficas classe Ib HLA-E (HEINZEL *et al.*, 2002).



### 1.3.5 Aspectos básicos da estrutura do granuloma

Granulomas são as lesões histopatológicas clássicas da tuberculose, tendo como condição fundamental a construção de um agregado organizado de macrófagos, os quais exibem uma grande variedade de fenótipos, incluindo macrófagos ativados, células epitelióides, células espumosas e células gigantes multinucleadas (ADAM, 1976; PUISSEGUR *et al.*, 2007).

Estudos utilizando-se de inóculos de *M. marinum*, demonstraram que inicialmente, a bactéria replica-se livremente no interior dos macrófagos, e que muitos macrófagos não infectados são recrutados para as imediações das células inicialmente parasitadas (DAVIS *et al.*, 2002). O recrutamento de macrófagos resulta em sua agregação e organização, representando o passo inicial para o estabelecimento do granuloma. Devido à morte dos macrófagos inicialmente infectados, as micobactérias são liberadas no espaço extracelular e rapidamente são fagocitadas pela população de macrófagos recrutada, a qual a bactéria se aproveita para expandir ainda mais sua população (DAVIS; RAMAKRISHNAN, 2009). Neste ponto, um importante efeito do TNF- $\alpha$  é notado, o de restringir o crescimento da bactéria no interior dos macrófagos o que tem consequências secundárias na contenção do crescimento bacteriano. (BEKKER *et al.*, 2001)].

Embora não haja necessidade de linfócitos T para o início da formação do granuloma, linfócitos T estão presentes nas formas maduras dos granulomas encontrados em humanos e em camundongos, e suas contribuições são essenciais para a manutenção da estrutura organizacional e controle da progressão micobacteriana após a fase aguda da infecção. Em granulomas humanos, células T (60-70% LT CD4<sup>+</sup>) (RANDHAWA, 1990) podem estar tanto difusamente distribuídas entre outros tipos celulares, bem como formando grupamentos discretos de células na periferia da estrutura, e contrariando a crença geral de que granulomas são estruturas estáticas, os linfócitos T podem facilmente trafegar através do complexo formado (TSAI *et al.*, 2006). Outra célula que está presente nos granulomas são os linfócitos B (LB), embora seu papel neste contexto ainda esteja sob investigação, evidências apontam para uma função imunorreguladora (EGEN *et al.*, 2008).

Uma característica dos granulomas que está sendo foco de pesquisas recentes é o estado de oxigenação no sítio de residência da micobactéria. Embora se conheça a propriedade do *M. tuberculosis* de modificar seu metabolismo em resposta à baixa

tensão de oxigênio, trabalhos recentes identificaram respostas transcricionais específicas para o estado de hipóxia (RUSTAD *et al.*, 2008). Além disso, pesquisas adicionais utilizando sondas que formam ligações covalentes na presença de baixos níveis de oxigênio revelaram que os granulomas podem ser hipóxicos em determinadas espécies animais, mas tal característica não é derivável para outras, como camundongos (TSAI *et al.*, 2006).

## 1.4 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

### 1.4.1 Aspectos gerais

Bioquimicamente isolado em 1984, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória de ação pleiotrópica, produzida e secretada principalmente por macrófagos ativados e monócitos, bem como por linfócitos B, linfócitos T e fibroblastos, exercendo grande papel na defesa do hospedeiro e imunovigilância (IDRISS; NAISMITH, 2000; MOREIRA-TABAKA *et al.*, 2012). Mais do que qualquer outra citocina, o TNF- $\alpha$  é central para o início e orquestração da resposta inflamatória, induzindo a expressão de selectinas pelas células endoteliais, integrinas em leucócitos, e quimiocinas em diversos tipos celulares, promovendo assim a migração leucocitária para os locais de infecção (BAKER; REDDY, 1998). Algumas atividades do TNF- $\alpha$  são comuns a uma grande variedade de doenças, tais como aquelas que modulam o recrutamento, proliferação e morte celulares, além da regulação imunológica em geral (SCHOTTELIUS *et al.*, 2004). Outras atividades do TNF- $\alpha$  podem estar restritas a certas doenças, tais como degradação de matriz e osteoclastogênese na artrite reumatoide ou formação do granuloma na doença de Chron (TRACEY *et al.*, 2008).

O TNF- $\alpha$ , também é necessário para a coordenação ótima de ambos os aspectos da imunidade contra o *Mycobacterium tuberculosis*. Um exemplo seria que o TNF- $\alpha$  aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos e potencializa o processo de morte de micobactérias, particularmente em conjunto com o IFN- $\gamma$  (BEKKER *et al.*, 2001). O TNF- $\alpha$  também pode privar a micobactéria de seu habitat intracelular através da indução da apoptose de macrófagos permissivos (KEANE; REMOLD; KORNFELD, 2000). Por outro lado, o TNF- $\alpha$  estimula a produção de quimiocinas tais como CCL-2,

CCL-3, CCL-4, CCL-5 e CCL-8, bem como a expressão de moléculas de adesão celular endoteliais como CD54, levando ao acúmulo de células mononucleares (ROACH *et al.*, 2002).

Em termos moleculares, é inicialmente expresso como uma proteína transmembrana tipo II de 26 kDa (TNF ligado à membrana; mTNF), podendo sofrer clivagem proteolítica, executada pelas metaloproteinases conversoras de TNF- $\alpha$  (TACEs) entre os resíduos de alanina e valina, vindo a ser liberado como uma subunidade trimérica de 17 kDa (TNF solúvel; sTNF) nos espaços extracelulares (KORNER; SEGDWICK, 1996). Ambas as formas são biologicamente ativas, sendo a quantidade relativa de cada uma, determinada pelo estímulo indutor, tipo celulares envolvidos bem como seu status de ativação, quantidade de TACE ativa e de seus inibidores naturais, como a inibidora tecidual de metaloproteinases-3 (SMOOKLER *et al.*, 2006). A forma transmembrana exerce suas funções biológicas através do contato célula-célula, o qual é distinto do modo de ação da forma solúvel, a qual se liga em sítios distantes daqueles onde se encontram as células produtoras de TNF- $\alpha$  (PEREZ *et al.*, 1990). Além disso, o mTNF pode tanto executar o papel de ligante, através da interação com os receptores de TNF- $\alpha$ , bem como de receptor, participando de um processo denominado sinalização reversa, nas células que o expressam (EISSNER; KOLCH; SCHEURICH, 2004).

#### 1.4.2 Receptores de TNF- $\alpha$

Tanto a forma solúvel, quanto a forma ligada à membrana do TNF- $\alpha$ , necessitam da interação com um dos dois tipos distintos de receptores de TNF, o receptor de TNF tipo I (TNF-R1, p55, CD120a) e o receptor de TNF tipo II (TNF-R2, p75, CD120b), presentes em uma grande variedade de tipos celulares, para a execução de suas funções biológicas e patológicas (VANDENABEELE *et al.*, 1995). Tanto o TNF-R1, quanto o TNF-R2 contém um domínio de montagem pré-ligação com o ligante (PLAD), que não interage com o ligante em si, mas é necessário para que a sinalização ocorra, permitindo a pré-complexação dos receptores, fazendo com que os mesmos estejam em sua forma trimérica antes da ligação com o TNF- $\alpha$  (CHAN *et al.*, 2000).

Ambos os receptores fazem parte da superfamília de receptores de TNF- $\alpha$  e apresentam homologias significativas em seus domínios extracelulares, caracterizados por pseudo-repetições ricas em cisteína, enquanto que seus domínios intracelulares quase não possuem homologia entre si, caracterizando diferentes funções sinalizadoras (GRELL *et al.*, 1994). O TNF-R1 é expresso em todas as células e interage preferencialmente com o sTNF, mediando a apoptose e sinais pró-inflamatórios através de seus domínios da morte, enquanto que o TNF-R2 é expresso principalmente em células endoteliais e do sistema imunológico, especialmente em células T regulatórias CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>, exercendo papéis importantes na sobrevivência e reparação tecidual, ligando-se com maior afinidade ao mTNF, embora também, possa participar do processo apoptótico, principalmente através da interação com as vias do TNF-R1 nas células que expressam ambos os receptores (MacEWAN, 2002; CHEN *et al.*, 2007). Além disso, em termos de sinalização, foi demonstrado que em muitas linhagens celulares, somente a forma mTNF, e não a sTNF estimula a via alternativa do NF- $\kappa$ B via TNF-R2, enquanto que a forma sTNF estimula a via clássica do NF- $\kappa$ B preferencialmente pelo TNF-R1 (RAUERT *et al.*, 2010).

#### 1.4.3 TNF-R1 e sobrevivência celular

O TNF-R1 é um receptor pleiotrópico que possui a capacidade de induzir tanto respostas de ativação, quanto vias de sinalização da morte (MOQUIN; CHAN, 2010). O receptor contém um motivo de domínio da morte de aproximadamente 8 aminoácidos de comprimento em direção à porção carboxiterminal do receptor, executando papel crítico na atividade indutora da morte pelo TNF-R1 (TARTAGLIA *et al.*, 1993). Tal domínio da morte é presente em um grande número de proteínas de associação e moléculas relacionadas que estão primariamente envolvidas na morte celular (JANG *et al.*, 1999).

A partir do momento em que ocorre a ligação da molécula de TNF- $\alpha$  à porção extracelular do TNF-R1, as proteínas silenciadoras dos domínios da morte (SODD) são liberadas, permitindo que os mesmos fiquem expostos e sofram interação de outros domínios da morte, especialmente o associado ao receptor de TNF (TRADD), através de uma interação homotípica (HSU *et al.* 1995). O TRADD age como uma proteína adaptadora, promovendo a associação do complexo TNF-R1 à proteína

quinase de interação com receptor-1 (RIP-1), às proteínas celulares inibidoras de apoptose 1 e 2 (cIAP1 e cIAP2), e ao fator 2 associado ao receptor de TNF (TRAF-2). Além disso, TRADD possui grande importância para a sinalização do NF- $\kappa$ B induzida por TNF. O NF- $\kappa$ B é um fator de transcrição que na maioria dos casos, reside no citoplasma como um heterotrímero, sendo composto pelas subunidades p50, p65 e I $\kappa$ B, sendo esta última, possuidora de atividade inibitória. Após o I $\kappa$ B sofrer fosforilação, ubiquitinação e degradação, ocorre a translocação nuclear do complexo p50-p65 (AGGARWAL, 2003). Neste contexto, a importância do TRADD é crítica, já que experimentos envolvendo animais deficientes nesta proteína adaptadora demonstraram não conseguir fosforilar, nem degradar o complexo I $\kappa$ B. (CHEN *et al.*, 2008).

Aprofundando um pouco mais a via de ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B, temos importante participação das moléculas cIAP-1 e cIAP-2. Tais moléculas agem como ligases E3 para formar cadeias de poliubiquitinas K63 sobre o RIP-1 e nelas mesmas, promovendo uma plataforma para o recrutamento do NEMO, a subunidade regulatória do complexo quinase I $\kappa$ B (complexo IKK) (MAHONEY *et al.*, 2008). RIP-1 é um fator chave na mediação das vias de sinalização induzidas pelo TNF. Quando as ligases E3 TRAF-2/cIAP, juntamente com o complexo de reunião de cadeias lineares de ubiquitina (LUBAC) finalizam a ubiquitinação do RIP-1, a molécula associa-se então, a adaptadores tais como quinase ativada por TGF- $\beta$ -1 (TAK-1) e NEMO para que ocorra a ativação do IKK, promovendo assim, a atividade transcricional do NF- $\kappa$ B, culminando na sobrevivência celular, proliferação e diferenciação (WALCZAK, 2011).

#### 1.4.4 TNF-R1 e morte celular

Receptores que compartilham o domínio da morte, tais como TNF-R1 e CD95, transduzem sinais que promovem a morte celular por apoptose. Este tipo de morte celular, quando induzida via TNF-R1, é mediada pelo recrutamento da proteína adaptadora TRADD, proteína associada ao domínio da morte de Fas (FADD), e caspase-8 para a porção citoplasmática do receptor (HSU *et al.*, 1996).

Interessantemente, TRADD também age como proteína adaptadora neste caso. Segundo Micheau e Tschopp (2003), a sinalização via TNF-R1 envolve a reunião de dois complexos de sinalização molecularmente e espacialmente distintos, que ativam sequencialmente NF- $\kappa$ B e caspases. Após a ativação do NF- $\kappa$ B, o receptor sofrerá internalização e o complexo que gerou a ativação do NF- $\kappa$ B sofrerá modificação e se dissociará do receptor. TRADD e/ou RIP, se ligarão ao FADD, o que resultará no recrutamento da caspase-8 para um complexo de sinalização secundário dentro do citosol. Tal complexo irá subsequentemente, mediar a apoptose (MICHEAU; TSCHOPP, 2003).

Em vários tipos celulares, as vias de sinalização pelos domínios da morte do TNF-R1, incluindo aqueles que levam à apoptose são dependentes da internalização do receptor, ao passo que outras não compartilham de tal dependência (SCHNEIDER-BRACHERT, 2006). A ligação do TNF- $\alpha$  ao seu receptor inicia a rápida agregação das moléculas adaptadoras e acessórias, seguida pela internalização do complexo ligante-receptor via endocitose dependente de clatrina (SCHNEIDER-BRACHERT, 2006). Após a endocitose do receptor, haverá a ativação de esfingomielinases, que gerarão ceramida, um potente mediador pró-apoptótico (WIEGMANN *et al.*, 1994). Além disso, tal processo ainda é importante para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e para a ativação das proteínas quinase dependente de mitógeno (MAPKs) e proteína quinase B, contudo, não é necessário para a ativação das vias do NF- $\kappa$ B (SCHNEIDER-BRACHERT, 2006).

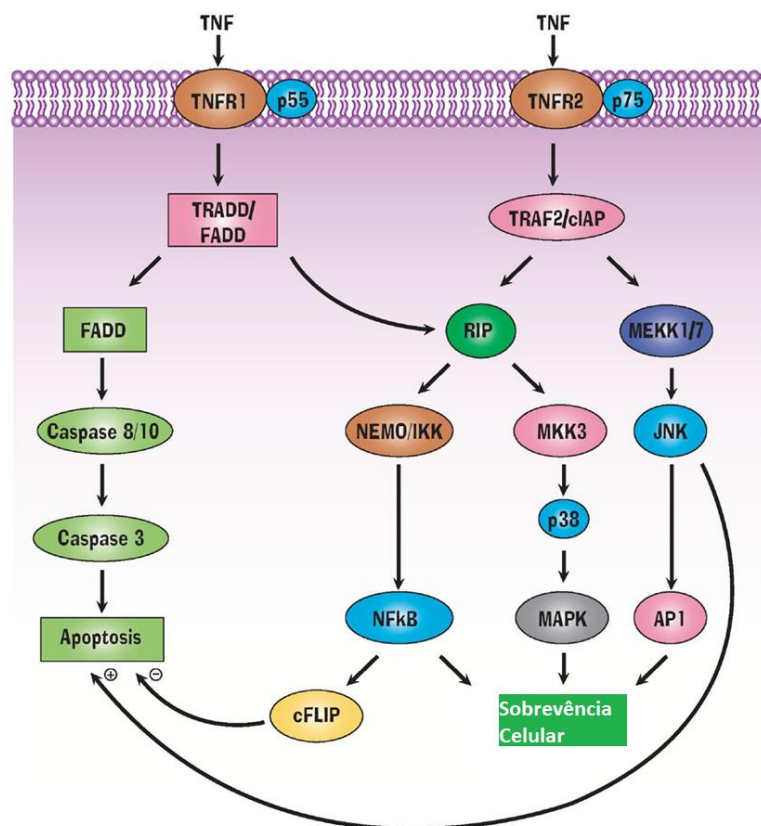
#### 1.4.5 TNF-R2 – vias gerais de ativação

Embora muitas das atividades do TNF- $\alpha$  requeiram a sinalização pelo TNF-R1, o TNF-R2 possui capacidades de sinalização independentes, incluindo a indução da proliferação das células T e proliferação de timócitos (TARTAGLIA *et al.*, 1991). Muitos tipos celulares co-expressam tanto o TNF-R1, quanto o TNF-R2 e requerem cooperação entre estes dois receptores para que seja gerada a resposta do TNF- $\alpha$  (GRELL *et al.*, 1998).

Ao contrário do que foi referenciado para o TNF-R1, receptores como TNF-R2, não possuem um motivo de domínio da morte e, portanto, não podem induzir diretamente a apoptose. A transdução de sinais se dá através da ligação indireta com os membros da família TRAF, no caso, o TRAF-2 (AGGARWAL, 2003), via a proteína Bmx (PAN *et al.*, 2002). De fato, há dois sítios de ligação à TRAF-2, na porção carboxiterminal do receptor, capazes de ativar a via do NF- $\kappa$ B de modo independente e de inibir a ativação pela via JNK, com papel chave a localização do receptor na membrana celular. Além disso, ainda há mais três domínios adicionais conservados em diferentes espécies, sendo que dois deles são imprescindíveis para a ativação da JNK e localização intracelular do receptor (JI *et al.*, 2011).

Após o receptor se associar com a molécula TRAF-2, ocorre a recrutamento das proteínas acessórias TRAF-1 e cIAP-1/2, que são capazes de interagir com o TNF-R2 mesmo quando não há estímulo pelo TNF- $\alpha$  (ROTHER *et al.*, 1995). Nesta fase, as moléculas acessórias encontram-se interagindo com TRAF-3 e a quinase indutora do NF- $\kappa$ B (NIK), o que durante o processo, sofrerá ubiquitinação e degradação proteossomal. Dentro do contexto de ativação da via alternativa do NF- $\kappa$ B via TNF-R2, ocorre o desvio do complexo de indutor de degradação do NIK, formado pelo TRAF-2/cIAP1/2 no citosol, o que permite que haja acúmulo de NIK, que por sua vez estimulará a IKK, responsável pela fosforilação da proteína precursora p100 do NF- $\kappa$ B, resultando na ativação da forma p52 da molécula (SUN; LEY, 2008). Ainda em relação à TRAF-2, a ligação do TNF- $\alpha$  ao TNF-R2 leva à uma mudança na localização intracelular da molécula adaptadora, fazendo com que ela venha posteriormente a sofrer degradação proteossomal, regulando negativamente a via de ativação do NF- $\kappa$ B (CABAL-HIERRO *et al.*, 2013).

Em relação à ativação da JNK, um fenômeno também compartilhado pelo TNF-R1 relaciona-se com o TNF-R2, a internalização do receptor. Tal fenômeno se dá via dois dos três novos domínios descritos por Ji e colaboradores (2011), especialmente o terceiro, o qual leva à associação com a proteína cAIP-1, que serve de adaptadora para a ligação da JNK. Outro fato descrito é a presença de motivos di-leucina no TNF-R2, os quais estão associados à endocitose dependente de clatrina. Quando tal motivo é mutado, há bloqueio da internalização do receptor, bem como abolição da via da JNK, mas nenhum efeito é notado sobre a ativação da via do NF- $\kappa$ B (MICHEAU; TSCHOPP, 2003). Quando há o bloqueio da via da JNK, não há modificação da localização celular do TNF-R2, fato que sugere que a internalização do receptor é necessária para que ocorra a ativação da via da JNK (Ji *et al.*, 2011). Em termos de função fisiológica, a ativação da JNK via TNF-R2 se correlaciona com casos de apoptose induzida por isquemia, na qual a ativação da via leva a um decréscimo da expressão da TRAF-2 e, conseqüentemente, decréscimo na ativação do NF- $\kappa$ B (LUO *et al.*, 2006).



**Figura 1:** Vias de sinalização dos receptores TNF-R1 e TNF-R2. Adaptado de Faustman e Davis (2013)



#### 1.4.6 Clivagem proteolítica da porção extracelular dos receptores de TNF- $\alpha$

Receptores solúveis são prevalentes entre muitas classes de famílias de receptores e são especialmente comuns entre os membros das superfamílias de receptores de hamatopietina e TNF- $\alpha$ , incluindo receptores para o hormônio do crescimento, leptina e ligante de Fas (HEANEY; GOLDE, 1998).

Os eventos que levam à formação dos receptores solúveis incluem: (i) processamento alternativo do mRNA, levando à falta do polipeptídeo transmembrana, (ii) por clivagem proteolítica da porção extracelular do receptor, (iii) por transcrição de genes distintos que codificam proteínas solúveis de ligação à citocinas, (iv) liberação de receptores em sua integridade através de exossomos, e (v) clivagem de receptores ancorados à GPI (LEVINE, 2004). Em termos biológicos, receptores solúveis de citocinas agem ou atenuando ou promovendo a sinalização das citocinas à eles ligadas, funcionando como importantes reguladores da imunidade e inflamação (LEVINE, 2004).

No que diz respeito aos receptores de TNF- $\alpha$ , o processo de geração dos receptores solúveis, denominado *shedding* do ectodomínio (PESCHON *et al.*, 1994), é promovido via clivagem proteolítica, catalisada pelas metaloproteases ligadas ao zinco, pertencentes à família ADAM (BLACK *et al.*, 1997). No caso, a enzima responsável pelo processo é a ADAM17, também conhecida como TACE, a qual também cliva a forma precursora do TNF- $\alpha$  da membrana para gerar a forma solúvel do TNF- $\alpha$  (PESCHON *et al.*, 1998; REDDY *et al.*, 2000). Em termos de expressão, o mRNA da ADAM17 é expresso virtualmente em todas as células do corpo, contudo, a atividade da enzima é vista principalmente em casos de inflamação e câncer, sendo que muitos mecanismos foram associados à sua ativação, tais como TNF- $\alpha$ , LPS, ésteres de forbol, IL-10, ou após a ativação de macrófagos por células T e neutrófilos (LEEUEWENBERG *et al.*, 1994).

Em termos fisiológicos humanos, a concentração plasmática do receptor solúvel TNF-R1 (sTNF-R1) é de cerca de 2 a 3 ng/mL e do receptor solúvel TNF-R2 (sTNF-R2) é de 2 a 6 ng/mL. Quando em condições patológicas, tais como a sepse por bactérias gram-negativas e em infecções não bacterianas, como malária, ambos os receptores têm seus níveis elevados podendo alcançar concentrações de até a 20 ng/mL (DE BEAUX *et al.*, 1999). O processo de *shedding*, em sua forma clássica,

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

No caso de patologias tais como a síndrome periódica associada ao receptor de TNF (TRAPS), caracterizada por episódios repentinos de febre e inflamação localizada que afeta múltiplos órgãos (DRENTH; VAN DER MEER, 2001) temos que um dos mecanismos associados à doença constitui-se em mutações associadas ao TNF-R1 promovendo a diminuição de sua clivagem proteolítica (McDERMOTT *et al.*, 1999). Com a diminuição da fração solúvel do receptor, temos uma menor capacidade tamponante do TNF- $\alpha$  circulante, promovendo assim, a inflamação espontânea, bem como o agravamento das crises (HAWARII *et al.*, 2003). Para o TNF-R2, temos um papel importante durante a inibição da apoptose via TNF- $\alpha$ , no qual a liberação de IL-10 induzida por cepas virulentas de *M. tuberculosis* promovem a clivagem proteolítica do receptor, culminando na ligação da citocina à fração solúvel do receptor, inibindo seus efeitos, conseqüentemente prolongando o processo infeccioso (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al.*, 1998).

## 1.5 INTERLEUCINA 10

### 1.5.1 Aspectos gerais

Inicialmente caracterizada como uma citocina específica para o padrão T helper 2 (T<sub>H2</sub>), a interleucina-10 (IL-10) é uma citocina de ações pleiotrópicas, que possui papel fundamental na imunorregulação, especialmente na proteção do hospedeiro contra as imunopatologias associadas à infecções, autoimunidade e alergia (Fiorentino *et al.*, 1989). Em termos de expressão, quase todas as células tanto as pertencentes à imunidade inata, quanto à imunidade adaptativa podem expressar a IL-10, incluindo células dendríticas, macrófagos, mastócitos, células Natural Killer (NK), eosinófilos, LB, LT CD8, bem como LT CD4 (T<sub>H1</sub>), T<sub>H2</sub>, T<sub>H17</sub> e T regulatórias (T<sub>reg</sub>) (NG *et al.*, 2013).

Durante o processo infeccioso agudo, um dos papéis principais da IL-10 é desativar macrófagos e terminar a resposta inflamatória, de modo que não haja a liberação excessiva de mediadores pró-inflamatórios sintetizados por células ativadas, que acarretariam em dano tecidual ao hospedeiro (COUPER; BLOUNT; RILEY, 2008). Tais eventos foram comprovados através de experimentos que empregaram camundongos deficientes para esta citocina, os quais demonstraram exibir respostas imunes prolongadas e exageradas quando da exposição a antígenos, que em muitos casos eram acompanhados por inflamação excessiva e dano tecidual, podendo chegar ao desenvolvimento da enterocolite crônica (LEON *et al.*, 1998). Estudos nos quais doenças autoimunes humanas foram avaliadas demonstraram que o nível de IL-10 detectado em amostras de pacientes foi correlacionado de modo inversamente proporcional à gravidade da doença (VAN BOXEL-DEZAIRE *et al.*, 1999; GIBSON *et al.*, 2001). Outro aspecto interessante é causado por fatores de virulência associados a microrganismos tais como as micobactérias, os quais suprimem as respostas antimicrobianas através da indução da liberação da IL-10, o que interfere na produção de TNF- $\alpha$  e subsequentemente na apoptose dos macrófagos através da via de sinalização JAK-STAT, culminando na sobrevivência do patógeno no organismo hospedeiro (BALCEWICZ-SABLINSKA; GAN; REMOLD, 1999).

Outra função da IL-10 está relacionada à supressão da inflamação promotora de tumores. O processo inflamatório crônico, bem como as citocinas a ele

relacionadas, correlacionam-se ao aumento da incidência de tumores e piora do prognóstico para pacientes com câncer (COUSSENS; ZITVOGEL; PALUCKA, 2013). Tal situação leva a um estágio de inflamação crônica, no qual a elevada proliferação celular compensatória, o aumento da angiogênese e atividade proteolítica, bem como da taxa de mutações devido à liberação de espécies reativas de oxigênio, formam um microambiente propício para a geração de tumores (OFT, 2014). Em estudos realizados com camundongos deficientes de IL-10, verificou-se o estabelecimento de enterocolite, no qual altos níveis de IL-1a, TNF- $\alpha$ , IL-6 e NO foram detectados, juntamente com elevada migração de macrófagos para os locais de infecção. Além desse quadro, níveis anormais de células pertencentes ao padrão Th1 foram encontrados, um quadro que, posteriormente se transformou em câncer de cólon (BERG *et al.*, 1996). Tal fato, também se deve à supressão dos sinais anti-inflamatórios das populações de células Tregs e exacerbação dos sinais pró-inflamatórios das células Th17 (CHAUDHRY; RUDENSKY, 2013). Além disso, estudos demonstraram que a IL-10 induz não apenas a proliferação, mas também, a citotoxicidade de células TCD8<sup>+</sup>, no qual modelos de tratamento de tumores em camundongos com IL-10 recombinante humana, ou a expressão da citocina em células tumorais, levou à inibição e rejeição tumoral, com importante participação das células TCD8<sup>+</sup> no processo (MUMM; OFT, 2008).

### 1.5.2 A IL-10 e seus receptores

Em termos moleculares, a IL-10 é o membro principal da família IL-10 de citocinas, constituindo-se como uma molécula homodimérica de 36 KDa, unida por interações não-covalentes em conformação alfa-hélice (VIEIRA *et al.*, 1991). Em termos de produção, os estímulos tanto endógenos, quanto exógenos como a endotoxina, TNF- $\alpha$ , catecolaminas e drogas que elevam os níveis de cAMP estimulam o promotor do gene da IL-10 a dar início à sua síntese (RIESE *et al.*, 2000).

Suas ações imunológicas se dão através de sua ligação aos receptores de IL-10 (IL-10Rs). O receptor de IL-10 do tipo I (CD210a; IL-10RI) é expresso na maioria das células da imunidade inata e adaptativa, enquanto que o receptor de IL-10 do tipo II (CD210b; IL-10RII) é expresso não somente em células com funções imunológicas, mas também, em uma variedade de células tais como células epiteliais e

queratinócitos (WOLK; SABAT, 2006). O IL-10RI é o receptor de alta afinidade para o IL-10, no qual se estabelecerá a ligação primária para a citocina, formando um sítio de ligação para o IL-10RII, o receptor de baixa afinidade, responsável pela ligação secundária da citocina, fazendo com que o complexo ternário de sinalização se forme (KOTENKO *et al.*, 1997). O IL-10RII não se liga diretamente à IL-10, e a ligação da mesma ao IL-10RI sem a presença do IL-10RII leva à falha na iniciação da transdução dos sinais e conseqüentemente nas ações imunorregulatórias da IL-10 (KOTENKO *et al.*, 1997).

A correta formação do complexo ligante-receptor subsequentemente levará à ativação da via JAK-STAT específica e seus mecanismos que influenciarão à ação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (RILEY *et al.*, 1999), bem como dos genes implicados na supressão da ativação clássica dos macrófagos como o da heme-oxigenase-1 (HO-1) e SOCS3, (O'FARRELL *et al.*, 2000) e do gene Bcl-3, sendo o seu produto, a proteína Bcl-3, um membro da família de proteínas I $\kappa$ B (KUWATA *et al.*, 2003), porém, localizada no núcleo, agindo como reguladora negativa do NF- $\kappa$ B e inibidor da produção de TNF- $\alpha$  em células estimuladas por lipopolissacáride (KERR, *et al.*, 1992; BOURS *et al.*, 1993).

### 1.5.3 Principais elementos das vias anti-inflamatórias da IL-10

A partir do momento em que se dá a ligação da IL-10 ao seu complexo receptor, ocorre o processo de fosforilação em duas proteínas quinases associadas aos domínios intracelulares dos receptores. A proteína quinase JAK1, associada ao IL-10RI, e a proteína quinase TYK2, associada ao IL-10RII (KOTENKO *et al.*, 1997), que servirão de sítios temporários de ancoragem para o STAT1 e/ou STAT3 que se encontram inativos no citosol (WEBER-NORDT *et al.*, 1996).

Os STATs se ligam ao IL-10RI através do domínio 2 de homologia Src (SH2) e são fosforilados em resíduos de tirosina através das JAKs associadas ao receptor, o que leva à sua ativação e conseqüente homodimerização (WEBER-NORDT *et al.*, 1996). No processo de sinalização, a molécula de STAT1, embora ativada pela IL-10, não possui efeitos associados ao processo anti-inflamatório, e suas ações, de fato, não estão elucidadas (CAREY; TAN; ULETT, 2012). Contudo, a molécula de STAT3 possui grande importância dentro do processo de sinalização. Após o processo de

homodimerização, ocorre a translocação dos homodímeros até o núcleo, onde ocorre a interação com elementos de alta afinidade de ligação ao STAT (SBEs), os quais promovem a transcrição dos genes responsivos à IL-10 (O'FARRELL *et al.*, 2000).

Após sua ativação, o STAT3 permanece sob um processo de fosforilação sustentada, contrastando com o processo que ocorre durante a sinalização gerada pela IL-6, a qual somente leva à uma ativação transitória da molécula (NIEMAND *et al.*, 2003). Tal padrão de ativação é devido à presença das proteínas supressoras da sinalização de citocinas (SOCS), sendo que em resposta à IL-10, a SOCS1 e SOCS3 são produzidas e agem suprimindo a sinalização via JAK-STAT através de mecanismos diferentes. Enquanto que o SOCS1 suprime a atividade da JAK ligando-se em domínios específicos na proteína, SOCS3 o faz através da ligação ao receptor ativado, assim, inibindo-a (DING *et al.*, 2003). No caso da IL-6, que assim como a IL-10 promove a elevação da expressão de SOCS3 de modo STAT3 dependente, o receptor possui vias de sinalização envolvendo gp130, que contém os motivos de tirosina necessários para a degradação do STAT3 de proteínas associadas à sua fosforilação via SOCS3. Os IL-10Rs, não possuem tais motivos de consenso (CROKER *et al.*, 2003). No caso da SOCS1, cuja função principal é o *feedback* negativo da sinalização do IFN- $\gamma$  (NIEMAND *et al.*, 2003), especula-se que tenha, também, um papel de *feedback* negativo sobre a sinalização da IL-10, sendo assim, ambas as proteínas supressoras envolvem-se na regulação da via JAK-STAT, permitindo a regulação fina da sinalização da IL-10 (MARINE *et al.*, 1999).

Em geral, citocinas pró-inflamatórias possuem numerosos sítios de consenso  $\kappa$ B dentro das regiões promotoras as quais são acionadas após a estimulação por lipopolissacáride (LPS), com as subunidades heterodiméricas p65 e p50 do NF- $\kappa$ B (LI; VERMA, 2002). A super expressão da molécula inibidora I $\kappa$ B suprime a expressão de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e fator de crescimento do endotélio vascular em células mononucleares do sangue periférico de humanos (UDALOVA *et al.*, 1998). Em trabalho realizado por Shames *et al.* (1994) verificou-se que o pré-tratamento com IL-10 prevenia a degradação do I $\kappa$ B e, por conseguinte, a translocação do Nf- $\kappa$ B para o núcleo e a sua atividade transcricional sobre os genes das citocinas pró-inflamatórias. Além disso, a reduzida degradação do I $\kappa$ B associa-se à inibição da fosforilação em serina da subunidade p65 do Nf- $\kappa$ B (BHATTACHARYYA *et al.*, 2004). Outro aspecto interessante foi relatado por Kuwata *et al.* (2002), onde verificou-se que a proteína

Bcl-3, cujo gene é responsivo à IL-10, fez com que a atividade de ligação ao DNA dos heterodímeros p50/p6 do NF-κB se apresentasse diminuída.

## 1.6 LOCUS RD1

O locus região de diferença 1 (RD1), foi descrita inicialmente por Mahairas *et al.* (1996) em um experimento de hibridização genômica subtrativa, no qual foram identificadas as principais diferenças genéticas entre a cepa avirulenta *M. bovis* BCG em relação às cepas virulentas *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Esta região possui 9.5kb e abrange nove genes, indo do Rv3871, até o Rv3879c, sendo que no *M. bovis*, sua deleção remove completamente sete genes (Rv3872 a Rv3878) e trunca dois outros (Rv3871 e Rv3879) (LEWIS *et al.*, 2003). A falta da região RD1, bem como de mecanismos relacionados à sua regulação geram o fenótipo atenuado da cepa *M. bovis* BCG em relação ao fenótipo presente no *M. bovis* (MAHAIRAS *et al.*, 1996). Tal fato pode ser também demonstrado, quando cepas mutantes do *M. tuberculosis*, nas quais a região RD1 é deletada são utilizadas, exibindo então, infectividade e atenuação semelhantes ao *M. bovis* BCG (PERERA *et al.*, 2009). A reintrodução da região RD1 no *M. bovis* BCG leva a modificações marcantes na morfologia colonial, aumento na virulência da bactéria e, aumento na sua persistência no hospedeiro imunocompetente (PYM *et al.*, 2002).

Dentre os nove genes codificados por esta região, dois em particular, o Rv3874 (*esxA*) e o Rv3875 (*esxB*), que codificam respectivamente as proteínas secretadas “culture filtrate protein-10 kDa” (CFP-10) e “early secreted antigenic target-6 kDa” (ESAT-6), se mostraram cruciais para o processo de virulência, já que quando eram deletados o mesmo se mostrava drasticamente reduzido, principalmente quanto à subversão da resposta imunológica pelos macrófagos (STANLEY *et al.*, 2003). O ESAT-6 e o CFP-10 são membros de uma grande família de proteínas micobacterianas, incluindo 22 encontradas no *M. tuberculosis*, as quais são codificadas por genes arranjados em pares no genoma (RENSHAW *et al.*, 2002). No caso das duas proteínas em questão, os genes demonstraram-se coordenadamente regulados e ambas as proteínas são secretadas a despeito da falta da sequencia sinal convencional (PYM *et al.*, 2003).

### 1.6.1 Esat6:cfp10

Em bactérias patogênicas, proteínas associadas à superfície celular ou secretadas atuam na promoção da entrada de alimentos, aderência às superfícies celulares, podendo também, funcionar de modo a manter a integridade da parede celular durante os processos de divisão celular e oferecer proteção contra condições ambientais inóspitas, tais como o sistema imunológico do hospedeiro (MCLAUGHLIN *et al.*, 2007).

Das vias secretoras de proteínas presentes nas micobactérias, a região RD1 tem participação na codificação do sistema-1 de secreção de ESAT-6 (ESX-1), também conhecido como sistema de secreção tipo VII, responsável por secretar o ESAT-6 juntamente com seu parceiro molecular, o CFP-10 (CONVERSE; COX, 2005). Muitos efeitos relacionados à patogênese da tuberculose estão relacionados à expressão deste sistema de secreção, tais como supressão das respostas pró-inflamatórias, interação com receptores tipo Toll-2 (PATHAK *et al.*, 2007), citotoxicidade, necrose, sequestro da maturação de fagossomos e formação de granuloma (VOLKMANN *et al.*, 2004).

Em termos estruturais, o ESAT-6 e o CFP-10 formam um complexo heterodimérico em proporção 1:1 com grande estabilidade bioquímica (MEHER *et al.*, 2006). O complexo possui sua região de contato principalmente nas  $\alpha$ -hélices presentes nas duas moléculas, sendo estas, regiões hidrofóbicas, possuindo, também, interações do tipo van der Waals (RENSHAW *et al.*, 2005). Interessantemente, o alto índice de  $\alpha$ -hélices, juntamente com a natureza hidrofóbica do complexo, relaciona-se com a interação do mesmo com bicamadas lipídicas, baseado no princípio da ligação e espontânea inserção de proteínas  $\alpha$ -helicoidais ou peptídios em bicamadas (KILLIAN, 2003). Em experimento realizado por De Jonge *et al.* (2007), foi demonstrado que o ESAT-6 liga-se especificamente aos lipossomos contendo fosfatidilcolina e colesterol, enquanto o CFP-10 não possuía ligações tão específicas, indicando uma possível diferença nas interações com membranas. Contudo, tais moléculas não interagem com a membrana em sua forma complexada, já que as porções responsáveis por tais interações encontram-se no interior da estrutura (BRODIN *et al.*, 2003). Tal fato, na verdade, é um mecanismo de proteção, que mantém o complexo solúvel sob condições fisiológicas, evitando interações



hidrofóbicas inespecíficas com membranas citoplasmáticas dentro da bactéria, bem como proteção à atividade de enzimas proteolíticas (MEHER *et al.*, 2006). Contudo, quando em pH ácido, o complexo formado se dissocia, liberando as duas moléculas para a interação com membranas fosfolipídicas (DE JONGE *et al.*, 2007). Ainda assim, a literatura é conflitante sobre a questão do envolvimento do pH do ambiente, e dissociação do complexo, especialmente quando a metodologia envolve proteínas recombinantes no lugar de proteínas nativas (DE LEON *et al.*, 2012)

Em trabalho realizado por Stamm *et al.* (2003), no qual utilizou-se *M. marinum*, foi demonstrado um mecanismo de escape das vesículas dos fagossomos. Tal mecanismo foi, posteriormente descrito como diretamente ligado à atividade da região RD1, mais precisamente, à molécula de ESAT-6 (GAO *et al.*, 2006), que possui, de fato, atividades ligadas ao rompimento de membranas e participação nos processos apoptóticos (DE JONGE *et al.*, 2007). Além disso, Hsu *et al.* (2003), descreveram que mutantes nos quais o ESAT-6 fora deletado, demonstraram reduzida capacidade de invasão tecidual devido à falta de atividade citolítica.

### 1.6.2 O papel do locus RD1 no diagnóstico da tuberculose

Pessoas infectadas pelo *M. tuberculosis* podem ser identificadas através do teste de tuberculina no período entre seis a oito semanas após a exposição ao bacilo, sendo tal teste, baseado na reação de hipersensibilidade tardia contra um *pool* de antígenos do *M. tuberculosis* denominado de derivado proteico purificado (*purified protein derivative*, PPD) (AHMAD, 2011).

Contudo, o teste de tuberculina falta em sensibilidade e especificidade de modo que não consiga diferenciar entre infecção pelo *M. tuberculosis* e sensibilização por outra micobactéria ambiental (DYE *et al.*, 1999). Além disso, a vacinação por BCG pode levar a resultados falso-positivos, embora tais reações desapareçam poucas semanas após a vacinação e sejam moderadas (AHMAD, 2011). Sendo assim, métodos mais sensíveis e específicos tais como os ensaios de liberação de IFN- $\gamma$  (IGRAs), os quais se baseiam na resposta das células T após o estímulo pelos antígenos imunodominantes do *M. tuberculosis*, ESAT-6 e CFP-10 (BROCK *et al.*, 2001). Os IGRAs possuem excelente especificidade, pois os antígenos utilizados não são expressos na cepa atenuada *M. bovis* BCG e na maioria das micobactérias

ambientais de relevância clínica (MAHAIRAS *et al.*, 1996; PAI; RILEY; COLFORD Jr, 2004). Porém, os IGRAs não são capazes de distinguir entre pacientes tuberculosos latentes e aqueles em que se encontram em fase ativa em adultos imunocompetentes (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008). Ainda assim, em indivíduos imunocomprometidos e crianças, os IGRAs podem ajudar no diagnóstico da doença ativa como um teste diagnóstico auxiliar, particularmente se amostras do sítio suspeito de infecção, diferentemente do sangue, seja utilizado (STRASSBURG *et al.*, 2008).

Enquanto que os resultados gerados pelos IGRAs exibam melhores correlações com medidas de exposição ao *M. tuberculosis* em países nos quais a tuberculose é uma doença de baixa incidência, a performance do teste é subótima em nos países nos quais sua incidência é alta (PAI; ZWERLING; MENZIES, 2008).

## 1.7 RÉGULON DOSR

Inicialmente identificado como um regulador diferencialmente expresso em cepas virulentas (*regulator differentially expressed in a virulent strain M. tuberculosis/Rv3133*) – DevR – foi demonstrado posteriormente sua indução em resposta à hipóxia, NO e estresse redox, sendo finalmente renomeado, regulador de sobrevivência na dormência (*dormancy survival regulator*) – DosR. Sua indução resulta na expressão de aproximadamente 48 genes sob seu controle direto, denominados em conjunto como régulon DosR/DevR (TANEJA *et al.*, 2010; KUMAR *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2003).

Análises *in silico* dos promotores do régulon DosR demonstraram que há presença de um ou mais cópias de sequências de consenso no qual o fator de transcrição se liga. Tais sequências estão localizadas acima das regiões promotoras dos genes alvo. Sendo assim, o DevR ativado, ou seja, fosforilado se liga cooperativamente a sequências de DNA específicas denominadas de *Dev boxes*, promovendo a expressão dos genes alvos (CHAUHAN; TYAGI, 2008a; 2008b). Os *Dev boxes* possuem entre 18 e 20 pares de base em termos de tamanho, porém, as regiões mais significativas e conservadas em termos de interação com o DevR fosforilado possuem 16 pares de base. Em termos estruturais, o DevR quando ativado dimeriza-se, promovendo a interação de sua porção C-terminal com o DNA, justamente nas sequências de consenso já citadas (CHAUHAN *et al.*, 2011).

Sob condições de crescimento aeróbico, o Rv3133c é mantido em níveis basais através da ação do fator de transcrição PhoP (Rv0757), uma peça fundamental para a virulência e sobrevivência do Mtb (GONZALO-ASENSIO *et al.*, 2008). Em estudo realizado por De Majumdar *et al.* (2012), realizou-se, dentre outras análises, a quantificação dos níveis proteicos de DosR utilizando-se a cepa H37Rv do *Mycobacterium tuberculosis*, e chegou-se ao valor de aproximadamente 5  $\mu$ M no estado basal, alcançando o pico de aproximadamente 26  $\mu$ M quando em hipóxia. Tal aumento da concentração da proteína intracelular é resultante do processo de autoregulação (VOSKUIL *et al.*, 2003; BARTEK *et al.*, 2009), pois os genes *rv3133c* e *rv3132c* estão associados ao promotor do gene *rv3134c*, formando o transcrito Rv3134-DevRS (CHAUHAN; TYAGI, 2008a). O fato mais interessante em relação a tal regulação, é que ela ocorre posteriormente à indução de outros genes do régulon DosR, mas que estão associados às mudanças metabólicas, tais como *hspX* e *rv1738*, o que indica que as primeiras modificações celulares podem ocorrer com baixas concentrações de DevR, mas o seu aumento é necessário para a transcrição dos demais elementos do régulon (CHAUHAN *et al.*, 2011).

Modelos *in vitro* que mimetizam a condição de hipóxia demonstraram que à medida que o oxigênio é consumido, a taxa de crescimento micobacteriano diminui até virtualmente cessar (WAYNE; HAYES, 1996). Sendo assim, é necessário que haja adaptação do bacilo de modo que possa sobreviver às mudanças ambientais ocorridas. Sendo assim, tanto *in vivo*, quanto *in vitro*, o resultado da diminuição da tensão de oxigênio é o estado de não replicação, originando a infecção latente (SOHASKEY, 2008).

Como visto anteriormente, a condição fundamental para que o régulon DosR seja expresso é a situação de hipóxia. Além dessa condição, podemos incluir óxido nítrico (NO), monóxido de carbono (CO) e ácido ascórbico, sendo que este último age mimetizando múltiplos estresses intracelulares e exerce grande gama de efeitos sobre a expressão gênica do *Mycobacterium tuberculosis* (KUMAR *et al.*, 2008; TANEJA *et al.*, 2010). Dadas as condições necessárias para a indução do estado de dormência, ocorre a indução do régulon DosR através da participação dos sensores histidina quinase DosT (Rv2027c) e DosS/DevS (Rv3132c). O *dosS* é parte do régulon DosR, sendo co-transcrito juntamente com o *rv3133c* e *rv3134c*, como discutido anteriormente. Já o *dosT*, localizado adjacente a uma das muitas regiões do régulon

DosR, não é transcrito através do DevR, sendo expresso em condições de aerobiose, com expressão ainda inalterada em até 48 horas em culturas com 0,2% de tensão de oxigênio (SHERMAN *et al.*, 2001; VOSKUIL *et al.*, 2003). Em termos funcionais, o DosT responde primeiramente à hipóxia, podendo então se autofosforilar no resíduo de aspartato 54 e então, transferir o grupamento fosfato para o DevR, assim ativando-o, seguido pela ativação pelo DosS. Quando o oxigênio se torna limitado, DosT perde sua função, sendo o DosS responsável pela manutenção do estado de indução do régulon DosR por si só (ROBERTS *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2010). Em experimento realizado utilizando-se 0,2% de oxigênio por duas horas, os níveis de expressão de DosR encontraram-se diminuídos em até 45% em bactérias mutantes  $\Delta$ dosS ou  $\Delta$ dosT, sendo abolido em bactérias duplo-mutantes, ou seja, para que haja a ativação total do DevR é necessária a participação de ambos os sensores (HONAKER *et al.*, 2010).

Sem a respiração, o bacilo possui poucas opções metabólicas, sendo assim, menos energia é encontrada para a produção das proteínas do régulon DosR. A indução do régulon anterior à inibição da respiração permite que a bactéria transcreva e traduza os genes de interesse antes que as fontes celulares de energia caiam a níveis limitantes para o processo, sendo assim, o *M. tuberculosis* pré-adapta-se para o estado eminente de não respiração (LEISTIKOW *et al.*, 2010).

De fato, em trabalho realizado por CHAUHAN *et al.* (2011), demonstrou-se que em termos temporais, os genes presentes no régulon DosR são expressos em intervalos distintos. Genes tais como *hspX* e *rv1738* são expressos em até 4 horas após a indução da hipóxia no modelo utilizado, enquanto que a transcrição do promotor dos genes *rv3133-dosRS* ocorre posteriormente. Além disso, a indução dos primeiros genes se dá pelo DevR já existente na célula, e não pelo produzido pós-indução. Nesse caso, tais genes expressos inicialmente possuem alta taxa de sítios de ligação primário em seus promotores, permitindo que o nível basal de DevR seja suficiente para sua indução e ocorra assim, o recrutamento rápido de RNA polimerases para a rápida produção das proteínas. Para os outros genes do régulon, já é necessário um nível maior de DevR fosforilado para que ocorram as expressões nos momentos necessários. De modo geral, os genes expressos inicialmente relacionam-se com os preparativos para as mudanças metabólicas que se seguirão.

O gene *nark2*, por exemplo, codifica o transportador nitrato/nitrito, que no *Mycobacterium tuberculosis* serve como mantenedor do equilíbrio redox ou até mesmo, produtor temporário de energia, enquanto que para outras bactérias, o nitrogênio é utilizado como aceptor final de elétrons no lugar do oxigênio em condições de anaerobiose (WAYNE; HAYES, 1998). Outro gene de grande importância, é o *tgs*, que permite que corpúsculos lipídicos contendo triacilgliceróis sejam utilizados como reserva energética (SIRAKOVA *et al.*, 2006), além disso, as expressões de enzimas como fosfofrutoquinase B (PfkB) e ferredoxina (FdxA) também são de ocorrência precoce e necessária para as mudanças metabólicas (CHAUHAN; TYAGI, 2008). Em trabalho realizado por Leitiskow *et al.* (2010) foram analisados determinados marcadores envolvidos na homeostase metabólica para a condição anaeróbica, e foi demonstrado que os níveis de ATP nos bacilos estavam estabilizados em 25% dos níveis em aerobiose quando comparados aos bacilos mutantes para DosR, que obtiveram uma queda acentuada em seus níveis. Tal fato é devido a não necessidade da molécula para os processos metabólicos na dormência. Além disso, um obstáculo primariamente encontrado por aeróbios durante a anaerobiose é a regeneração do NAD, já que a cadeia respiratória está bloqueada na ausência do oxigênio como aceptor final de elétrons. No caso do Mtb os níveis de NADH tem na mesma proporção dos de ATP, o que reflete menores níveis metabólicos, e como não há enzima nicotinamida fosforibosiltransferase (PncB2) controlada por DevR, os níveis de nicotinamida tendem realmente a decrescer. Sendo assim, os níveis de NAD também decrescem cerca de metade dos níveis aeróbicos.

Porém, o que foi discutido até agora demonstra apenas que o régulon DosR exerce participação nas vias preparatórias para a nova condição ambiental encontrada pelo *M. tuberculosis*. O fato é que em trabalho publicado em 2008, Rustad e colaboradores avaliaram o papel de um novo grupo de genes envolvidos na manutenção da resposta à hipóxia no *M. tuberculosis*, denominados EHR (*enduring hypoxic response*). Mesmo em modelos que se utilizavam dos mutantes para o régulon DosR houve a persistência replicativa tanto *in vitro* quanto em infecção crônica *in vivo*, o que levou a se discutir a possibilidade de um novo grupo de genes em contribuição ao fenótipo (SHERMAN *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2003).

Como discutido anteriormente, o régulon DosR consiste em cerca de 48 genes rapidamente induzidos. Contudo, quando em aproximadamente oito horas de

limitação de oxigênio o número total de genes induzidos é de aproximadamente 100. E em 24 horas já se alcançava o número de 400 genes induzidos. Embora alguns destes genes induzidos em cada período de tempo fossem únicos para cada etapa, quase metade dos genes induzidos em qualquer período de tempo se manteve durante os experimentos. A interseção dos genes induzidos entre 4 e 7 dias de hipoxia revelou um número de 230 genes, que em parte são reguladores de transcrição (RUSTAD *et al.*, 2008). Além disso, tais genes demonstraram-se independentes da atividade do régulon DosR para sua indução. Embora tenham sido descritos e haja grande possibilidade de conterem também parte da maquinaria necessária para a entrada e sobrevivência em latência, os componentes-chave dos processos envolvidos, ainda não estão identificados (RUSTAD *et al.*, 2008).

### 1.8 Regulon DosR e a resposta imunológica

Como discutido nos tópicos anteriores, o régulon DosR exerce um importante papel na persistência e sobrevivência intracelular do Mtb. Além disso, são alvos para o sistema imunológico durante a infecção latente em humanos. O *upregulation* do DevR pode estar envolvido na virulência das cepas, sendo que os mutantes para o régulon se encontram atenuados em modelos de infecção em camundongos, porquinhos-da-índia e coelhos (CHEN *et al.*, 2013). Sob condições de estresse, não há discernimento em termos de crescimento ou sobrevivência para cepas cujos seguintes genes foram deletados: *rv1996*, *rv2005* e *rv2028*, porém quando genes como *rv3133c* ou do regulador *rv3132c* são deletados ocorre grande restrição no crescimento (BOON; DICK, 2002).

Em trabalho publicado por Roupie *et al.* (2006), realizou-se a análise da imunogenicidade de oito antígenos codificados pelo régulon DosR em camundongos BALB/c e C57BL/6. A vacinação com DNA com os antígenos Rv2021c e Rv2626c foi responsável por grande resposta Th-1, além disso, respostas contra os antígenos Rv1733c, Rv2031c e Rv2626c também foram induzidas em camundongos BALB/c pós o desafio com o Mtb. Antígenos DosR demonstraram também, serem reconhecidos preferencialmente por células T em pacientes tuberculosos em estado latente em relação aos que possuíam a doença ativa, sugerindo que há resposta imunológica direcionada contra o régulon DosR em tais pacientes, ou seja, há uma

certa supressão do Mtb por parte do sistema imunológico (DEMISSIE *et al.*, 2006; LEYTEN *et al.*, 2006). Em contraste com tais resultados, as respostas de células T contra tais antígenos em indivíduos e camundongos vacinados com BCG são extremamente baixas, o que demonstra a importância da necessidade de estimulação contínua pelo patógeno em dormência de modo que haja a promoção da proteção contra o patógeno e consequente controle da infecção (LIN *et al.*, 2007).

Dos 10 antígenos mais frequentemente reconhecidos pelas células T, o Rv1733c, Rv2029c e Rv2031c são os mais responsivos em indivíduos expostos aos *M. tuberculosis* (SCHUCK, 2009; BLACK *et al.*, 2009; COMMANDEUR *et al.*, 2011). Em termos de resposta celular, em pacientes tuberculosos latentes, temos que a maior parte das respostas antígeno-específicas aos elementos dos regulon DosR são obtidas pelas células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, pertencente às células T de memória efetoras (CCR7<sup>-</sup> e CD45RA<sup>-</sup>), ou células T efetoras (CCR7<sup>-</sup> e CD45RA<sup>+</sup>) (BRUNS *et al.*, 2009). Tais achados, podem facilitar o *screening* para a detecção dos melhores componentes para vacinas, contudo, os estudos acima não consideram a homologia entre os antígenos presentes em micobactérias patogênicas e ambientais, o que pode gerar resultados falsamente positivos (LIN *et al.*, 2009).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT6:CFP10 e Rv1733, na produção de TNF- $\alpha$  e seus receptores, utilizando-se células RAW264.7.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a citotoxicidade dos antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis* em macrófagos RAW264.7.

Avaliar a produção de NO, bem como as expressões das enzimas iNOS e Arginase-1 após estímulo com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis* em macrófagos RAW264.7.

Avaliar a produção de TNF- $\alpha$  em células RAW264.7 após a estimulação com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis*

Avaliar a produção de IL-10 em células RAW264.7 após a estimulação com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis*

Avaliar a expressão dos receptores de TNF, mTNF-R1 e mTNF-R2, na superfície de macrófagos RAW264.7 após a estimulação com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis*.

Avaliar a expressão dos receptores solúveis de TNF, sTNF-R1 e sTNF-R2, na superfície de macrófagos RAW264.7 após a estimulação com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 do *M. tuberculosis*.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CÉLULAS RAW264.7

A linhagem celular de macrófagos RAW264.7, originária de células de leucemia mielomonocítica murina foi cultivada em meio RPMI 1640 com 2mM de L-glutamina (Gibco, Grand Island, N.Y., USA), suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, N.Y., USA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) e 1% v/v de aminoácidos não-essenciais (Gibco, Grand Island, N.Y., USA) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> (KIM et al, 2012). Durante os experimentos foram utilizadas placas de cultura celular de 48 ou 96 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland), sendo as células plaqueadas na concentração de  $2 \times 10^5$ /mL e estimuladas com LPS (0,1µg/mL), PMA (0,1µg/mL) (ETZEROD *et al.*, 2010) ou antígenos recombinantes (5µg/mL), por 24 e 48 horas de cultura.

#### 3.2 ANTÍGENOS ESTUDADOS

Os seguintes antígenos recombinantes do *Mycobacterium tuberculosis* foram utilizados no estudo: a proteína de fusão ESAT6:CFP10, pertencente à região gênica RD1 e o antígeno Rv1733, pertencente ao regulon DosR. Os antígenos foram doados pelo professor Dr. Tom H. M. Ottenhoff, da Leiden University Medical Center, Holanda. Os antígenos recombinantes foram reconstituídos em PBS estéril contendo 1% de dimetil sulfóxido (DMSO), e utilizados na concentração de 5µg/mL nas culturas celulares.

##### 3.2.1 Teste da Polimixina B

Pelo fato de os antígenos serem proteínas recombinantes, foi avaliada a presença de contaminação por LPS nas culturas das células RAW264.7 com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733. Para isso foi utilizado o teste da Polimixina B (10µg/mL, Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) (KIM *et al.*, 2012), por 48 horas. As

culturas foram incubadas com os antígenos na concentração de 5µg/mL, utilizando o LPS (100ng/mL) como controle na presença ou ausência de polimixina B.

### 3.3 ANALISE DA CITOTOXIDADE DOS ANTÍGENOS – MTT

Para avaliar a citotoxicidade dos antígenos foi empregado o método colorimétrico MTT. Este método visa avaliar a atividade metabólica das células quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazólio) por desidrogenases associadas ao NADPH e ao NADH, no que resulta a produção de cristais de formazano, intensamente coloridos, no interior das células. Estes podem ser observados ao microscópio ou extraídos e dissolvidos com solventes orgânicos, como por exemplo o DMSO, permitindo sua quantificação através de espectrofotometria. Nos experimentos realizados, células RAW264.7 foram semeadas em placas de 96 poços (Techno Plastic Products, Trasadingen, Switzerland) e expostas aos antígenos micobacterianos na concentração de 5 µg/mL, ou ao LPS (0,1 µg/mL) ou ao meio RPMI controle por 24 e 48 horas. Em cada um dos tempos avaliados, os sobrenadantes das culturas celulares foram removidos e substituídos por uma solução de MTT (5 mg/mL) em RPMI, durante 4 horas a 37°C. Após a incubação, os cristais de formazan resultantes da redução do MTT foram dissolvidos em 100 µL de DMSO e a absorbância foi medida num leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a um comprimento de onda de 540 nm. Os valores de viabilidade celular foram expressos em porcentagem relativamente à absorbância determinadas nas células controle.

### 3.4 ANALISE DA PRODUÇÃO DE NO

Os sobrenadantes das culturas de células RAW264.7 na presença ou ausência dos antígenos recombinantes do *M. tuberculosis* ou LPS foram analisados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN *et al.*, 1982) após 48 horas de incubação. Para a medição, alíquotas de 100 uL das amostras a serem dosadas foram incubadas com 100uL dos reagentes (sulfanilamida 1% e dicloridrato de N-naftilelilenodiamina 0,1% em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, na proporção 1:1) à temperatura ambiente por 10 minutos. A concentração de nitritos

nos sobrenadantes foi determinada a partir de uma curva-padrão de nitrito de sódio. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) com absorvância de 570 nm.

### 3.5 IMUNOCITOQUÍMICA

Células RAW264.7 foram semeadas em lâminas de cultura denominadas Cell Chambers (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) e expostas aos antígenos micobacterianos à concentração de 5 µg/mL, ou ao meio RPMI não estimulado por 48 horas. Após este período, o sobrenadante foi recolhido, e as células lavadas com PBS, sendo posteriormente fixadas durante 3 minutos por metanol. Após a fixação, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com a solução de bloqueio (PBS/soro normal de bloqueio). Logo após este período, foram novamente lavadas com PBS e incubadas com solução de bloqueio por 30 minutos em câmara úmida. Decorrido o tempo de bloqueio, a solução foi descartada e procedeu-se à incubação com os anticorpos primários anti-arginase (1/100) ou NOS2 (1/100) durante 30 minutos à temperatura ambiente (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Terminada esta etapa, as lâminas foram lavadas PBS e incubadas com as enzimas A (avidina) e B (HRP-biotinilado) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) por 30 minutos e novamente lavadas duas vezes com PBS para que se adicionasse o substrato peroxidase DAB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), que realizou sua reação durante 3 minutos. As lâminas foram lavadas com água destilada e contra-coradas com hematoxilina.

### 3.6 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE TNFR1 E TNFR2

Células RAW264.7 foram semeadas em placas de 48 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL, sendo incubadas com os antígenos do *M. tuberculosis* na concentração de 5 µg/mL. O controle negativo foi constituído por células da mesma linhagem não estimuladas com os antígenos.

Após 24 e 48 horas, os macrófagos RAW264.7 foram desprendidos dos poços com “cell scrapper” e lavados três vezes com PBS. As células foram ressuspensas em tampão de marcação (PBS / 0,1% NaN<sub>3</sub> / 2% SFB) contendo anticorpos anti-TNFR1 (3H3104) e anti-TNFR2 (TR75-89) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz,

USA) ou os isótipos controles correspondentes e incubadas por 30 min a 4°C no escuro. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de marcação e analisadas por citometria de fluxo usando FACSCalibur (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), sendo lidos ao menos 30000 eventos para as células RAW264.7.

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE RECEPTORES SOLÚVEIS DE TNF (sTNFR1 E sTNFR2) NO SOBRENADANTE DE CULTURA

A concentração dos receptores solúveis de TNF (sTNFR1 e sTNFR2) foi mensurada no sobrenadante das culturas de células RAW264.7 estimuladas com os diferentes antígenos, através do método de ELISA, utilizando-se o kit DuoSet ELISA Development (R&D Systems, Minneapolis, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, placas de ELISA (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-sTNFR1 ou anti-sTNFR2, diluídos em PBS, e incubadas por 18h a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com PBS contendo 1% BSA (PBS/BSA 1%), por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e as amostras, bem como os padrões da curva, adicionadas e incubadas por 18h a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas. Em seguida foi adicionado o anticorpo de detecção biotilado, diluído em PBS/BSA 1% e as placas incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas e o complexo detector formado pelo conjugado estreptavidina-peroxidase adicionado, e as placas incubadas por mais 20 minutos à temperatura ambiente. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) mais peróxido de hidrogênio (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) e incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura imediatamente realizada em leitor de placas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As concentrações dos receptores solúveis foram calculadas a partir da curva-padrão, obtida pelas diferentes concentrações dos padrões.

### 3.8 DOSAGEM DE CITOCINAS

A concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 foi avaliada no sobrenadante das culturas, de células RAW264.7 através do método de ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) indireto, conforme descrito pelo fabricante (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Brevemente, placas de ELISA (NUNC) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-10 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), diluídos em tampão fosfato, e incubadas por 18h entre 4-8°C. Após este período, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBST) e os sítios inespecíficos bloqueados com PBS contendo 10% SFB (PBS/SFB 10%, Gibco, Grand Island, N.Y., USA), por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente, as placas foram lavadas em PBST e as amostras, bem como os padrões da curva, adicionadas e incubadas por 18h a 4°C. Terminada a incubação as placas foram lavadas. Em seguida foi adicionado o anticorpo de detecção biotinilado (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), juntamente com o conjugado estreptavidina-peroxidase (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) diluído em PBS/SFB 10% e as placas incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente lavadas, e a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA) mais peróxido de hidrogênio (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany) e incubação por 20 minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1M e a leitura imediatamente realizada em leitor de placas (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices, USA) a 450 nm. As concentrações dos receptores solúveis foram calculadas a partir da curva-padrão, obtida pelas diferentes concentrações dos padrões.

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

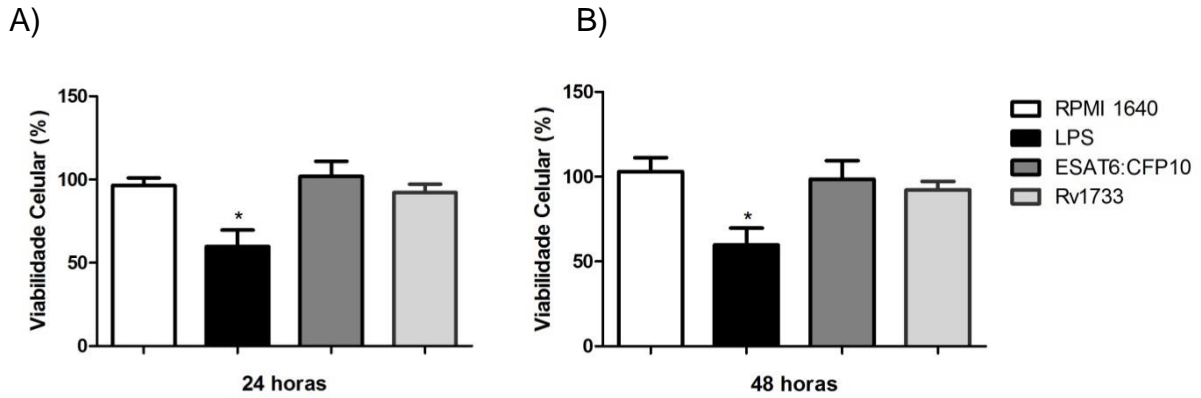
Para a análise estatística empregou-se ANOVA seguido do pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados indicativos de diferença estatística significativa entre os grupos estudados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 4 RESULTADOS

No presente trabalho buscou-se avaliar a reatividade imunológica da proteína de fusão recombinante ESAT6:CFP10, derivada da região RD1 do genoma micobacteriano (RENSHAW *et al.*, 2002), e do antígeno recombinante Rv1733, codificado pelo régulon DosR do *M. tuberculosis* (LEISTISKOW *et al.*, 2010). Para tanto, células RAW264.7 foram estimuladas com os antígenos recombinantes ESAT6:CFP10 e Rv1733 por 24 e 48 horas, sendo avaliadas a citotoxicidade antigênica, a produção de NO, bem como das enzimas iNOS e Arg-1. Também foram avaliadas as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, juntamente com a expressão dos receptores de membrana mTNF-R1 e mTNF-R2 com suas respectivas frações solúveis.

### 4.1 CITOTOXICIDADE

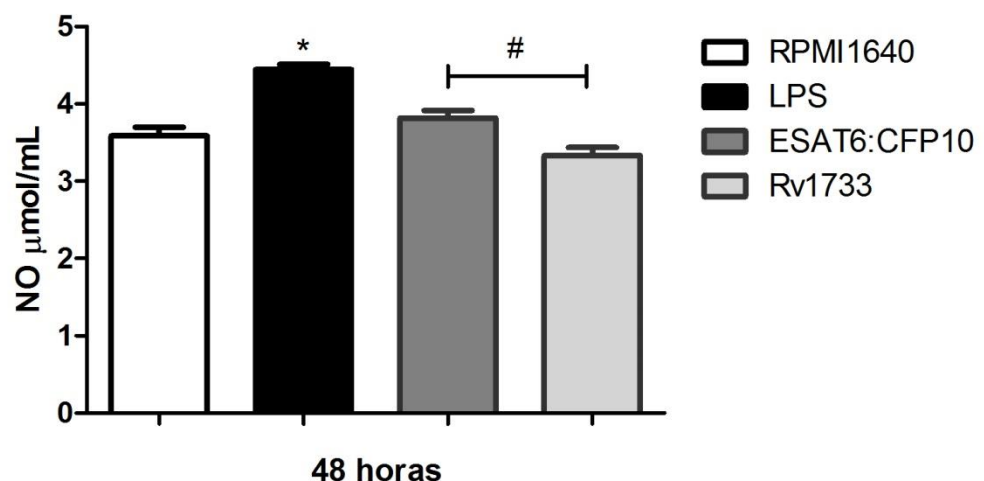
O primeiro teste realizado foi o ensaio do MTT, visando avaliar a possibilidade de os antígenos testados possuírem ação citotóxica sobre as células RAW264.7. As células foram semeadas à concentração de  $2 \times 10^5$ /mL e incubadas com os antígenos recombinantes ESAT6:CFP10 e Rv1733 à concentração de 5 $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos demonstraram que, nos períodos de incubação de 24 e 48 horas, nenhum dos antígenos estudados influenciaram de modo significativo a viabilidade da linhagem celular RAW264.7 (Fig. 2).



**Figura 2.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com lipopolissacáride (LPS) ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ ) por A) 24 e B) 48 horas. A viabilidade celular foi medida utilizando-se o ensaio de MTT. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SME. \* =  $p < 0,05$ ; versus controle negativo (RPMI 1640).

#### 4.2 PRODUÇÃO DE NO

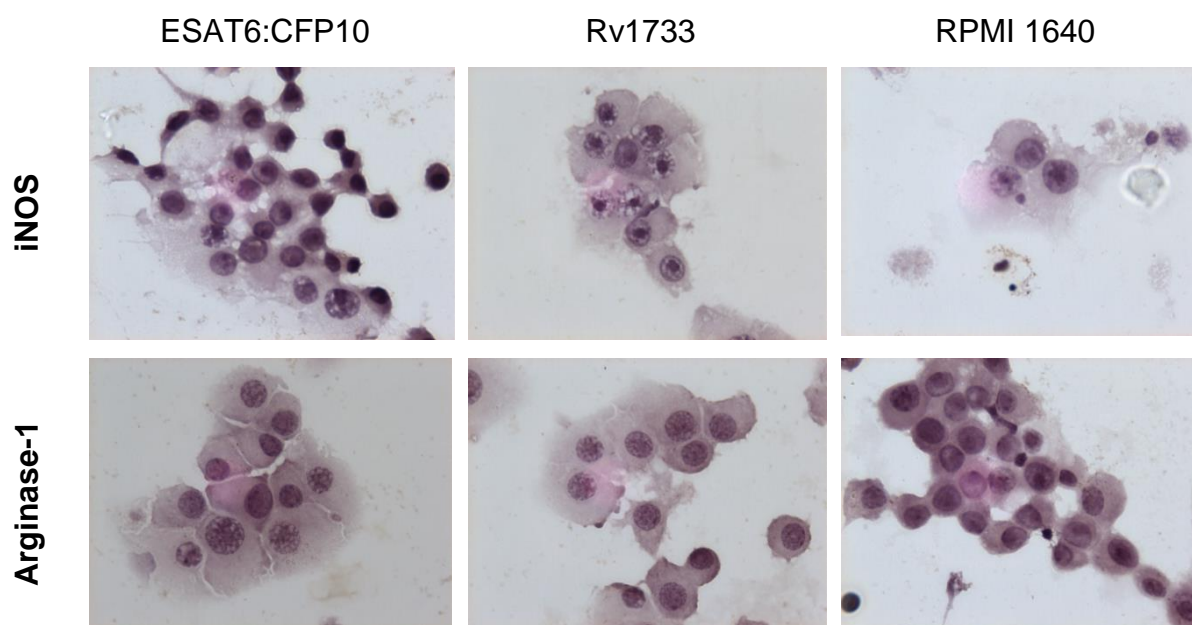
A seguir foi avaliada a produção de NO pelas células em resposta aos antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733. A figura 3 mostra que a presença dos antígenos nas culturas não modificou a produção de NO após 48 horas de cultura das células RAW264.7 em meio RPMI. O LPS, usado como controle positivo, induziu um aumento significativo na produção de NO, em relação ao grupo controle RPMI. A figura 2 mostra que a indução de NO foi menor na presença do antígeno Rv1733.



**Figura 3.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com lipopolissacáride (LPS) ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ ) por 48 horas. A produção de NO foi avaliada indiretamente através do método de Griess. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SME. \* =  $p < 0,05$  versus controle (RPMI); # =  $p < 0,05$ .

### 4.3 DETECÇÃO DE iNOS E ARGINASE-1

A expressão das enzimas iNOS (óxido nítrico sintase induzível), indicativo de um perfil pró-inflamatório (macrófagos M1) e arginase-1, indicativa de um perfil anti-inflamatório (macrófagos M2) foi avaliada em células RAW264.7 cultivadas por 48 horas na presença dos antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733. A figura 4 sugere que os antígenos estudados não possuem capacidade de indução para nenhum dos perfis, o que é verificado pela ausência da marcação positiva para as enzimas iNOS e Arginase-1.

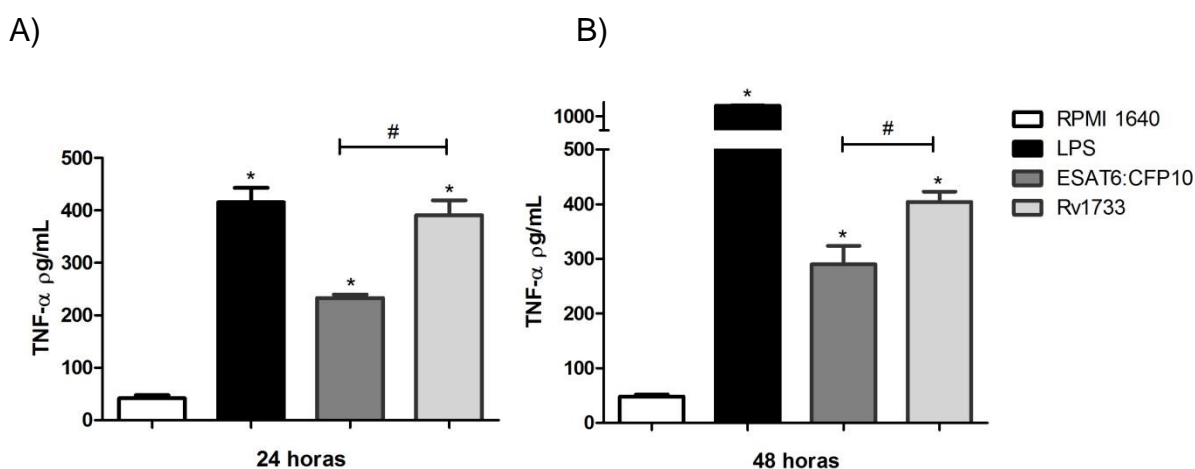


**Figura 4.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com nenhum estímulo por 48 horas. A expressão das enzimas iNOS e Arginase-1 foi realizada através da técnica de imunocitoquímica, conforme o manual do fabricante.



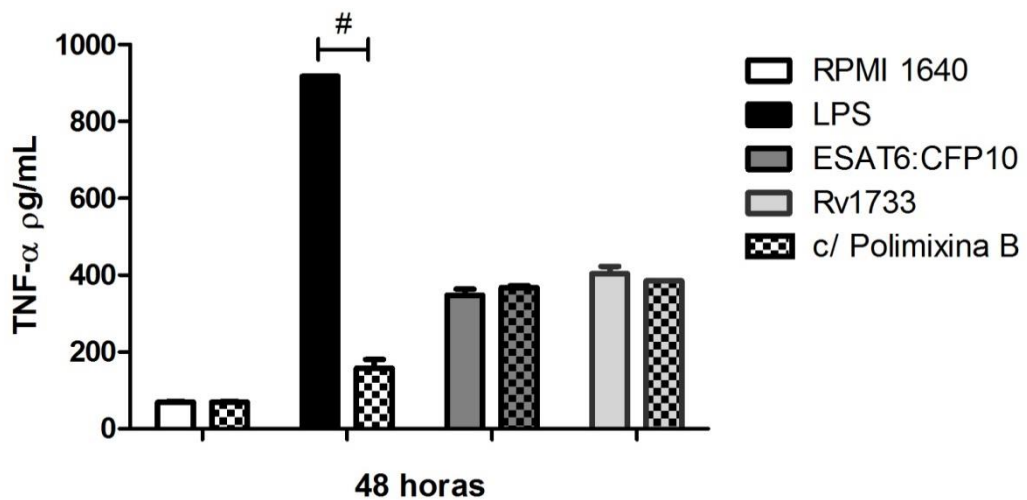
#### 4.4 DOSAGEM DE TNF- $\alpha$

Em seguida, foi avaliado se os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 tem a capacidade de modular a produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos. Células RAW264.7 foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ou com lipopolissacáride (LPS) por 24 e 48 horas, sendo a produção de TNF- $\alpha$  avaliada através do método de ELISA. No tempo de 24 horas após o estímulo, observou-se que tanto a proteína híbrida ESAT6:CFP10 como o antígeno Rv1733 induziram aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação ao controle não estimulado (Fig. 5A). Além disso, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os níveis de TNF- $\alpha$  induzidos por cada antígeno, sendo que o antígeno Rv1733 induziu significativamente mais TNF- $\alpha$  do que o antígeno ESAT-6. O padrão de resposta no tempo de 48 horas (Fig. 4B) foi similar, com maior produção de TNF- $\alpha$  induzida pelo antígeno RV1733 quando comparado ao ESAT6:CFP10 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 5.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5/\text{mL}$ ) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com lipopolissacáride (LPS) ( $100\text{ ng}/\text{mL}$ ) por A) 24 e B) 48 horas. A produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada através do método de ELISA. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SME. \* =  $p < 0,05$  versus controle (RPMI); # =  $p < 0,05$ .

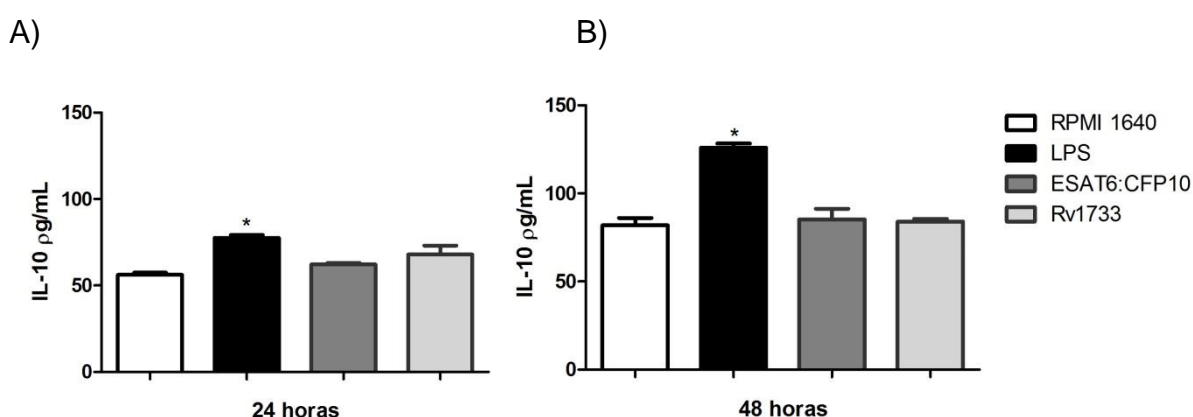
Devido ao método de obtenção dos antígenos recombinantes, fez-se necessária a verificação da possibilidade de contaminação por LPS, o que poderia estar influenciando os resultados de TNF- $\alpha$ . Para tal, procedeu-se à incubação da cultura de células RAW264.7 com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733, na presença ou ausência de 10 $\mu$ g/mL de polimixina B por 48 horas (Fig. 6). Os resultados demonstram que não havia contaminação por LPS significativa que pudesse a influenciar os resultados obtidos.



**Figura 6.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 (5 $\mu$ g/mL) ou com lipopolissacáride (LPS) (100 ng/mL) na presença ou ausência de 10 $\mu$ g/mL de polimixina B por 48 horas. A produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada através do método de ELISA. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SME. # =  $p < 0,05$  estímulo versus estímulo com polimixina B.

#### 4.5 DOSAGEM DE IL-10

Nesta etapa, foi avaliado se os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 teriam a capacidade de estimular a produção de IL-10. Para tal, realizou-se a dosagem da mesma 24 e 48 horas após a estimulação com os antígenos. Os resultados apresentados na figura 6 demonstram que os antígenos avaliados não induzem aumento significativo de IL-10 em células RAW264.7 após 24 ou 48 horas de cultura, não havendo diferença na indução de IL-10 entre os dois antígenos estudados.



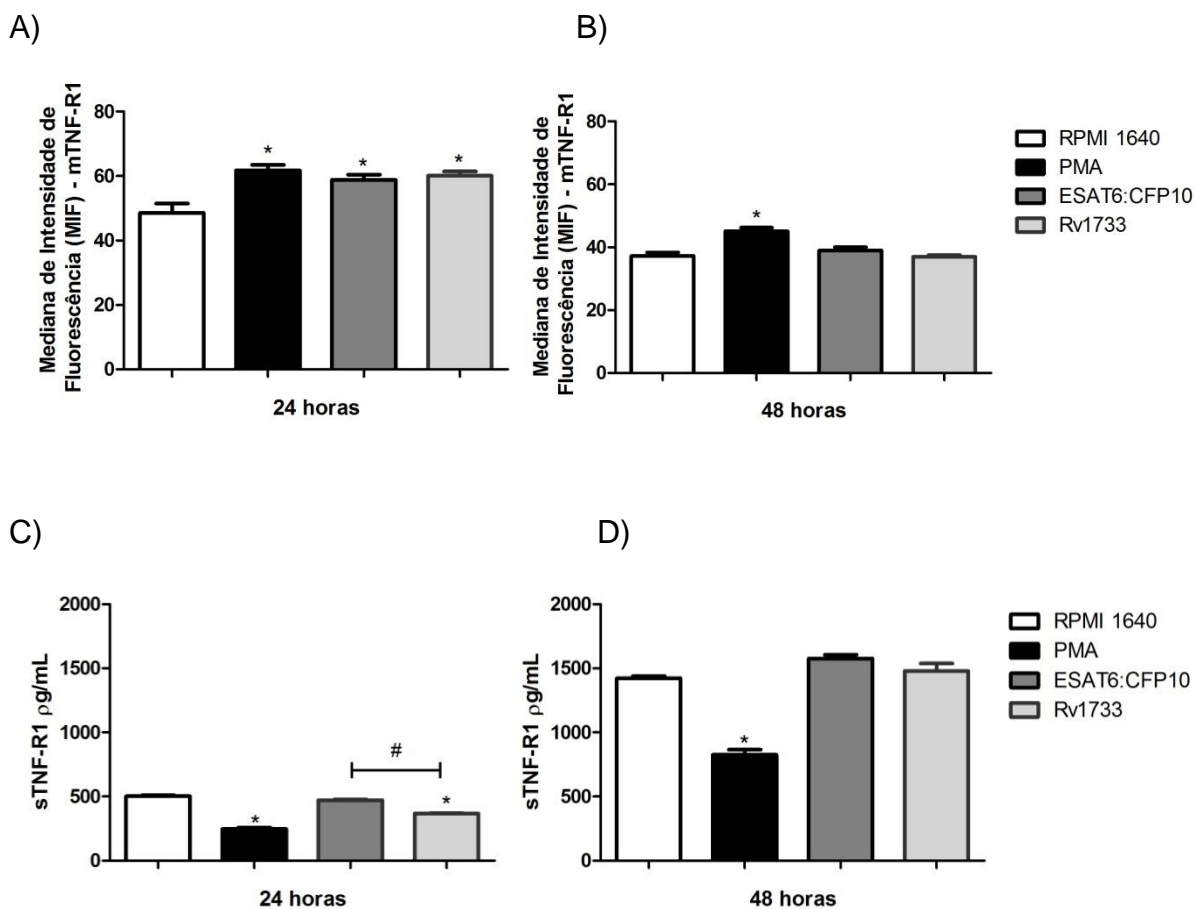
**Figura 7.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5/\text{mL}$ ) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com lipopolissacáride (LPS) ( $100\text{ ng}/\text{mL}$ ) por A) 24 e B) 48 horas. A produção de IL-10 foi avaliada através do método de ELISA direto. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SME. \* =  $p < 0,05$  versus controle (RPMI).

#### 4.6 AVALIAÇÕES DOS RECEPTORES DE TNF- $\alpha$ NAS CÉLULAS RAW264.7

As atividades biológicas do TNF- $\alpha$  são mediadas por dois receptores de superfície celular distintos, TNF-R1 e TNF-R2. A ligação do TNF- $\alpha$  a esses receptores inicia vias de sinalização que podem levar tanto a sobrevivência como a morte da célula (SCHLUTER; DECKERT, 2000). Receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (sTNF-R) possuem a capacidade de atenuar ou promover a sinalização, atuando como reguladores importantes da inflamação e imunidade. A relação entre o TNF- $\alpha$  e seus receptores solúveis é crítica para a regulação da atividade do TNF- $\alpha$  nos sítios de inflamação. Estudos tem demonstrado como o *M. tuberculosis* pode modular a relação do TNF com seus receptores (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al.*, 1998). Portanto, a seguir, foi avaliada a expressão dos receptores TNF-R1 e TNF-R2 em, bem como a

concentração das formas sTNF-R1 e sTNF-R2 em células RAW264.7 estimuladas por 24 ou 48 horas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733

Em relação ao TNF-R1, no tempo de 24 horas (Figura 8A), houve aumento na expressão do receptor de membrana tanto para ESAT6:CFP10 ( $p < 0,05$ ), quanto para Rv1733 ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença estatística significativa entre os dois antígenos estudados, sugerindo igual capacidade de aumento de expressão do TNF-R1 no tempo avaliado. No tempo de 48 horas (Fig. 8B), houve tendência em diminuir a expressão do receptor de modo geral, mas nenhum estímulo promoveu diferença significativa em relação ao controle negativo. No tempo de 48 horas, a expressão de TNFR1 na membrana das células não aumentou significativamente para nenhum dos antígenos avaliados, indicando uma diminuição na expressão superficial do TNFR1 entre 24 e 48 horas. A figura 8C mostra que no período de 24 horas a proteína híbrida ESAT6:CFP10 não alterou os níveis de sTNF-R1. Entretanto, o antígeno Rv1733 promoveu uma redução de sTNF-R1 em comparação com o controle não-estimulado ( $p < 0,05$ ) e em relação ao antígeno ESAT6-CFP10 ( $p < 0,05$ ). No tempo de 48 horas (Fig. 8D), nota-se um aumento na concentração do sTNF-R1 no sobrenadante de cultura em relação ao tempo inicial.

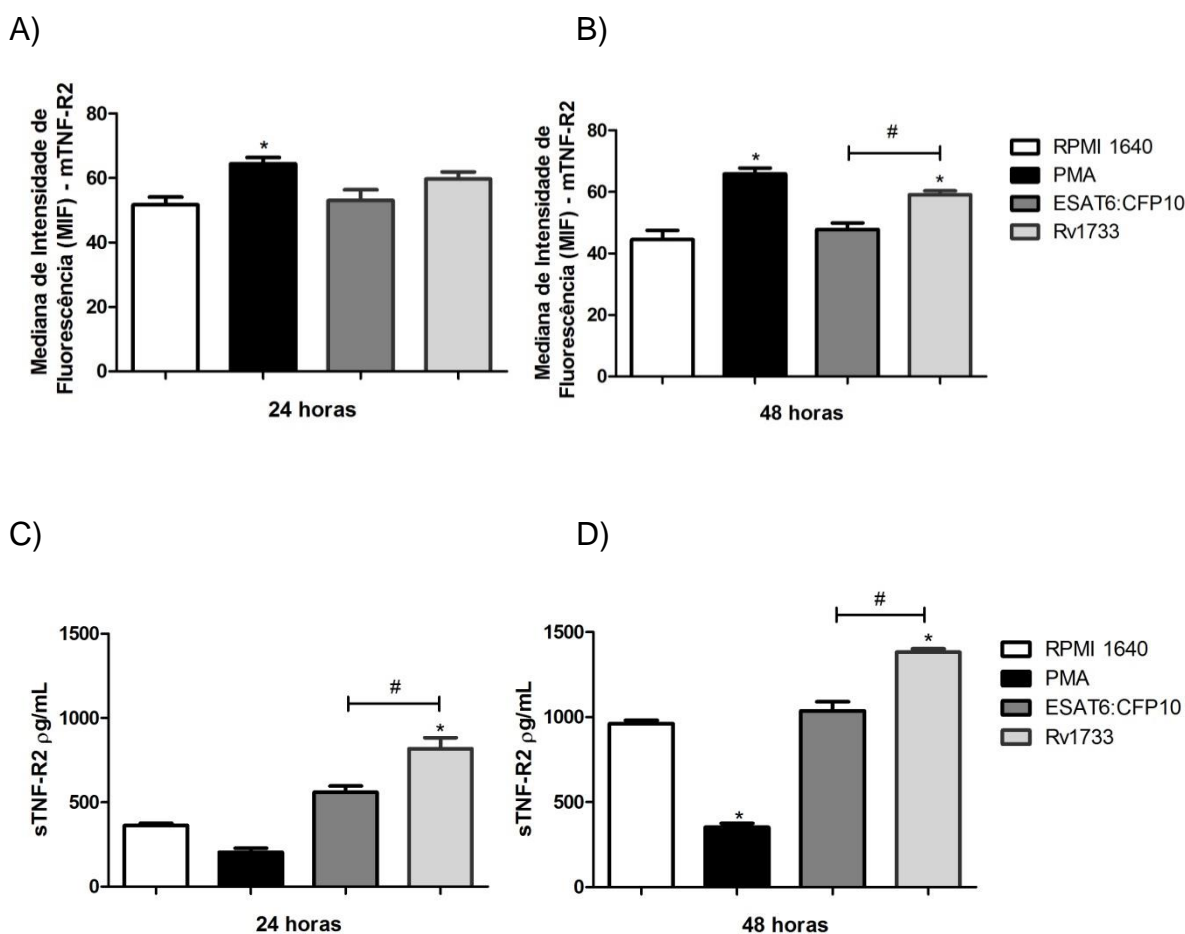


**Figura 8.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5$ /mL) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) ou com PMA ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ ) por 24 e 48 horas. A análise da expressão dos receptores de superfície TNF-R1 foi feita utilizando-se citometria de fluxo. Média de intensidade de fluorescência após A) 24 horas e B) 48 horas. A concentração de sTNFR1 foi avaliada por ELISA após A) 24 horas e B) 48 horas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$  versus controle (RPMI); # =  $p < 0,05$ .

Em relação ao TNF-R2, foi verificado que após 24 horas (Fig. 9A) a expressão deste receptor na superfície de células RAW264.7 não aumentou significativamente após o estímulo com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733. Entretanto, após 48 horas (Fig. 9B) o antígeno Rv1733 induziu expressão de TNF-R2 significativamente maior em comparação com o controle não estimulado ( $p < 0,05$ ). Além disso, o antígeno Rv1733 induziu maior expressão de TNF-R2 na superfície das células RAW264.7, quando comparado ao ESAT6:CFP10 ( $p < 0,05$ ).

Em relação ao sTNF-R2, em 24 horas de cultura (Fig. 9C), apenas os antígenos Rv1733 aumentou significativamente a concentração deste receptor quando comparado ao controle não-estimulado ( $p < 0,05$ ). Além disso, o antígeno Rv1733 induziu significativamente maior concentração de sTNFR2 em relação ao

ESAT6:CFP10 ( $p < 0,05$ ) embora este tenha apresentado uma tendência em aumentar a concentração de sTNF-R2, em relação ao controle não estimulado. Quando a análise se estende ao tempo de 48 horas (Fig. 9D), observou-se um aumento significativo na concentração dos receptores sTNF-R1 e sTNF-R2 apenas com o antígeno Rv1733, em relação ao controle negativo, e em relação ao ESAT6:CFP10 ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9.** Células RAW264.7 ( $2 \times 10^5/\text{mL}$ ) foram tratadas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 ( $5\mu\text{g/mL}$ ) ou com PMA ( $100 \text{ ng/mL}$ ) por 24 e 48 horas. A análise da expressão dos receptores de superfície TNF-R2 foi feita utilizando-se citometria de fluxo. Média de intensidade de fluorescência após A) 24 horas e B) 48 horas. A concentração de sTNFR2 foi avaliada por ELISA após A) 24 horas e B) 48 horas. Os dados foram expressos como média  $\pm$  SEM. \* =  $p < 0,05$  versus controle (RPMI); # =  $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi investigada a influência dos antígenos específicos do *Mycobacterium tuberculosis*, ESAT6:CFP10 e Rv1733, na produção de TNF- $\alpha$  e seus receptores, utilizando-se células RAW264.7. Com antígenos exibindo características biológicas distintas, o estudo de sua influência sobre a produção de TNF- $\alpha$ , bem como sobre a expressão de seus receptores é de grande importância, pois o TNF- $\alpha$  tem forte participação no controle da infecção pelo *M. tuberculosis*.

Neste trabalho, foi demonstrado que a proteína de fusão ESAT6:CFP10 e o antígeno recombinante Rv1733, não exercem efeito direto sobre a viabilidade das células estudadas na concentração avaliada. Tal fato encontra-se em concordância com experimento similar utilizando-se o antígeno micobacteriano de fase ativa Rv0652 (KIM *et al.*, 2012), no qual em nenhum dos tempos de incubação houve perda de viabilidade das células. Além disso, em experimento utilizando-se linfócitos T humanos estimulados com anti-CD3 e anti-CD28 e submetidos a concentrações crescentes dos antígenos ESAT6 ou CFP10, Wang *et al.* (2009) observaram que não houve perda de viabilidade celular em 48 horas de cultura.

A produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs) e de nitrogênio (RNIs) pelas células do sistema imunológico inato é considerada como mecanismo de defesa do hospedeiro relativamente efetivo contra patógenos microbianos. O óxido nítrico é formado quando o nitrogênio da L-arginina é oxidado pela família de isoenzimas conhecidas como NO sintases (NOSs) (LONG; LIGHT; TALBOT, 1999). O aumento da produção de NO em resposta a citocinas ou a moléculas derivadas de patógenos está relacionado com a defesa do hospedeiro contra microrganismos intracelulares como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium leprae* e *Mycobacterium tuberculosis* (CHAN *et al.*, 1995; FANG, 1997). Neste trabalho foram avaliados os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 possuíam a capacidade de induzir a produção de NO por células RAW264.7. Os antígenos foram utilizados puros, diretamente sobre a cultura de células, sendo demonstrado que sob as condições testadas, os antígenos não induziram a produção de NO, apesar do antígeno Rv1733 apresentar uma tendência em inibir essa produção. Em trabalho publicado por Singh *et al.* (2004), no qual utilizou-se o antígeno ESAT-6 e células J774.A1, também não foi observado alteração da produção de NO na presença de ESAT-6 e de LPS. Com

o acréscimo de IFN- $\gamma$ , os autores detectaram aumento da produção da enzima iNOS durante o processo. Trajkovic et al. (2002) utilizando CFP-10 e células J774.A1, também verificaram que o antígeno sozinho ou na presença de LPS, não altera a produção de NO em duas horas de incubação, porém, verificou que o pré-tratamento das células com o antígeno por 18 horas antes da exposição ao LPS leva a um decréscimo significativo na produção de NO, sendo que a mesma pré-incubação não foi capaz de inibir a produção de NO frente à adição de IFN- $\gamma$ . Em estudo realizado por Pathak et al. (2003), foi demonstrado que a proteína ESAT-6 possui a capacidade de ligação ao receptor TLR-2 na superfície de macrófagos, causando inibição da ativação do NF- $\kappa$ B e fatores reguladores do interferon, através da atividade da via da quinase Akt (LEE; SCHOREY, 2005). O fator de transcrição NF- $\kappa$ B possui um papel importante na contenção de infecções através da indução de diversas citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-12, INF- $\gamma$  e óxido nítrico sintase 2, sendo assim, é um alvo crítico para patógenos (PATHAK *et al.*, 2003). Além de não detectar alteração significativa na produção de NO após estimulação com ESAT6:CFP10 e Rv1733, nossos resultados demonstraram que não houve modificação na expressão da enzima iNOS em resposta aos antígenos estudados. Foi avaliada também a expressão da enzima arginase-1, que compartilha o mesmo substrato com a iNOS, porém, como resultado final, tem-se L-ornitina e ureia, sendo uma característica dos macrófagos alternativamente ativados (LOKE *et al.*, 2002). Deste modo, não ocorrendo modificação nas expressões enzimáticas características do perfil pró-inflamatório, representado pela iNOS, e anti-inflamatório, representado pela Arg-1, nenhum dos antígenos foi capaz de promover alterações no fenótipo de ativação das células estudadas.

## 5.1 PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$

***Produzido por macrófagos, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e algumas células epiteliais, o TNF- $\alpha$  pode coordenar a resposta inflamatória através da indução de outras citocinas, tais como IL-1 e IL-6, e modular o recrutamento de células imunológicas através da indução da liberação de quimiocinas e aumento na expressão de moléculas de adesão (ROACH et al., 2002). Modelos experimentais***



***demonstraram que o TNF- $\alpha$  executa um papel importante não apenas na resposta do hospedeiro contra o *Mycobacterium tuberculosis*, mas também, na imunopatologia da tuberculose (DAMBUZA et al., 2008). Sua deficiência, ou mesmo queda nos níveis de seus receptores, são fatores contribuintes para a susceptibilidade (BEAN et al., 1999) ou reativação da doença, tal como ocorre em pacientes sob tratamento para artrite reumatoide (MOHAN et al., 2004).***

Os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 foram capazes de aumentar a produção de TNF- $\alpha$  por células RAW264.7. Achados similares foram obtidos para o antígeno 85B, também usando células RAW264.7 (AUNG et al., 1996), e para o antígeno Rv0652 utilizando macrófagos derivados de medula óssea (KIM et al., 2012). Cardoso et al. (2007), tiveram resultados semelhantes utilizando antígenos recombinantes de *Schistosoma mansoni* em experimentos com PMBCs de indivíduos com esquistosomose. Os resultados obtidos, também entram em consonância com os trabalhos de Trajkovic et al. (2002) e de Singh et al. (2004), nos quais os antígenos CFP10 e ESAT6 estimularam a produção de TNF- $\alpha$  após 24 horas de incubação. A virulência do *Mycobacterium tuberculosis*, bem como de micobactérias patogênicas relacionadas, está, em parte, associada à secreção das proteínas ESAT-6 e CFP-10, originalmente sob a forma do complexo ESAT6:CFP10, (CONVERSE; COX, 2005) durante a fase ativa da doença. Em experimentos utilizando-se células dendríticas derivadas de camundongos C57BL/6, Zhang et al. (2013) demonstraram que em diferentes tempos de cultura, a infecção por *M. bovis* virulento produz níveis elevados de TNF- $\alpha$ , quando comparados com a cepa atenuada *M. bovis* BCG. Como a cepa virulenta possui a região RD1, e conseqüentemente os antígenos ESAT6 e CFP10, inclusive em sua forma complexada, os dados obtidos corroboram com as observações realizadas neste estudo. Em especial, o antígeno ESAT-6 pode promover dentre outras funções a diferenciação para o perfil Th17 e contribuir para uma proteção aumentada contra o desafio pelo *M. tuberculosis* (CHATTERJEE et al., 2011). Richmond et al. (2012), estudando esplenócitos de camundongos C57BL/6 incubados com manose recoberta por lipoarabinomanana (ManLAM), não detectaram produção significativa de TNF- $\alpha$  em relação ao controle. Embora o ManLAM seja um fator relacionado à virulência e disponível durante a fase ativa da doença, os níveis de TNF- $\alpha$  encontrados não foram elevados, o que de acordo com os autores ocorreu

devido ao maior aumento na fração sTNF-R2 ligada ao TNF- $\alpha$ , diminuindo assim a concentração da forma bioativa do TNF- $\alpha$ . Outra associação interessante, pode ser feita com o trabalho realizado por Engele et al. (2002), no qual foi demonstrado que nas fases iniciais da infecção pelo *M. tuberculosis*, a secreção de TNF- $\alpha$  pode vir a ser mais benéfica para o patógeno, do que para o hospedeiro. Em seu trabalho, foi observado que macrófagos derivados de medula óssea infectados com MOIs crescentes de *M. tuberculosis* exibiam aumento na secreção e produção intracelular de TNF- $\alpha$  acompanhados pelo aumento na carga bacteriana, juntamente com sua atividade metabólica de modo tempo-dependente. Tais observações, podem se correlacionar com os resultados obtidos por nosso grupo de pesquisa em relação ao ESAT6:CFP10, uma proteína secretada na fase inicial do processo infeccioso, e que demonstrou-se capaz de induzir significativamente a produção de TNF- $\alpha$ . Além disso, proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis* tem importante papel na liberação sustentada de TNF- $\alpha$ , o que pode vir a ser um fator de persistência para a micobactéria no interior dos macrófagos, ocorrendo destruição tecidual, resultando em disseminação do bacilo (TRAJKOVIC *et al.*, 2002).

Em relação ao antígeno Rv1733, as condições que determinam sua expressão são diferentes das que influenciam a expressão das proteínas associadas aos genes da região RD1. Ambientes nos quais prevalecem gases divalentes, tais como NO e CO, favorecem o processo transcricional dos genes pertencentes ao regulon DosR (CHEN *et al.*, 2013). Neste contexto, a formação dos granulomas é de extrema importância. Tais estruturas limitam o crescimento micobacteriano a partir da restrição ao acesso ao oxigênio e nutrientes, ao mesmo tempo em que promove a exposição do bacilo a um ambiente de pH ácido e a moléculas efetoras da resposta imunológica, tais como o NO. Assim, o bacilo pode não ser necessariamente erradicado no organismo infectado, mas submetido a uma condição na qual se adapta a um estado de bacteriostase ou replicação lenta, o qual pode persistir por muitos anos, até que algum agente restaure as condições que permitam a sua replicação normal (RUSTAD *et al.*, 2009). O TNF exerce seus efeitos no granuloma a partir de sua influência sobre processos como tráfego de células T e sua ativação. Estudos utilizando granulomas formados a partir de *M. bovis* BCG em camundongos demonstraram que o TNF- $\alpha$  é essencial para o recrutamento de células T e para a retenção de macrófagos não-infectados no complexo granulomatoso (EGEN *et al.*, 2008). Agentes que neutralizem

a citocina, tais como os medicamentos anti-TNF (etanercept e infliximab) utilizados no tratamento de doenças como artrite reumatoide, podem ter influência no processo de reativação da tuberculose, podendo desestabilizar a estrutura do granuloma (KEANE, GERSHON, BRAUN, 2002). Em termos terapêuticos, embora a neutralização do TNF- $\alpha$  leve à reativação da doença, o tratamento adjunto utilizando-se os inibidores da citocina juntamente com o tratamento padrão contra a tuberculose pode paradoxalmente ser benéfico para o hospedeiro, pois os níveis de TNF- $\alpha$  aumentam logo após o início da quimioterapia, levando à destruição tecidual, criando um microambiente favorável à sobrevivência micobacteriana (BLACKMORE *et al.*, 2008; WALIS; VAN VUUREN; POTGIETER, 2009).

Os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 foram capazes de induzir uma resposta imunológica voltada para um perfil pró-inflamatório, com a produção de TNF- $\alpha$ , citocina pertencente ao padrão M1 de polarização de macrófagos. Contudo, não há a caracterização do perfil M1 propriamente dito, pois não foi detectado aumento da produção de NO e nem de iNOS nas células estimuladas com os antígenos.

## 5.2 PRODUÇÃO DE IL-10

A IL-10 é uma importante citocina imunorregulatória produzida principalmente por macrófagos, monócitos, células Th2, células B, células dendríticas, mastócitos e eosinófilos (OUYANG *et al.*, 2011). A IL-10 tem um papel essencial durante o estágio latente da tuberculose, como demonstrado por Turner *et al.* (2002), em modelo de infecção crônica, sendo que sua produção elevada em camundongos transgênicos e CBA/J levaram ao aumento da carga bacilar e diminuição da expressão da molécula CD11a em linfócitos T CD4 em modelo de infecção pulmonar crônica. A IL-10 potencialmente auxilia a persistência do *M. tuberculosis* em humanos através do bloqueio da maturação dos fagossomos nos macrófagos (O'LEARY; O'SULLIVAN; KEANE, 2011).

Diversos estudos demonstraram que a IL-10 influencia negativamente a produção de TNF- $\alpha$  (CLARKE, *et al.*, 1998; BRENNAN, *et al.*, 2008). Smallie *et al.* (2010), demonstraram que a IL-10 inibe produção de TNF- $\alpha$  através da inibição do recrutamento da quinase dependente de ciclina 9 (CDK9) mediada pela sub-unidade p65 do NF- $\kappa$ B em direção aos sítios específicos para TNF- $\alpha$ , prevenindo a fosforilação

da RNA polimerase II, e sua consequente transcrição. No presente trabalho, não foi observada a indução da produção de IL-10 por nenhum dos antígenos testados. Tal resultado, está de acordo com os resultados obtidos para o CFP-10 no estudo realizado por Trajkovic et al. (2002), e está em concordância, também, com os resultados obtidos para TNF- $\alpha$  neste estudo, confirmando que in vitro tais antígenos possuem maior tendência em participar de processos pró-inflamatórios do que naqueles em que a resposta imunológica é suprimida.

### 5.3 RECEPTORES DE TNF- $\alpha$

O TNF- $\alpha$  é um potente regulador das funções celulares, através de efeitos como liberação de citocinas, proliferação, diferenciação celular e apoptose. O TNF- $\alpha$  é sintetizado como uma proteína transmembrana tipo II (mTNF), formando homotrímeros estáveis na membrana plasmática. A subsequente clivagem proteolítica do ectodomínio pela enzima TACE/ADAM17, resulta na liberação dos trímeros solúveis de TNF (sTNF), que exercerão suas funções através da estimulação de seus dois receptores, TNF-R1 e TNF-R2 (GRELL *et al.*, 1998). A regulação dos receptores de TNF- $\alpha$  pode ser alcançada através da produção de receptores solúveis, sTNF-R1 e sTNF-R2 (RICHMOND *et al.*, 2012). Os resultados obtidos mostram que, em 24 horas de estimulação, ambos os antígenos testados promoveram um aumento significativo da expressão do receptor de membrana mTNF-R1, enquanto que em culturas de 48 horas essa diferença deixou de existir de forma significativa. O papel principal do mTNF-R1 está associado à morte celular por apoptose (HSU *et al.*, 1996), sendo assim, o aumento na expressão do receptor TNF-R1 sugere uma possível estratégia de defesa do hospedeiro, levando à apoptose das células infectadas. Em trabalho publicado por Rodrigues et al. (2013), observou-se baixa expressão do mTNF-R1 após 3 dias de infecção por *M. bovis* em camundongos C57BL/6, o que foi associado à reduzidas taxas de apoptose de macrófagos, juntamente com o aumento na fração solúvel do receptor de TNF. Além disso, camundongos deficientes para TNF-R1 apresentaram índices menores de apoptose de macrófagos alveolares no terceiro dia após a infecção por *M. bovis* BCG, o que indica a importância deste receptor na indução de apoptose na fase inicial da infecção micobacteriana. Tais observações estão em consonância com os os resultados obtidos no presente

trabalho, especialmente em relação à proteína de fusão ESAT6:CFP10, que é típica da fase ativa da doença, sendo secretada no interior dos fagossomos. Paland et al. (2008), mostraram que a infecção por *Chlamydia trachomatis* leva à diminuição da expressão de TNF-R1 na superfície de células HEp-2, sem afetar os demais receptores da família do TNF, acarretando em agravo da infecção, o que pode estar relacionado a um mecanismo de sequestro do receptor pela bactéria. Quadro semelhante foi descrito em experimentos com camundongos deficientes em TNF-R1, em modelo de infecção intravenosa por *Klebsiella pneumoniae*, demonstrando elevado grau de mortalidade e produção excessiva de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, ligadas à hiper-ativação das linhagens linfocíticas esplênicas (MOORE et al., 2003).

O aumento da expressão de mTNF-R1 correlacionou com uma diminuição de sua forma solúvel (sTNF-R1), em culturas de células RAW estimuladas com Rv1733 por 24 horas. Por outro lado, a proteína híbrida ESAT6:CFP10 não provocou alteração na expressão de mTNF-R1 ou sTNF-R1 em 24 ou 48 horas de estimulação. Uma provável explicação para o ocorrido pode ser a maior produção de TNF- $\alpha$  por parte do antígeno Rv1733, fazendo com que houvesse maior recrutamento e menor clivagem proteolítica do receptor de TNF por parte da enzima TACE. Foi descrito que a expressão do mTNF-R1 pode sofrer influência da atividade metabólica bacteriana, especialmente através do bloqueio da via ERK1/2, que também é responsável pelo controle da atividade da enzima TACE (PALAND et al., 2008).

Células RAW, após 48 horas de cultura, tiveram aumento na expressão de TNF-R2 apenas em resposta ao antígeno Rv1733. Interessantemente, os resultados do presente trabalho mostram que mesmo não havendo modificação na expressão do receptor de membrana após 24 horas de cultura, houve aumento na concentração de sua forma solúvel após 24 e 48 horas de estímulo com Rv1733. Tanto o aumento da expressão, quanto da liberação da forma solúvel do receptor podem estar associados com um mecanismo de proteção do hospedeiro, visando a sobrevivência e proliferação celular, bem como o impedimento de efeitos deletérios do TNF- $\alpha$  através de sua neutralização. Utilizando-se de sequências de dinucleotídeos bacterianos CpG, Jin et al. (2000) verificaram aumento nos níveis de mRNA e expressão dos receptores mTNF-R1 e mTNF-R2 em células RAW264.7 de modo tempo-dependente. Os autores observaram também aumentos nos níveis de sTNF-R1 e sTNF-R2,

correlacionando com a diminuição da bioatividade do TNF- $\alpha$  devido a ligação com as formas solúveis dos receptores. Hamilton et al.(2011) demonstraram que em inflamações associadas ao câncer colo-retal, a IL-6 e o TNF- $\alpha$  promovem a expressão do receptor mTNF-R2 através de STAT3 e seus sítios de ligação consensuais na região promotora do receptor do TNF-R2. Os autores observaram aumento do mRNA do TNF-R2, bem como sua expressão, juntamente com o aumento de sTNF-R2 em resposta a níveis aumentados das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6. Richmond et al. (2012) mostraram que um mesmo antígeno pode se comportar de modo diferente sobre as formas transmembrana e solúvel de um dado receptor. Neste contexto, o estímulo com ManLAM demonstrou ser capaz de diminuir a expressão do mTNF-R1, enquanto não provocou alterações significativas na forma sTNF-R1. Embora exista a possibilidade de internalização do receptor, como discutido por Schütze, et al. (2008). Richmond et al. (2012), demonstraram uma característica interessante do antígeno, a de agir de modo independente sobre as formas transmembrana e solúvel de um mesmo receptor. Embora os dados obtidos no presente trabalho não correspondam às expectativas iniciais, algumas propriedades interessantes foram observada para os antígenos testados. A proteína híbrida ESAT6:CFP10, promoveu o aumento na expressão do mTNF-R1 em 24 horas, não alterando sua fração solúvel no mesmo tempo de cultura. Além disso, a elevação nos níveis de mTNF-R2 e sTNF-R2 causados pelo antígeno Rv1733 demonstra um achado interessante, no qual o antígeno de latência ao mesmo tempo que eleva os níveis de TNF- $\alpha$ , promove uma resposta relacionada à sobrevivência celular e diminuição da bioatividade da citocina.

## 6 CONCLUSÕES

- 1) Os antígenos recombinantes ESAT6:CFP10 e Rv1733 não se mostraram citotóxicos para a linhagem celular RAW264.7 nos tempos de cultura avaliados.
- 2) Não houve alteração nos níveis de NO após estimulação das células RAW264.7 com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733, ocorrendo, no entanto, uma tendência do antígeno Rv1733 de promover uma diminuição em sua produção.
- 3) Os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733 promoveram aumento da secreção de TNF- $\alpha$  em células RAW264.7, sendo o Rv1733 o que melhor induziu a secreção desta citocina.
- 4) Não houve alteração na produção de IL-10 em células RAW264.7 estimuladas com os antígenos ESAT6:CFP10 e Rv1733, em nenhum dos tempos avaliados.
- 5) Os antígenos usados não modificaram a expressão das enzimas iNOS e Arg-1 em macrófagos RAW264.7, não havendo, desta forma, polarização para um perfil M1 ou M2.
- 6) Os antígenos estudados foram capazes de aumentar a expressão dos receptores mTNF-R1 e mTNF-R2 em células RAW264.7. O antígeno ESAT6:CFP10 induziu aumento do mTNF-R1 apenas nas primeiras 24 horas de cultura. O antígeno Rv1733 induziu aumento da expressão do mTNF-R2 em ambos os tempos (24 e 48 horas) de cultura. Tal aumento na expressão do mTNF-R2 sugere uma modificação no comportamento celular, visando ativação, proliferação e sobrevivência.
- 7) Apenas o antígeno Rv1733 promoveu modificações nas concentrações das formas sTNF-R1 e sTNF-R2 dos receptores de TNF- $\alpha$ . Para o sTNF-R1, apenas após 24 horas de estímulo houve diminuição de sua concentração, correlacionando-se com o

aumento em sua expressão de membrana. Em relação ao sTNF-R2, foi observado aumento em ambos os tempos de estímulo, indicativo de uma possível neutralização das moléculas de TNF- $\alpha$  pela forma solúvel do receptor.

8) Com os resultados obtidos no presente trabalho, verifica-se que há uma participação distinta de cada antígeno no estabelecimento da resposta imunológica do *Mycobacterium tuberculosis* em sua interação com as células do hospedeiro. Contudo, no contexto geral, é a ação conjunta de todos os antígenos constituintes do patógeno que irão determinar qual rumo a infecção irá tomar, e qual será a resposta global levada a cabo pelo sistema imunológico.



## REFERÊNCIAS

ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. **Am J Pathol.** v. 82, n. 1, p 164-192.

APPELBERG, R.; ORME, L.M. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. **Immunology.** v. 80, n. 3, p. 352-359. 1993.

AXELROD, S.; OSCHKINAT, H.; ENDERS. Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. **Cell Microbiol.** v. 10, n 7, p. 1530-1545. 2008.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; GAN, H.; REMOLD, H. G. Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. **J Infect Dis.** v. 180, n. 4, p. 1230-1237. 1999.

BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; KEANE, J.; KORNFELD, H.; REMOLD, H. G. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. **J Immunol.** v. 161, n. 5, p. 2636-2641.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature.** v. 431, n. 7007, p. 405-406. 2004.

BARRY III, C. E.; BOSHOF, H. I.; DARTOIS, V.; DICK, T.; EHRT, S.; FLYNN, J.; SCHAPPINGER, D.; WILKINSON R. J.; YOUNG, D. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. **Nat Ver Microbiol.** v. 7, n. 12, p. 845-855. 2009.

BEAN, A. G. D.; ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; FRANCE, M. P.; KORNER, H.; SEDGWICK, J. D.; BRITTON, W. J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J. Immunol.** v. 162, n. 6, p. 3504-3511. 1999.

BERG, D. J.; DAVIDSON, N.; KUHN, R.; MULLER, W.; MENON, S.; HOLLAND G.; THOMPSON-SNIPES, L.; RENNICK, D.. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4 TH1-like responses. **J Clin Invest.** v. 98, n. 4, p. 1010-1020. 1996.

BERMUDEZ, L. E.; GOODMAN, J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. **Infect Immun.** v. 64, n. 4, p. 1400-1406. 1996.

- BHATTACHARYYA, S.; SEM, P.; WALLET, M.; LONG, B.; BALDWIN, A. S.; TISCH, R. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and I{kappa}B kinase activity. **Blood**. v. 104, n. 4, p. 1100- 1109. 2004
- BLACK G. F.; THIEL, B. A.; OTA M. O.; PARIDA, S. K.; ADEGBOLA, R.; BOOM, W. H.; DOCKRELL, H. M.; FRANKEN, K. L. M. C.; FRIGGEN, A. H.; HILL, P. C.; KLEIN, M. R.; LALOR, M. K.; MAYANJA, H.; SCHOOLNIK, G.; STANLEY, K.; WELDINGH, K.; KAUFMANN, S. H. E.; WALZL, G.; OTTENHOFF, T. H. M. Immunogenicity of novel DosR regulon-encoded candidate antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in three high-burden populations in Africa. **Clin Vaccine Immunol**. v. 16, p. 1203–1212. 2009.
- BLACK, R. A.; RAUCH, C. T.; KOZLOSKY, C.;J.; PESCHON, J. J.; SLACK, J. L.; WOLFSON, M. F.; CASTNER, B. J.; STOCKING, K. L.; REDDY, P.; SRINIVASAN, S.; NELSON, N.; BOIANI, N.; SCHOOLEY, K. A.; GERHART, M.; DAVIS, R.; FITZNER, J. N.; JOHNSON, R. S.; PAXTON, R. J.; MARCH, C. J.; CERRETTI, D. P. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-from cells. **Nature**. v.; 385, n. 6618, p. 729-733. 1997.
- BLACKMORE, T. K.; MANNING, L.; TAYLOR, W. J.; WALLIS, R. S. Therapeutic use of infliximab in tuberculosis to control severe paradoxical reaction of the brain and lymph nodes. **Clin Infect Dis** . v. 47, n. 10, p. 83–85. 2008.
- BLANCO, F. C.; BIANCO, M. V.; MEIKLE, V.; GARBACCIO, S.; VAGNONI, L.; FORRELAD, M; KLEPP, L. I.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. Increased IL-17 expression is associated with pathology in a bovine model of tuberculosis. **Tuberculosis**. v. 91, n. 1, p. 57-63. 2011.
- BOON, C.; DICK, T. *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hypoxic dormancy. **J Bacteriol**. n. 184, p. 6760–6767. 2002.
- BOUAKAZE, C., KEYSER, C., DE MARTINO, S.J., SOUGAKOFF, W., VEZIRIS, N., DABERNAT, H., LUDS, B. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* Complex species by use of a SNaPshot minisequencing-based assay. **J. Clin. Microbiol**. v. 48, n. 5, p. 1758-1766. 2010.
- BOURS, V.; FRANZOSO, G.; AZARENKO, V.; PARK, S.; KANNO, T.; BROWN, K.; SIEBENLIST, U. The oncoprotein Bcl-3 directly transactivates through kappa B motifs via association with DNA-binding p50B homodimers. **Cell**. v. 72, n. 5, p. 729-739. 1993.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Caderno de diretrizes, objetivos, metas e indicadores 2013-2015**. Brasília, DF, 2013.
- BRENNAN, F. M.; GREEN, P.; AMJADI, P.; ROBERTSHAW, H. J.; ALVAREZ-IGLESIAS, M.; TAKATA, M. Interleuking-10 regulates TNF-a-converting enzyme (TACE/ADAM17) involving a TIMP-3 dependent and independent mechanism. **Eur. J. Immunol**.. v. 38, p.1106-1117. 2008.
- BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. The envelope of Mycobacteria. **Ann Rev Biochem**. v. 64, p. 29-63. 1995.

BROCK, I.; MUNCK, M. E.; KOK-JENSEN, A.; ANDERSEN, P. Performance of whole blood INF-g test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. **Inter J Tuberc Lung Dis**. v. 5, n. 5, p. 462-467. 2001.

BRODIN, P.; DE JONGE, M. I.; MAJLESSI, L.; LECLERC, C. NILGES, M.; COLE, S. T.; BROSCHE, R. Functional analysis of early secreted antigenic target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. **J. Biol. Chem.** n. 280, p. 33953–33959. 2005

BRUNS, H.; MEINKEN, C.; SCHAUENBERG, P.; HARTEK, G.; KERN, P.; MODLIN, R. L.; ANTONI, C.; STENGER, S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8<sup>+</sup> T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **J Clin Invest**. v.119, p. 1167–1177. 2009.

BRUNS, H.; MEINKEN, C.; SCHAUENBERG, P. HARTEK, G.; KERN, P.; MODLIN, R. L.; ANTONI, C.; STENGER, S. Anti-TNF immunotherapy reduces CD8<sup>+</sup> T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. v. 199, n. 5, p. 1167-1177.

BUTLER, R.E.; BRODIN, P.; JANG, J.; JANG, M.S.; ROBERTSON, B.D.; GICQUEL, B.; STEWART, G.R. The balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. **PLoS ONE**. v. 7, n. 10, p. 1-9. 2012.

CAFFIERI, S.; DI LISA, F.; BOLESANI, F.; FACCO, M.; SEMENZATO, G.; DALL'ACQUA, F.; CANTON, M. The mitochondrial effects of novel apoptogenic molecules generated by psoralen photolysis as a crucial mechanism in PUVA therapy. **Blood**. v. 109, n. 11, p. 4988–4994. 2007.

CARDOSO, L. S.; ARAUJO, M. I.; GÓES, A. M.; PACÍFICO, L. G.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, S. C. Polymyxin B as inhibitor of LPS contamination of *Schistosoma mansoni* recombinant proteins in human cytokine analysis. **Microb Cell Fact**. v. 6, n. 1, p. 1-6. 2007.

CAREY, A. J.; TAN, C. K.; ULETT, G. C. Infection-induced IL-10 and JAK-STAT: A review of the molecular circuitry controlling immune hyperactivity in response to pathogenic microbes. **JAK-STAT: Rev**. v. 1, n. 3, p.159–167. 2012.

CHAMPION, P. A.; STANLEY, S. A.; CHAMPION, M. M.; BROWN, E. J.; COX J. S. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science** n. 15, v. 313, p.1632–1636. 2006.

CHAMPION, P. A.; STANLEY, S. A.; CHAMPION, M. M.; BROWN, E. J.; COX J. S.. C-terminal signal sequence promotes virulence factor secretion in *Mycobacterium tuberculosis*. **Science** n. 15, v. 313, p.1632–1636. 2006.

CHAN, F. K. M.; CHUN, H. J.; ZHENG, L.; SIEGEL, R. M.; BUI, K. L.; LENARDO, M. J. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. **Science**. v. 288, n. 5475, p. 2351- 2354. 2008.

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN, J.; BLOOM, B. R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.** v. 63, n. 2, p. 736–740. 1995.

CHATTERJEE, S.; DWIVEDI, V. P.; SINGH, Y.; SIDDIQUI, I.; SHARMA, P.; VAN KAER, L.; CHATTOPADHYAY, D.; DAS, G. Early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* promotes protective T helper 17 responses in a toll-like receptor-2-dependent manner. **PLoS Pathog.** v. 7, n. 11, p. 1-12. 2011.

CHAUDHRY, A.; RUDENSKY, A. Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. **J Clin Invest.** v. 123, n. 3, p. 939-944. 2013.

CHAUHAN, S.; SHARMA, D.; SINGH, A.; SUROLIA, A.; TYAGI, S. Comprehensive insights into *Mycobacterium tuberculosis* DevR (DosR) regulon activation switch. **Nucleic Acids Res.** v. 39, n. 17, p. 7400–7414. 2011.

CHAUHAN, S.; TYAGI, J. S. Cooperative binding of phosphorylated DevR to upstream sites is necessary and sufficient for activation of the Rv3134c-devRS operon in *Mycobacterium tuberculosis*: implication in the induction of DevR target genes. **J Bacteriol.** v. 190, n. 12, p. 4301–4312. 2008a.

CHAUHAN, S.; TYAGI, J. S. Interaction of DevR with multiple binding sites synergistically activates divergent transcription of narK2-Rv1738 genes in *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol.** v. 190, n. 15, p. 5394–5403. 2008b.

CHEN, T.; HE, L.; DENG, W.; XIE, J. The mycobacterium DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis. **J Cell Biochem.** v. 114, n. 1, p. 1-6. 2013.

CHEN, T.; HE, L.; DENG, W.; XIE, J. The Mycobacterium DosR Regulon Structure and Diversity Revealed by Comparative Genomic Analysis. **Journal of Cellular Biochemistry.** v. 114, p. 1–6. 2013.

CHEN, T.; LIMING, H.; WANYAN, D.; JIANPING, X. The Mycobacterium DosR regulon structure and diversity revealed by comparative genomic analysis. **Journal of Cell Biochem.** v. 114, n. 1, p. 1-6. 2013.

CHEN, X.; BÄUMEL, M.; MÄNNEL, D. N.; HOWARD, O. M.; OPPENHEIM, J. J.. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. **J. Immunol.** v. 179; n. 1; p. 154-161. 2007.

CHEN, Z. J.; PANRENT, L.; MANIAR, S. Site-specific phosphorylation of I kappa B alpha by a novel ubiquitinatin-dependent protein kinase activity. **Cell.** v. 22; n. 6; p. 853-862. 1996.

CHEN, Z. J.; PARENT, L.; MANIATIS, T. Site-specific phosphorylation of IκBα by a COMMANDEUR, S.; LIN, M. Y.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; FRIGGEN, A. H.; FRANKEN, K. L.; DRIJFHOUT, J. W.; KORSVOLD, G. E.; OFTUNG, F.; GELUK, A.; OTTENHOFF, T. H. Double and monofunctional CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR antigens and peptides in long-term latently infected individuals. **Eur J Immunol.** n. 41, p. 2925–2936. 2011.

CONVERSE, S. E.; COX, J. S. A protein secretion pathway critical for *Mycobacterium tuberculosis* virulence is conserved and functional in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol.** v 187, n. 4, p.1238–1245. 2005.

CONVERSE, S. E.; COX, J. S. A protein secretion pathway critical for *Mycobacterium tuberculosis* virulence is conserved and functional in *Mycobacterium smegmatis*. **J Bacteriol.** v. 187, n. 4, p. 1238-1245. 2005.

COUPER, K. N.; BLOUNT, D.G.; RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **J Immunol.** v. 180, n. 9, p. 5771-5777. 2008.

COUSSENS, L. M.; ZITVOGEL, L.; PALUCKA, A. K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: a magic bullet? **Science.** v. 339, n. 6117, p. 286-291. 2013.

CROKER, B. A.; KREBS, D. L.; ZHANG, J. G.; WORMALD, S.; WILLSON, T. A.; STANLEY, E. G.; ROBB, L.; GREENHALGH, C. J.; FÖRSTER, I.; CLAUSEN, B. E.; NICOLA, N. A.; METCALF, D.; HILTON, D. J.; ROBERTS, A. W.; ALEXANDER, W. S.. SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo. **Nat Immunol.** v. 4, n. 6, p. 540–545. 2003.

CRUZ, A. C.; FRANK, B. T.; EDWARDS, S. T.; DAZIN, P. F.; PESCHON, J. J.; FRANQ, K. C. Tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme controls surface expression of c-Kit and survival of embryonic stem cell-derived mast cells. **J. Biol. Chem.** v. 279, n. 7, p. 5612.-5620. 2004.

DAMBUZA, I.; ALLIE, N.; FICK, L.; JOHNSON, N.; FREMOND, C.; MITCHELL, J.; QUESNIAUX, B.; RYFFEL, B.; JACOBS, M. Efficacy of membrane TNF mediated host resistance is dependente on mycobacterial virulence. **Tuberculosis.** v. 88, n. 3, p. 221-234. 2008.

DAVIS, J. M.; CLAY, H.; LEWIS, J. L.; GHORI, N.; HERBOMEL, P.; RAMAKRISHNAN, L. Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. **Immunity.** v. 17, n. 6, p. 693-702. 2002.

DAVIS, J. M.; RAMAKRISHNAN, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell.** v. 136, n. 1, p. 37-49. 2009.

DE JONGE, M. I.; PEHAU-ARNAUDET, G.; FRETZ M. ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-1- under acidic conditions and exhibits membrane-lysisng activity. **J Bacteriol.** v. 189, n. 16, p. 6028-6034. 2007.

DEMISSIE, A.; LEYTEN, E. M.; ABEBE, M.; WASSIE, L.; ASEFFA, A.; ABATE, G.; FLETCHER, H.; OWIAFE, P.; HILL, P. C.; BROOKES, R.; ROOK, G.; ZUMLA, A.; AREND, S. M.; KLEIN, M.; OTTENHOFF, T. H.; ANDERSEN, P.; DOHERTY, T. M. Recognition of stagespecific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Vaccine Immunol.** v. 13, p. 179–186. 2006.

DENIS, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. **Cellular Immunology**. v. 132, n. 1, p. 150–157. 1991.

DESVIGNES, L.; ERNST, J. D. Interferon-g-responsive nonhematopoietic cells regulate the immune response to Mycobacterium tuberculosis. **Immunity**. v. 31, n. 6, p. 974-985. 2009.

DHEDA, K.; SCHWANDER, S. K.; ZHU, B.; VAN ZYL-SMIT, R. N.; ZHANG, Y. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology**. v. 15, n. 3, p. 433-450. 2010.

DING, Y.; CHEN, D.; TARCSAFALVI, A.; SU, R.; QIN, L.; BROMBERG, J. S. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses. **J Immunol**. v. 170, n. 3, p. 1383- 1391. 2003.

DYE, P.; SCHEELE, S., DOLIN, P.; PATHANIA, V; RAVIGLIONE, M. C. Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and morbidity by country. WHO global surveillance and monitoring project. **JAMA**. v. 282, n. 7, p. 677-686. 1999.

EGEN, J. G.; ROTHFUCHS, A. G.; FENG, C. G.; WINTER, N., SHER, A.; GERMAIN, R. N. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. **Immunity**. v. 28, n. 2, p. 271-284. 2008.

EGEN, J. G.; ROTHFUCHS, A. G.; FENG, C. G.; WINTER, N.; SHER, A.; GERMAIN, R. N.. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. **Immunity**. v. 28, n. 2, p. 271–284. 2008.

EISSNER, G.; KOLCH, W.; SCHEURICH, P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 15, n. 5, p. 353–366. 2004.

ETZERODT, A.; MANIECKI, M. B.; MØLLER, K.; MOESTRUP, S. K. Tumor necrosis factor  $\alpha$ -converting enzyme (TACE/ADAM17) mediates ectodomain shedding of the scavenger receptor CD163. **J Leukoc Biol**. n. 88, n. 6, p. 1201-1205. 2010.

FANG, F. C. Perspective series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest**. v. 99, n. 12, p. 2818-2825. 1997.  
FIORENTINO, D. F; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J. Exp.Med**. v. 170, n. 6, p. 2081–2095. 1989.

FOTIN-MLECZEK, M.; HENKLER, F.; SAMEL, D.; REICHWEIN, M.; HAUSSER, A.; PARMRYD, I.; SCHEURICH, P.; SCHMID, J. A.; WAJANT, H. Apoptotic crosstalk of TNF receptors:TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8. **J Cell Sci**. v. 115, n. 13, p. 2757–2770. 2002.

FRATAZZI, C.; ARBEIT, R. D.; CARINI, C.; REMOLD, H. G. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* serovar 4- infected human macrophages prevents mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. **J Immunol.** v. 158, n. 9, p. 4320-4327. 1997.

GALLEGOS, A. M.; PAMER, E. G.; GLICKMAN, M. S. Delayed protection by ESAT-6-specific effector CD4<sup>+</sup> T cells after airborne *M. tuberculosis* infection. **J Exp Med.** v. 205, n. 10, p. 2359-2368. 2008.

GAO, L. Y., GUO, S.; MCLAUGHLIN, B.; MORISAKI, H.; ENGEL, J. N.; BROWN E. J. A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. **Mol. Microbiol.** n. 53, v. 6, p. 1677–1693. . 2004.

GOMEZ, I.; PRINCE, A. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. **Pediatric Pulmonology.** v. 43, n. 1, p. 11–19. 2008.

GONZALO-ASENSIO, J.; MOSTOWY, S.; HARDERS-WESTERVEEN, J.; HUYGEN, K.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.; THOLE, J.; BEHR, M.; GICQUEL, B.; MARTÍN, C. PhoP: A Missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. **PLoS ONE.** v. 3, n. 10, p.1-11. 2008.

GRECH, A. P.; GARDAM, S.; CHAN, T.; QUINN, R.; GONZALES, R.; BASTEN, A.; BRINKS, R. Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) Signaling Is Negatively Regulated by a Novel, Carboxyl-terminal TNFR-associated Factor 2 (TRAF2)-binding Site. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 80, n. 36, p. 31572–31581. 2008.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WINSHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological samples. **Anal Biochem.** v. 126, p. 131-138. 1982.

GRELL, M.; ZIMMERMANN, G.; HULSER, D.; PFIZENMAIER, K.; SCHEURICH, P. TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. **J. Immunol.** v. 153, n. 5, p. 1963-1972. 1994.

HALL-STOODLEY, L.; WATTS, G.; CROWTHER, J. E.; BALAGOPAL, A.; TORRELLES, J. B.; ROBISON-COX, J.; BARGATZE, R. F.; HARMSSEN, A. G.; CROUCH, E. C.; SCHLESINGER, L. S. Mycobacterium tuberculosis binding to human surfactant proteins A and D, fibronectin, and small airway epithelial cells under shear conditions. **Infection and Immunity.** v. 74, n. 6, p. 3587–3596. 2006.

HAMILTON, K. E.; SIMMONS, J. G.; DING, S.; VAN LANDEGHEM, L.; LUND, P. K. Cytokine induction of tumor necrosis factor receptor 2 is mediated by STAT3 in colon cancer cells. **Mol Cancer Res.** v. 9, n. 12, p. 1718-1731. 2011.

HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. **Nature Reviews Microbiology.** v. 8, n. 4, p. 296–307. 2010.

HAWN, T. R.; MISCH, E. A.; DUNSTAN, S. J.; THWAITES, G. E.; LAN, N. T.; QUY, H. T.; CHAU, T. T.; RODRIGUES, S.; NACHMAN, A.; JANER, M.; HIEN, T. T.; FARRARN J. J.; ADEREM, A. A common human TLR1 polymorphism regulates the innate immune response to lipopeptides. **Eur. J. Immunol.** v. 37, n. 8, p. 2280–2289. 2007.

HEANEY, M. L.; GOLDE, D. W. Soluble receptors in human disease. **J. Leukoc. Biol.** v. 64, n. 2, p 135–146; 1998.

HEINZEL, A. S.; GROZKE, J. E.; LINES, R. A.; LEWINSOHN, D. A.; MCNABB, A. L.; STREBLOW, D. N.; BRAUD, V. M.; GRIESER, H. J.; BELISLE, J. T.; LEWINSOHN, D. M. HLA-E-dependent presentation of Mtb-derived antigen to human CD8+ T cells. **J Exp Med.** v. 196, n. 11, p. 1473-1481. 2002.

HENSON, P. M.; BRATTON, D. L.; FADOK, V. A.; The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch? **Nat Rev Mol Cell Biol.** v. 2, p. 627-633. 2001.

HERRMANN, J. L.; O'GAORA, P.; GALLAGHER, A.; THOLE, J. E.; YOUNG, D. B. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19kDa antigen from Mycobacterium tuberculosis. **EMBO J.** v. 15, n. 14, p. 3547-3554. 1996.

HOLT, P. G.; STRICKLAND, D. H.; WIKSTRÖM, M. E.; JAHNSEN, F. L. Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 2, p. 142-152. 2008.

HONAKER, R. W.; DHIMAN, R. K.; NARAYANASAMY, P.; CRICK, D. C.; VOSKUIL, M. I. DosS responds to a reduced electron transport system to induce the Mycobacterium tuberculosis DosR regulon. **J Bacteriol.** v. 192, n. 24, p. 6447-6455. 2010.

HONAKER, R. W.; LEISTIKOW, R. L.; BARTEK, I. L.; VOSKUIL, M. I. Unique roles of DosT and DosS in DosR regulon induction and *Mycobacterium tuberculosis* dormancy. **Infect Immun.** v. 77, n. 8, p. 3258–3263. 2009

HSU, H.; SHU, H. B.; PAN, M. G.; GOEDEL, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. **Cell.** v. 84, n. 2, p. 299-308. 1996.

HSU, H.; SHU, H. B.; PAN, M. G.; GOEDEL, D. V. TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. **Cell.** v. 84, n. 2, p. 299–308. 1996.

HSU, H.; XIONG, J.; GOEDEL, D. V. The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. **Cell.** v. 81, n. 4, p. 495. 1995.

HSU, T.; HINGLEY-WILSON, S. M.; CHEN, B.; CHEN, M.; DAI, A. Z.; MORIN, P.; MARKS, M.; PADIYAR, C. B.; GOULDING, J.; GINGERY, C.; EISENBERG, M. RUSSELL, D. DERRICK, R. G. COLLINS, F. M.; MORRIS, S. L.; KING, C. H.; JACOBS JR, W. R. The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss



of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 100, n. 21, p. 12420–12425. 2003.

IDRISS, H.T.; NAISMITH, J.H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microsc. Res. Tech.** v. 50, n. 3, p. 184-195. 2000.

JIANG, Y.P.; WORONICZ, J.D.; LIU, W.; GOEDDEL, D.V. Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. **Science.** v. 283, n. 5401, p. 543-546.1999.

JIN, L.; RAYMON, D. P.; CRABTREE, T. D.; PELLETIER, S. J.; HOULGRAVE, C. W.; PROETT, T. L.; SAWYER, R. G. Enhanced murine macrophage TNF receptor shedding by cytosine-guanine sequences in oligodeoxynucleotides. **J Immunol.** v. 165, p. 5153-5160. 2000.

JO, E. K. Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. **Current Opinion in Infectious Diseases.** v. 21, n. 3, p. 279–286. 2008.

JO, E. K.; YANG, C. S.; CHOI, C. H.; HARDING, C. V. Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to Mycobacteria: branching out from Toll-like receptors. **Cellular Microbiology.** v. 9, n. 5.; p. 1087-1098. 2007.

KANG, P. B.; AZAD, A. K.; TORRELLES, J. B.; KAUFMAN, T. M.; BEHARKA, A.; TIBESAR, E; DESJARDIN, L. E.; SCHLESINGER, L. S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **Journal of Experimental Medicine.** v. 202, n. 7, p. 987–999. 2005.

KEANE, J.; BALCEWICZ-SABLINSKA, M. K.; REMOLD, H. G.; CHUPP, G. L.; MEEK, B. B.; FENTON, M. J.; KORNFELD, H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect Immun.** v. 65, n. 1, p. 298-304. 1997.

KEANE, J.; GERSHON, S.; BRAUN, M.M. Tuberculosis and treatment with infliximab [letter]. **N Engl J Med.** v. 346, p. 623-626. 2002.

KEANE, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H.; Virulent Mycobacterium tuberculosis strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **J. Immunol.** v. 164, n. 4, p. 2016-2020. 2000.

KILLIAN, J. A. Synthetic peptides as models for intrinsic membrane proteins. **FEBS Lett.** v. 555, p. 134–138. 2003

KIM, M. J.; PARK, K. J.; KO, I. J.; KIM, Y. M.; OH, J. I. Different roles of DosS and DosT in the hypoxic adaptation of Mycobacteria. **J Bacteriol.** v. 192, n. 19, p. 4868–4875. 2010.

KOM, K.; SOHN, H.; KIM, J. S.; CHOI, H. G.; BYUN, E. H.; LEE, K. I.; SHIN, S. J.; SONG, C. H.; PARK, J. K.; KIM, H. J. *Mycobacterium tuberculosis* Rv0652 stimulates production of tumour necrosis factor and monocytes chemoattractant protein-1 in

macrophages through the Toll-like receptor 4 pathway. **Immunology**. v. 136, n. 2, p. 231-240. 2012.

KOTENKO, S. V.; KRAUSE, C. D.; IZOTOVA, L. S.; POLLACK, B. P.; WU, W.; PESTKA, S. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex. **EMBO J**. v. 16, n. 19, p. 5894-5903; 1997.

KUMAR A, DESHANE JS, CROSSMAN DK, BOLISSETTY S, YAN, KRAMNIK, I.; AGARWAL, A.; STEYN, A. J. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide induces the *Mycobacterium tuberculosis* dormancy regulon. **J Biol Chem**. v. 283, n. 26, p. 18032–18039. 2008.

KUMAR, A.; TOLEDO, J. C.; PATEL, R. P.; LANCASTER JR, J. R.; STEYN, A. J. *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 104, n. 28, p.11568–11573. 2007.

KUSNER, D. J. Mechanism of mycobacterial persistence in tuberculosis. **Clinical Immunol**. v. 114, n. 3, p 239-247. 2005.

KUWATA, H.; WATANABE, Y.; MIYOSHI, H.; YAMAMOTO, M.; KAISHO, T.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. IL-10–inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF- $\alpha$  production in macrophages. **Blood**. v. 102, n. 12, p. 4123-4129. 2003.

LEARY S.; O'SULLIVAN M. P.; KEANE J. IL-10 blocks phagosome maturation in mycobacterium tuberculosis-infected human macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**. v. 45, p. 172–180. 2011.

LEE, S. B.; SCHOREY, J. S. Activation and mitogen-activated protein kinase regulation of transcription factors Ets and NF-kappaB in Mycobacterium-infected macrophages and role of these factors in tumor necrosis factor alpha and nitric oxide synthase 2 promoter function. **Infect Immun**. v. 73, n. 10, p. 6499-6507. 2005.

LEISTIKOW, R. L.; MORTON, R. L.; BARKETK, I. L.; FRIMPONG, I.; WAGNER, K.; VOSKUIL. M. I. The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. **J Bacteriol**. v. 192, n. 6, p. 1662–1670. 2010.

LEWIS, K. N., R. LIAO, K. M. GUINN, M. J. HICKEY, S. SMITH, M. A. BEHR, AND D. R. SHERMAN. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics Bacille Calmette-Guerin attenuation. **J. Infect. Dis.** v. 187, p. 117–123. 2003.

LEYTEN, E. M. S.; LIN, M. Y.; FRANKEN, K. L. M. C.; FRIGGEN, A. H.; PRINS, C.; VAN MEIJGAARDEN, K. E.; VOSKUIL, M. I.; WELDINGH, K.; ANDERSEN, P.; SCHOOLNIK, G. K. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**. v. 8, p. 2052–2060. 2006.

LI, Q.; VERMA, I. M. NF-kappaB regulation in the immune system. **Nat Rev Immunol**. v. 2, n. 10, p. 725-734. 2002.

- LI, W.; DENG, G.; LI, M.; LIU, X.; WANG, Y. Roles of mucosal immunity against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis Research and Treatment**. v. 2012, p. 1-12. 2012.
- LI, Y.; WANG, Y.; LIU, X. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. **Clinical and developmental Immunology**. v. 2012, p. 1-11. 2012.
- LINDEN, S. K.; SUTTON, N. G.; KARLSSON, V.; KOROLIK, V.; MCGUCKIN, M. A. Mucins in the mucosal barrier to infection. **Mucosal Immunology**. v. 1, n. 3, p. 183–197, 2008.
- LOEUILLET, C.; MARINON, F.; PEREZ, C.; MUNOZ, M.; MEYLAN, T.; MEYAN, P. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. **J. Immunol.** v. 177, n. 9, p. 6245-6255. 2006.
- LOKE, P.; NAIR, M. G.; PARKINSON, J.; GIULIANO, D.; BLAXTER, M.; ALLEN, J. E. IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive in vivo gene expression phenotype. **BMC Immunol.** v. 3, n. 7, p. 1-11. 2002.
- LONG, R.; LIGHT, B.; TALBOT, J. A. Mycobacteriocidal action of exogenous nitric oxide. **Antimicrobiol. Agents. Chemo.** v. 43, n. 2, p. 403–405. 1999.
- LOPEZ, M.; SLY, L. M.; LUU, Y.; YOUNG, D.; COOPER, H.; REINER, N. E. The 19-kDa *Mycobacterium tuberculosis* protein induces macrophage apoptosis through Toll-like receptor-2. **J. Immunol.** v. 170, n. 5, p 2409-2416. 2003.
- LUO, D.; LUO, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, R.; LI, X.; DOBRUCKI, W.L.; SINUSAS, A.J.; SESSA, W.C.; MIN, W. Differential functions of tumor necrosis factor receptor 1 and 2 signaling in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. **Am. J. Pathol.** v. 169, n. 5, p. 1886-1898. 2006.
- MACEWAN, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. **Cell. Signal.** v. 14, n. 6, p. 477–492. 2002.
- MAHAIRAS, G. G., SABO, P. J.; HICKEY, M. J.; SINGH, D. C.; STOVER, C. K... Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. **J. Bacteriol.** v.178, p. 1274–1282. 1996.
- MARINE, J.C.; TOPHAM, D. J.; MCKAY, C.; WANG, D.; PARGANAS, E.; STRAVOPODIS, D.; YOSHIMURA, A.; IHLE, J. N. SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. **Cell.** v. 98, n. 5, p. 609-616. 1999.
- MAYO, M. W.; BALDWIN, A. S. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. **Biochim Biophys Acta.** v. 1470, n. 2; p. M55–M62. 2000.
- MAZZONI, A.; SEGAL, D. M. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. **J. Leukoc Biol.** v. 75, n. 5, p. 721-730. 2004.

MCLAUGHLIN, B.; CHON, J. S.; MACGURN, J. A.; CARLSSON, F.; CHENG, T. L.; COX, J. S.; BROWN, E. J. A mycobacterium ESX-1–secreted virulence factor with unique requirements for export. **PLoS Pathog.** v. 3, n. 8, p. 1051 – 1061. 2007

MESTERCKY, J.; RUSSEL, M. W.; ELSON, C. O. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. **Gut.** v. 44, n. 1, p. 2–5. 1999.  
MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell.** v. 114, n. 2, p. 181–190. 2003.

MILLER, B. H.; FRATTI, R. A.; POSCHET, J. F. Mycobacteria inhibit nitric oxide synthase recruitment to phagosomes during macrophage infection. **Infection and Immunity.** v. 72, n. 5, p. 2872-2878. 2004.

MOHAN, A. K.; COTE, T. R.; BLOCK, J. A.; MANADAN, A. M.; SIEGEL, J. N.; BRAUN, M. M. Tuberculosis following the use of etanercept, a tumor necrosis factor inhibitor. **Clin Infect Dis.** v. 39, p. 295-299. 2004.

MOQUIN, D.; CHAN, F. K. The molecular regulation of programmed necrotic cell injury. **Trends in Biochemical Sciences.** v. 35, n.8, p. 434–441. 2010.

MORGUES, T.; GOODRICH, M. E.; RYAN, L.; LACOURSE, R.; NORTH, R. J.; The relative importance of T cells subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice. **J Exp Med.** v. 193, n. 3, p. 271-280. 2001.

MULLER-NEWEN, G.; KOHNE, C.; KEUL, R.; HEMMANN, U.; MULLER-ESTERL, W.; WIJDENES, J.; BRAKENHOFF, J. P.; HART, M. H.; HEINRICH, P. C. Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. **Eur. J. Biochem.** v. 236, n. 3, p. 837–842.

MUMM, J. B.; OFT, M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. **Oncogene.** v. 27, p. 45, p. 5913-5919. 2008.

NG, T. H. S.; BRITTON, G. J.; HILL, E. V.; VERHAGEN, J.; BURTON, B. R.; WRAITH, D. C. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. **Frontiers in Immunology.** v. 4, n. 129, p. 1-13. 2013.

NIEMAND, C.; NIMMESGERN, A.; HAAN, S.; FISCHER, P.; SCHAPER, F.; ROSSAINT, R.; HEINRICH, P. C.; MULLER-NEWEN, G. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. **J Immunol.** v. 170, n. 6, p. 3263–3272. 2003.

NIGOU, J.; ZELLE-RIESER, C.; GILLERON, M.; THURNHER, M. Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. **The Journal of Immunology.** v. 166, n. 12, p. 7477–7485. 2001.

NOSS, E. H.; PAI, R. K.; SELLATI, T. J.; RADOLF, J. D.; BELISLE, J.; GOLENBOCK, D. T.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Toll-Like Receptor 2-Dependent Inhibition of

Macrophage Class II MHC Expression and Antigen Processing by 19-kDa Lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Immunology**. v. 167, n. 2, 910-918. 2001.

O'FARREL, A. M.; PARRY, D. A.; ZINDY, F.; ROUSSEL, M. F.; LEES, E.; MOORE, K. W.; MUI, A. L. F. Stat3-dependent induction of p19INK4D by IL-10 contributes to inhibition of macrophage proliferation. **J Immunol**. v. 164, n. 9, p. 4607-4615. 2000.

OUYANG, W.; RUTZ, S.; CRELLIN, N. K.; VALDEZ, P. A.; HYMOWITZ, S. G. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. **Annu Rev Immunol**. v. 29, p. 71–109. 2011.

PAI, M.; RILEY, L. W.; COLFORD Jr, J. M. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. **The Lancet Infect Dis**. v. 4, n. 12, p. 761-766. 2004.

PAI, M.; ZWERLING, A.; MENZIES, D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: and update. **Ann Inter Med**. v. 149, n. 3, p. 177-184. 2008.

PAI, R. K.; PENNINI, M. E.; TOBIAN, A. A. R.; CANADAY, D. H.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Prolonged Toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. **Inf Immun**. v. 72, n. 11. P 6603-6614. 2004.

PALAND, N.; BÖHME, L.; GURUMURTHY, R. K.; MÄUER, A.; SZCZEPEK, A. J.; RUDEL, T. Reduced display of tumor necrosis factor receptor I at the host cell surface supports infection with *Chlamydia trachomatis*. **J Biol Chem**. v. 283, p. 6438-6448. 2008.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Tuberculosis in the Americas: Regional Report 2009**. Washington, DC, 2009.

PAN, G.; BAUER, J. H.; HARIDAS, V.; WANG, S.; LIU, D.; YU, G.; VINCENZ, C.; AGGARWAL, B. B.; NI, J.; DIXIT, V. M. Identification and functional characterization of DR6, a novel death domain-containing TNF receptor. **FEBS Lett**. v. 431, n. 3, p. 351-356. 1998.

PAN, S.; AN, P.; ZHANG, R.; HE, X.; YIN, G.; MIN, W. Etk/Bmx as a tumor necrosis factor receptor type 2-specific kinase: role in endothelial cell migration and angiogenesis. **Mol Cell Biol**. v. 22, n. 21, p. 7512–7523. 2002.

PARK, H. D.; GUINN, K. M.; HARRELL, M. I.; LIAO, R.; VOSKUIL M. I.; TOMPA, M.; SCHOOLNIK, G. K.; SHERMAN, D. R. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**. v. 48, n. 3, p. 833–43. 2003.

PARK, R. K.; PENNINI, M. E.; TOBIAN, A. A.; CANADAY, D. H.; BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of

selected genes in macrophages. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 11, p. 6603–6614. 2004.

PATHAK, S. K.; BASU, S.; BASU, K. K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; BHATTACHARYYA, A.; KAISHO, T.; KUNDU, M.; BASU, J. R. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nat. Immunol.** n. 8, p.610–618. 2007.

PATHAK, S. K.; BASU, S.; BASU, K. K.; BANERJEE, A.; PATHAK, S.; BHATTACHARYYA, A.; KAISHO, T.; KUNDU, M.; BASU, J. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. **Nature Immunology**. v. 8, p. 610-618. 2010.

PERERA, P.Y., DERRICK, S.C., KOLIBAB, K., MOMOI, F., YAMAMOTO, M., MORRIS, S. L.; WALDMANN, T. A.; PERERA, L. P. L. A multi-valent vaccinia virus-based tuberculosis vaccine molecularly adjuvanted with interleukin-15 induces robust immune responses in mice. **Vaccine**. v.27:, p. 2121-2127. 2009

PEREZ, C.; ALBERT, I.; DEFAY, K.; ZACHARIADES, N.; GOODING, L.; KRIEGLER, M. A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. **Cell**. v. 63, n. 2, p. 251–258. 1990.

PETCH, L. A.; HARRIS, J.; RAYMOND, V. W.; BLASBAND, A.; LEE, D. C.; EARP, H. S. A truncated, secreted form of the epidermal growth factor receptor is encoded by an alternatively spliced transcript in normal rat tissue. **Mol. Cell. Biol.** v. 10, n. 6, p. 2973–2982. 1990.

PETERS, W.; ERNST, J. D. Mechanisms of cell recruitment in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes and Infection**. v. 5, n. 2, p. 151–158. 2003.

PUISSEGUIER, M. P.; LAY, G.; GILLERON, M.; BOTELLA, L.; NIGOU, J.; MARRAKCHI, H.; MARI, B.; DUTEYRAT, J. L.; GUERARDEL, Y.; KREMER, L.; BARBRY, P.; PUZO, G.; ALTARE, F. Mycobacterial lipomannan induces granuloma macrophage fusion via a TLR2-dependent, ADAM9- and beta 1 integrin-mediated pathway. **J. Immunol.** v. 178, n. 5, p. 3161-3169. 2007.

PYM, A. S.; BRODIN, P.; BROSCH, R.; HUERRE M.; COLE S. T. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. **Mol. Microbiol.** v.46, n. 3, p.:709. 2002.

RANDHAWA, P. S. Lymphocyte subsets in granulomas of human tuberculosis: an in situ immunofluorescence study using monoclonal antibodies. **Pathology**. v. 22, n. 3, p. 153-155. 1990.

RAUERT, H.; WICOVSKY, A.; MÜLLER, N.; SIEGMUND, D.; SPINDLER, V.; WASCHKE, J.; KNEITZ, C.; WAJANT, H. Membrane tumor necrosis factor (TNF) induces p100 processing via TNF receptor-2 (TNFR2). **J Biol Chem**. v. 285, n. 10, p. 7394–7404. 2010.

RENSHAW, P.S., LIGHTBODY, K.L., VEVERKA, V., MUSKETT, F.W., KELLY, G., FRENKEL, T.A., GORDON, S.V., HEWINSON, R.G., BURKE, B., NORMAN, J., WILLIAMSON, R.A., CARR, M.A.. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. **The EMBO Journal**, 24: 2491-2498. 2005

RENSHAW, P.S., PANAGIOTIDOU, P., WHELAN, A., GORDON, S.V., HEWINSON, R.G., WILLIAMSON, R.A., CARR, M.D. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the Mycobacterium tuberculosis complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight 1:1 complex and characterisation of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6.CFP-10 complex: implications for pathogenesis and virulence. **J. Biol. Chem.** n. 277, p. 21598-21603. 2002.

RICHMOND, J.; DUFFY, E.R.; LEE, .J.; KABOLI, K.; REMICK, D.G.; KORNFELD, H.; CRUIKSHANK, W.W. Mannose-capped lipoarabinomannan from Myobacterium tuberculosis induces soluble tumor necrosis fator receptor production through tumor necrosis fator alfpha-converting enzyme action.. **Infection and Immunity**. v. 80, n. 11, p. 3858-3868. 2013.

RIENDEAU, C. J.; KORNFELD, H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. **Infect Immun**. v. 71, n. 1, p. 254-259. 2003.

RIESE, U.;BRENNER, S.; DOCKE, W. D.; PROSCH, S.; REINKE, P.; OPPERT, M.; VOLK, H. D.; PLATZER, C. Catecholamines induce IL-10 release in patients suffering from acute myocardial infarction by transactivating its promoter in monocytic but not in T cells. **Mol Cell Biochem**. v. 212, n. 1; p. 45–50. 2003.

RILEY, J. K.; TAKEDA, K.; AKIRA, S.; SCHREIBER, R. D. Interleukin-10 receptor signaling through the JAKSTAT pathway. Requirement for two distinct receptor derived signals for anti-inflammatory action. **J Biol Chem**. v. 274, n. 23, p. 16513-16521. 1999.

RIVAS-SANTIAGO, B.; SADA, E.; TSUTSUMI, V.; AGUIAR-LEON, D.; CONTRERAS, J. L.; HERNÁNDEZ-PANDO, R.  $\beta$ -defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. **Journal of Infectious Diseases**. v. 194, n. 5, p. 697–701. 2006.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G. D.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J Immunol**. v. 168, p. 4620-4627. 2002.

ROACH, D. R.; BEAN, A. G.; DEMANGEL, C.; FRANCE, M. P.; BRISCOE, H.; BRITTON, W. J. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. **J Immunol**. v. 68, n. 9, p. 4620-4627. 2002.

ROBERTS, D. M.; LIAO, R. P.; WISEDCHAI SRI, G.; HOL, W. G.; SHERMAN, D. R. Two sensor kinases contribute to the hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. **J. Biol. Chem**. v. 279, n. 22, p. 23082–23087. 2004.

RODRIGUES, M. F.; ALVES, C. C.; FIGUEIREDO, B. B.; REZENDE, A. B.; WOHLRES-VIANA, S.; SILVA, V. L.; MACHADO, M. A.; TEIXEIRA, H. C. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*. **Immunology**. v. 139, n. 4, p. 2013.

ROOK, A. W.; STEELE, J.; AINSWORTH, M.; CHAMPION, B. R. Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. **Immunology**. v. 59, n. 3, p. 333–338. 1986.

ROUPIE, V.; ROMANO, M.; ZHANG, L.; KORF, H.; LIN, M. Y.; FRANKEN, K. L. M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; KLEIN, M. R.; HUYGEN, K. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice. **Infect Immun**. n. 75, p. 941– 949. 2006.

RUSTAD, T. R.; HARRELL, M. I.; LIAO, R.; SHERMAN, D. R. The enduring hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**. v. 3, n. 1, p. 1-8. 2008.

RUSTAD, T. R.; SHERRID, A. M.; MICH, K, J.; SHERMAN, D. R. Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. **Cell Microbiol**. v. 11, n. 8, p. 1151-1159. 2009.

RUSTAD, T. R.; SHERRID, A. M.; MINCH, K. J.; SHERMAN, D. R.; Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency. **Cell Microb**. v. 11, n. 8, p. 1151-1159. 2009.

SCANGA, C. A.; MOHAN, V. P.; TANAKA, K.; ALLAND, D.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis in mice*. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 12, p. 7711-7717. 2001.

SCANGA, C. A.; MOHAN, V. P.; YU, K.; JOSEPH, H.; TANAKA, K.; CHAN, J.; FLYNN, J. L. Depletion of CD4+ T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2. **J Exp Med**. v. 192, n. 3, p. 347-358. 2000.

SCHLÜTER, D.; DECKERT, M. The divergent role of tumor necrosis factor receptors in infectious diseases. **Microbes Infect**. v. 2, n. 10, p. 1285-1292. 2000.

SCHNEIDER-BRACHERT, W.; TCHIKOV, V.; MERKEL, O.; JAKOB, M.; HALLAS, C.; KRUSE, M. L.; GROITL, P.; LEHN, A.; HILDT, E.; HELD-FEINDT, J.; DOBNER, T.; KABELITZ, D.; KRÖNKE, M.; SCHÜTZE, S. Inhibition of TNF receptor 1 internalization by adenovirus 14.7K as a novel immune escape mechanism. **J Clin Invest**. v. 116; n. 11; p. 2901-2913.

SCHOTTELIUS, A. J. G.; MAYO, M. W.; SARTOR, R. B.; BALDWIN JR, A. S. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of  $\kappa$ B kinase activity and nuclear factor  $\kappa$ B binding. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 45, p. 31868–31874, 1999.



SCHOTTELIUS, A. J. G.; MOLDAWER, L. L.; DINARELLO, C. A.; ASADULLAH, K.; STERRY, W.; EDWARDS, C. K. Biology of tumor necrosis factor- $\alpha$  implications for psoriasis. **Exp Dermatol**. v. 13, n. 4, p. 193–222. 2004.

SCHREIBER, T.; EHLERS, S.; HEITMANN, L.; RAUSCH, A.; MAGES, J.; MURRAY, P.J.; LANG, R.; HÖLSCHER, C. Autocrine IL-10 induces hallmarks of alternative activation in macrophages and suppresses antituberculosis effector mechanisms without compromising T cell immunity. **J Immunol**. v. 183, n. 2, p. :1301-1312. 2009.

SCHUCK, S. D.; MUELLER, H.; KUNITZ, F.; NEHER, A.; HOFFMANN, H.; FRANKEN K. L.; REPSILBER, D.; OTTENHOFF, T. H.; KAUFMANN, S. H.; JACOBSEN. M. Identification of T-cell antigens specific for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **PLoS ONE**. v. 4 e5590. 2009.

SCHÜTZE, S.; TCHIKOV, V.; SCHNEIDER-BRACHERT, W. Regulation of TNFR1 and CD95 signaling by receptor compartmentalization. **Nat Ver Mol Cell Biol**. v. 9, n. 8, p. 655-662. 2008.

SCHWANDER, D.; DHEDA, K. Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into pathogenesis and protection. **American Journal Respr Crit Care Med**. v. 183, n. 6, p. 696-707. 2011.

SCORPIO, A.; ZHANG, Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/icotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus. **Nat. Med**. v. 2, n. 6, p. 662–667. 1996.

SHARMA, P. K.; SAHA, P. K.; SINGH, A.; SHARMA, S. K.; SHOSH, B.; MITRA, D. K.; FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells suppress effector T-cell function at pathologic site in miliary tuberculosis. **Am J Repir Crit Care Med**. v. 179, n. 11, p. 1061-1070. 2009.

SHERMAN, D. R.; VOSKUIL, M.; SCHNAPPINGER, D.; LIAO, R.; HARREL, M. I.; SHOOLNIK, G. K. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 98, n. 13, p. 7534-7539. 2001.

SHORTMAN, K.; LIU, Y. J. Mouse and human dendritic cell subtypes. **Nat Ver Immunol**. v. 2, n. 3, p. 151-161. 2002.

SIRAKOVA, T. D.; DUBEY, V. S.; DEB, C.; DANIEL, J.; KOROTKOVA, T. A.; ABOMOELAK, B.; KOLATTUKUDY, P. E. Identification of a diacylglycerol acyltransferase gene involved in accumulation of triacylglycerol in *Mycobacterium tuberculosis* under stress. **Microbiology**. v. 152, n. 9, p. 2717-2725.

SMALLIE, T.; RICCHETTI, G.; HORWOOD, N. J.; FELDMANN, M.; CLARK, A. R.; WILLIAMS, L. M. IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages. **J Exp Med**. v. 207, n. 10, p. 2081-2088. 2010.

SMOOKLER, D. S.; MOHAMMED, F. F.; KASSIRI, Z.; DUNCAN, G. S.; MAK, T. W.; KHOKHA, R. Cutting edge: tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. **J Immunol**. v. 176, n.2, p. 721–725. 2006.

SOHASKEY, C. D. Nitrate enhances the survival of *Mycobacterium tuberculosis* during inhibition of respiration. **J Bacteriol**. v. 190, n. 8, p. 2981-2986. 2008.

STAMM, L. M.; MORISAKI, J. H.; GAO, L. Y.; JENG, R. L.; MCDONALD, K. L.; ROTH, R.; TAKESHITA, S.; HEUSER, J.; WELCH, M. D.; BROWN E. J. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actinbased motility. **J. Exp. Med.** v.198, n. 9, p.1361–1368. 2003.

STANLEY, S.A., RAGHAVEN, S., HWANG, W.H., COX, J. S.. Acute infection and macrophage subersio by Mycobacterium tuberculosis require a specialised secretion system. **Proc. Natl Acad Sci USA.** n. 100, p. 13001-13006. 2003

STRASSBURG, A.; JAFARI, C.; ERNST, M.; LOTZ, W.; LANGE, C. Rapid diagnosis of pulmonary TB by BAL enzyme-link immunospot assay in an immunocompromised host. **European Respiratory Journal.** v. 31, n. 5, p. 1132-1135. 2008.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P. L.; COLLINS, H. L.; FOLK, A. K.; ALLEN, R. D.; GLUCK, S.; L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D. G. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular próton-ATPase. **Science.** v. 263, n 5147, p. 678-681. 1994.

SUN, S.C.; LEY, S.C. New insights into NF-kappaB regulation and function. **Trends in immunology,** v. 29, n. 10, p. 469-478. 2008.

TAK, P. P. Effects of infliximab treatment on rheumatoid synovial tissue. **J Rheumatol Suppl.** v. 74, p. 31–34. 2005.

TANEJA, N. K.; DHINGRA, S.; MITTAL, A.; NARESH, M.; TYAGI, J. S. *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. **PLoS One.** v. 5, n. 5, p 1-13. 2010.

TARTAGLIA, L. A.; AYRES, T. M.; WONG, G. H. W.; GOEDDEL, D. V. A novel domain within the 55 kDa TNF receptor signals cell-death. **Cell.** v. 74, n. 5, p. 845-853. 1993.  
TARTAGLIA, L. A.; WEBER, R. F.; FIGARI, I. S.; REYNOLDS, C.; PALLADINO JR, M. A.; GOEDDEL, D. V. The two diferente receptors for tumor necrosis fator mediate distinct cellular responses. 1991. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, n. 20, p. 9292-9296. 1991.

TEM BERGE, B.; PAATS, M. S.; BERGEN, I. M.; VAN DEN BLINK, B.; HOOGSTEDEN, H. G.; LAMBRECHT, B. N.; HENDRIKS, B. N.; KLEINJIAN, A. Increased IL-17A expression in granulomas and in circulating memory T cells in sarcoidosis. **Rheumatology.** v. 51, n. 1, p. 37-46. 2012.

TJÄRN LUND, A.; RODRÍGUEZ, A.; CARDONA, P. J.; GUIRADO, E.; IVANYI, J.; SINGH, M.; TROYE-BLOMBERG, M.; FERNÁNDEZ, C. Polymeric IgR knockout mice are more susceptible to mycobacterial infections in the respiratory tract than wild-type mice. **International Immunology.** v. 18; n. 5; p. 807-816. 2003.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. A.\*(2008) Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review **Pharmacology & Therapeutics.** v. 117, n. 2, p. 244–279. 2008.

- TRAJKOVIC, V.; SINGH, B.; SINGH, S.; SHARMA, P.; Effect of *Mycobacterium tuberculosis*-Specific 10-Kilodalton Antigen on Macrophage Release of Tumor Necrosis Factor Alpha and Nitric Oxide. **Infect Immun.** v. 70, n. 12, p. 6558-6566. 2002.
- TSAI, M. C.; CHAKRAVARTY, S.; ZHU, G.; XU, J.; TANAKA, K.; KOCH, C.; TUFARIELLO, J.; FLYNN, J.; CHAN, J. Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. **Cell Microbiol.** v. 8, n. 2, p. 218-232.
- UDALOVA, I. A.; KNIGHT, J. C.; VIDAL, V.; NEDOSPASOV, S. A.; KWIATKOWSKI, D. Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes. **J Biol Chem.** v 273, n. 33, p. 21178–21186. 1998.
- VAN DER WEL, N.; HAVA, D.; HOUBEN, D.; FLUITSMA, D.; VAN ZON, M.; PIERSON, J.; BRENNER, M.; PETERS, P. J. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. **Cell.** v. 129, n. 7, p. 1287-1298. 2007.
- VERGNE, I.; CHUA, J.; LEE, H. H.; LUCAS, M.; BELISLE, J.; DERETIC, V. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 102, n. 11, p. 4033-4038. 2005.
- VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. Phagosome maturation: aging gracefully. **Biochem Journal.** v. 366, n. 3. P. 689-704. 2002.
- VIEIRA, P.; MALEFYT, R. W.; DANG, M. N.; JOHNSON, K. E.; KASTELEIN, R.; FIORENTINO, D. F.; DEVRIES, J. E.; RONCAROLO, M. G.; MOORE, K. W. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: Homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRFI. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 88, n. 4, p. 1172-1176. 1991.
- VOLKMAN, H. E.; CLAY H.; BERRY, D.; CHANG, J. C.; SHERMAN, D. R.; RAMAKRISHNAN, L.. Tuberculous granuloma formation is enhanced by a mycobacterium virulence determinant. **PLoS Biol.**v. 2, n. 11, p. 1946 – 1956. 2004.
- VOSKUIL MI, SCHNAPPINGER D, VISCONTI KC, HARRELL MI, DOLGANOV, SHERMAN, D. R.; SCHOOLNIK, G. K. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. **J Exp Med.** v. 198, n. 5, p. 705–713. 2003.
- WALCZAK, H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. **Immunology Reviews.** v. 244, n. 1, p. 9–28. 2011.
- WALLIS, R. S. Reconsidering adjuvant immunotherapy for tuberculosis. **Clin Infect Dis.** v. 41, n. 2, p. 201–208. 2005.
- WALLIS, R. S.; VAN VUUREN, C.; POTGIETER, S. Adalimumab treatment of life-threatening tuberculosis. **Clin Infect Dis.** v. 48, n. 10, p. 1429-1432. 2009.

WARE, C. F. S.; VANARSDALE, S.; VANARSDALE, T. L. Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families. **J. Cell. Biochem.** v. 60, n. 1, p. 47 -55. 1996.

WAYNE, L. G.; HAYES, L. G. Nitrate reduction as a marker for hypoxic shutdown of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuber Lung Dis.** v. 79, n. 2, p. 127-132. 1998.

WEBER-NORDT, R. M.; RILEY, J. K.; GREENLUND, A. C.; MOORE, K. W.; DARNELL, J. E.; SCHREIBER, R. D. Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. **J Biol Chem.** v. 271, n. 44, p. 27954-27961. 1996.

WIEGMANN, K.; SCHÜTZE, S.; MACHLEIDT, T.; WITTE, D.; KRÖNKE, M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. **Cell.** v. 78, n. 6, p. 1005–1015. 1994.

WINAU, F.; KAUFMANN, S. H. E.; SCHAIBLE, U. E. Apoptosis paves the detour path for CD8T cell activation against intracellular bacteria. **Cell Microbiol.** v. 6, n. 7, p. 599-607. 2004.

WOLK, K.; SABAT, R. Interleukin-22: a novel T- and NK-cell derived cytokine that regulates the biology of tissue cells. **Cytokine Growth Factor Rev.** v. 17, n. 5, p. :367-380. 2006

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis report 2013.** Geneva, Switzerland, 2013.

XU, Y.; JANGANNATH, C.; LIU, X. D.; SHARAFKHANEH, A.; KOLODZIEJSKA, K. E.; EISSA, N. T. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. **Immunity.** v. 27, n. 1, p. 135–144. 2007.

YAMAMOTO, M.; SATO, S.; HEMMI, H.; HOSHINO, K.; KAISHO, T.; SANJO, H.; TAKEUCHI, O.; SUKIYAMA, M.; OKABE, M.; TAKEDA, K.; AKIRA, S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. **Science.** v. 301, n. 5633, p. 640-643. 2003.

YATES, R. M.; HERMETTER, A.; RUSSELL, D. G. The kinetics of phagosome maturation as a function of phagosome/lysosome fusion and acquisition of hydrolytic activity. **Traffic.** v. 6, n. 5, p 413-420. 2005.

ZHANG, X.; LI, S.; LUO, Y., CHEN, Y.; CHENG, S.; ZHANG, G.; HU, C.; CHEN, H.; GUO, A. *Mycobacterium bovis*, and BCG induce different patterns of cytokines and chemokine production in dendritic cells and differentiation patterns in CD4+ T cells. **Microbiology.** v. 159, p. 366-379. 2013.

ZHANG, Y.; JIANG, J.; BLACK, R. A.; BAUMANN, G.; FRANK, S. J. Tumor necrosis factor-converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. **Endocrinology.** v. 141, n. 12, p. 4342-4348. 2000.

