UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada

ELYARA MARIA SOARES

**Avaliação da participação de mediadores lipídicos nas
infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de
Mycobacterium tuberculosis de humanos**

Ribeirão Preto

2013

ELYARA MARIA SOARES

**Avaliação da participação de mediadores lipídicos nas
infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de
Mycobacterium tuberculosis de humanos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, para obtenção do grau de Doutor em
Ciências.

Área de concentração: Imunologia Básica e
Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Helena
Faccioli

Ribeirão Preto

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo de Publicação
Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e
Documentação
da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Soares, Elyara Maria

Avaliação da participação de mediadores lipídicos nas infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de humanos. Elyara Maria Soares ; orientadora: Lúcia Helena Faccioli.- Ribeirão Preto, 2013.

206 p. : il.

Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Departamento de Bioquímica e Imunologia. Área de concentração:

Imunologia Básica e Aplicada.

1. Tuberculose. 2. Leucotrieno B₄ 3. *Mycobacterium tuberculosis*. 4. Prostaglandina E₂. I. Título. II. Faccioli, Lúcia Helena.

Soares, EM. **Avaliação da participação de mediadores lipídicos nas infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de humanos.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais José Adão do N. Soares e Vera Regina Jacob Soares, responsáveis pelo que me tornei; aos meus irmãos Junior e Eduardo, pelo amor e companheirismo que nos une. Em especial ao Eduardo que lá no ‘fundo’ sempre teve interesse na ciência e vinha sempre com alguma pergunta do tipo: “Tata, o que é que você estuda?”; “Que experimento você faz?” e das perguntas sempre vinham as suas exclamações imediatas encantado com minhas respostas: “Nossa Tata, que tudo!!!”

“O primeiro passo para conseguir algo é desejá-lo”.

Madre Teresa de Calcutá

“...Coragem, coragem, se o que você quer é aquilo que pensa e faz...coragem, coragem que eu sei que você pode mais...”

Raul Seixas

“Ensinou-me – sem jamais doutrinar, porque não era do seu jeito – muito sobre retidão e modéstia; sobre silêncio e trabalho; sobre simplicidade, sobre bom humor, sobre fidelidade a princípios, sobre uma eterna curiosidade intelectual(...). Esse é o verdadeiro mestre: o que não castiga mais impele, o que não doutrina mas desperta a curiosidade e a acompanha, o que não impõe mas seduz, o que não quer ser modelo nem exemplo mas companheiro de jornada, seja na vida, seja nos caminhos intelectuais”

Lya Luft

Agradecimentos

À Deus que ilumina minha vida, meus sonhos e que me dá coragem para continuar a caminhar por mais difícil que possa ser.

À minha orientadora, Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela confiança e auxílio no desenvolvimento deste trabalho e também por ter me aceitado como sua aluna durante todos estes anos que estive em seu laboratório junto com seu forte grupo de pesquisa desde o estágio, no mestrado e agora no doutorado. Agradeço todas as oportunidades e ensinamentos. Obrigada por ter participado do meu crescimento como cientista e pessoa. Hoje sou completamente diferente de 7 anos e meio atrás. Muito obrigada.

*Ao Prof. Dr. Célio Lopes Silva, pelas discussões científicas e “cervejísticas”; pela colaboração neste trabalho e também por ‘compartilhar’ conosco seu laboratório, onde todos os experimentos com *Mycobacterium tuberculosis* foram desenvolvidos.*

Aos membros da banca pela disponibilidade em participar de minha defesa e contribuição valiosa na discussão dos resultados deste trabalho: Dra. Alexandra Ivo de Medeiros, Dra. Cleni Mara Marzocchi Machado, Dr. Moisés Palaci e Dra. Maria da Glória Bonecini de Almeida.

Ao Prof. Dr. David Michael Aronoff, meu colaborador e orientador durante meu estágio sanduíche na Universidade de Michigan, Ann Arbor, EUA. Meu muito obrigada por ter me recebido tão bem e de braços abertos durante o ano que estive em seu laboratório. Meus sinceros agradecimentos pela agradável convivência e por todos os momentos intensos de experimentos no laboratório e em nossos “happy hours” sempre repletos de ‘Guinness’. Obrigada por ter me incluído como um “membro” de sua adorável família: Kelly, Wren, Josie, Liam e Annie. Você também contribuiu muito para meu crescimento pessoal e profissional.

My acknowledgements to Dr Aronoff, my collaborator and mentor for a part of my PhD at the University of Michigan, Ann Arbor, USA. Many thanks for having received me so well and with ‘open arms’ during the year I spent in your lab. My sincere gratitude for the nice living and for all the hard moments including experiments in the lab and for sure our “happy hours” always full of ‘Guinness’. Thank you for considering me as a “member” of your lovely family: Kelly, Wren, Josie, Liam and Annie. You also greatly contributed to my personal and professional upgrading.

A todos os colegas do LIIIP (Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses) que continuam no lab, ou até mesmo aqueles que já estão longe, mas que tive o prazer de conhecer e trabalhar junto: Anderson Nunes (Homer), Alexandre Rogério, Alexandra Medeiros (Xan), Adriana Malheiro, Fernanda Anibal (Fer), Lúcia de Paula (Lucinha), Eleuza, Bete, Daniela Isabel, Walter Turato (Tatu), Daniela Carlos, Brunão, Cláudia (Calúdia), Daiane, Beto, Romulo, Fran, Laís, Fabiana (FACs): por todo seu carinho, amizade fiel e muitas risadas durante todos estes anos; Priscilla (P): por termos vencido as mesmas etapas juntas; Érika, Gabriel Pietro (Berma), Gabriel Toffoli, Raphael Peres (Bro), Rodrigo, Denise (Japa): obrigada De por ser essa amiga incrível e ter sempre me dado seu voto de confiança; Gisele (Gi), Karina (Nenê), Morgana (Morgs), Ana Carolina (Xuxu), Cica, Patrícia, Tânia, Francisco e Maya, Dani Longo, Márcio e Angelita (Bá Tchê), Aline (PCR), Carlos e Lillian (agregada).

Aos colegas do laboratório LIME: Milena (Milly): obrigada pelo seu alto astral sempre, carinho independente de qualquer coisa , cervejas , risadas e longas conversas sobre a vida e a ciência ao longo destes anos; Luana (Vim-vimm!), Maira (Maíra), Fabi, Leonardo e à Mix (Fabiani) minha amiga, e líder do LIME.

Aos “presentes” que ganhei durante minha pós graduação no LIIIP, minhas queridas amigas de ontem, hoje e sempre: Adriana Secatto Sarti, Alexandra Ivo de Medeiros e Camila Peres Buzalaf. Obrigada Cá pela enorme ajuda com este trabalho. Vocês que estiveram comigo desde antes do meu ingresso na pós até o final dela...estarão comigo para o que for e onde for, em minha mente e meu coração. Vocês sabem que nossa amizade vai além das palavras.

As minhas queridas amigas, meus presentes, as quais tive o prazer de conhecer e a alegria de viver perto e intensamente juntas durante “o meu ano” em Ann Arbor:

Karen (My Dearest Flower Ever!), tão simples e ao mesmo tempo uma responsabilidade enorme falar de você: exemplo de bondade, amor, carinho, humildade, pureza, sensibilidade, companheira para todos os momentos-inclusive de shopping (risos), e tantas outras qualidades que em conjunto só poderiam resultar em uma pessoa maravilhosa: você. Agradeço à você e sua família linda - Cory, Danilo, Yasmine e D. Sônia- que me acolheram de braços tão abertos mesmo só me conhecendo apenas por nome e e-mail. Pra minha alegria você se tornou uma amiga tão querida e você sabe o quanto foi importante para a realização do meu sonho, sabe também que fará parte da minha vida pra sempre. Você esteve presente em todos os minutos. Me emociona falar de você!

Denise (Desinha) minha irmã de coração e Aninha (Cabeça) minha parceira de Guinness e exemplo de prestatividade: não diferente, vocês também fazem parte das melhores “coisas” que aconteceram em minha vida. Não existem palavras suficientes para dizer o quanto sou grata por tudo o que fizeram por mim, pois não existem mais pessoas como vocês atualmente . Ajuda daqui e dali, busca, leva, faz festa, recebe em casa, liga, corre pra lá e pra cá... acreditem, tenho cada momento guardado com muito carinho na memória e no coração. Fica aqui o registro de uma pequena parte de tudo o que aconteceu durante o ano inesquecível que vocês me ajudaram a viver e fazer dele muito especial durante meu doutorado sanduíche!

Giovana Maria P. Palma (Super) por dividir comigo 3 meses de muita alegria, risadas, carinho e muitas, muitas histórias divertidas, atrapalhadas, mal humoradas..(risos!), profissionais e pessoais longe do Brasa. Você se tornou minha pequena grande amiga pra sempre, e com você veio a sua família querida: Sr. Amauri, D. Eliana, Graziela, André, Mel e Theo.

Estamos longe, mas vocês todos vocês estão aqui comigo sempre, todos os dias e em meu coração. Obrigada! Sou muito feliz por tê-los em minha vida.

Ao Cory Hogaboam, Katsumi Nagata, Henrique e Ana Paula Serezani, pela recepção, toda ajuda, dedicação e carinho tanto no lab quanto fora dele enquanto estive em Ann Arbor.

Às minhas queridas amigas, Alyninha Fávero Galvão e Caroliiiiinnne ine ine Fontanari (Lipid Bodies, risos!) meu muito obrigada. Vocês foram essenciais para que este trabalho se completasse com sucesso, além de terem sido as surpresas mais agradáveis que puderam me acontecer nessa fase tão difícil e louca que foi exatamente o final do meu doutorado. Vocês me proporcionaram muitos momentos agradáveis no lab e fora dele.

A todos os colegas dos laboratórios dos professores Dr. Marc Peters Golden, Dr. Vincent Young, Dr. Hufnagel, Dr. Kunkel, Dr. Jason Weinberg, Dr. Peter Mancuso, Dr. Jason Bell e outros da Universidade de Michigan, Ann Arbor, EUA, os quais tive o prazer de conhecer durante meu doutorado sanduíche.

Às minhas queridas amigas Lisa Marie Rogers e Katie Lynn Mason pela amizade, companheirismo, ensinamentos no lab, happy hours e por tudo o que vivemos e passamos juntas em Ann Arbor. Também à Alison e Krystle.

To my dear friends Lisa Marie Rogers and Katie Lynn Mason for our friendship, teachings, happy hours, coffee times, fellowship and for everything we pass through together in A2...until tornados and breaking

bottles! lol. Also I would like to thanks: Ann, Alison, Judy, Casey, Charlie, Krystle, Adam, Kavita, Jhansi, Alyxandria, Fatos, Sue, Diane, Yibai, Angela, Christine, Marc, Tiffany, Zack, Brittney, Z, Emily, Tim, Sage, Joshua for our many nice times. Thanks for everyone I had the chance to know, work and live together in the lab and out there.

Ao pessoal dos “arredores”: Wendy (minha querida amiga que durante todos estes anos esteve ao meu lado pra qualquer coisa, até mesmo no banco da kombi!), Iza (Vim-vim!!!), Aninha (Rrrrrrrrr!!Peitchhiinnhhooo!!!), Rodrigo (Pregol!Amigo de longas conversas sobre a vida, a pós e sobre a ciência), Rogério (Wimbe), Cacá, Paty (minha querida), Marina, Priscilla, Beraba, Rafael (Rafinha-parça), Cassinha (minha grande amiga), Thaís (Thathá), Ana Flávia, Annie Pineros, Alexandre, Thiago Malardo, Isabela (Chimbinha), Everton (Pipi), Luciana Previato.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo que em todos estes anos durante minha pós graduação esteve sempre presente compartilhando a ciência, carinho e muitas histórias da vida.

A todos os colegas da pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada. Como são muitos e não quero esquecer de ninguém, quero dizer que cada um de vocês vai no meu coração de maneira especial por todos os momentos que vivemos juntos. Mas gostaria de deixar um agradecimento especial à alguns que estiveram mais presentes comigo no decorrer desta jornada: Thaís Herrero (Piratinha) e Eduardo Crosara, Carolina Calíari (Furinho), Juliana Veda (Bat), Gabriela Trentin (Bat 2), Daiani Alves (Thithi) e Turquinho, Fernanda Rocha (Fefer), Fabrício Souto, Giuliano, Gustavo Rocha, Helder e Raquel, Jonilson (Joni), Maria Cláudia, Maria do Carmo, Raphael Sanchez (Pandinha) e Nerry, Diego (Beackman) e Aline Sardinha, Fausto, Tiago Medina (Tiaquito), Juliana Issa (Japa!), Netão, Bernardo e Camila, Vânia Samartino (Vaninha).

As minhas amigas que sempre estiveram comigo durante a faculdade, especialização e também na pós graduação: Manuela Pucca Cerni, Ingrid Armenini, Liliane Fábio e Paula Payão. Também ao Felipe Cerni amigo de sempre, presente em todos os momentos.

A todos os meus amigos de Taquaritinga (Taqua!), especialmente minhas amigas de toda a vida: Carina Manólio (in memorian), Ariela Maria G. de Azevedo, Cíntia Costantini, Flávia Gásparo, Juliana Mazzini, Kátia Scardoelli, Luiza Navarro, Josiane Palomino, Priyanna Basso e Luciana Crozera que participaram indiretamente, mas sempre dando atenção e querendo saber um pouco mais sobre a ciência e meu trabalho.

À todos aqueles que de alguma maneira auxiliaram no desenvolvimento ou deram apoio à este trabalho. São muitas pessoas envolvidas, muito tempo, por isso deixo aqui o meu obrigada a todos. Também à Rô (manicure) e Débora.

À todos aqueles que contribuíram de alguma maneira e que fiquem aqui muito bem representados por Amarílis Oliveira, amiga querida que conheci por acaso, e a vida como ela é, nos afasta de pessoas que seriam para sempre, nos aproximando de outras essenciais para que a vida se torne mais feliz. Obrigada pelo carinho e palavras de apoio sempre! Você representa a paz, a calma e o exemplo de amizade.

À Ana Cristine, nossa secretária, por toda sua dedicação e ajuda durante todos estes anos em que estive na pós graduação. Com certeza a Imuno não seria a mesma sem você. Obrigada.

Aos funcionários do Biotério Central e da Genética (FMRP-USP), e da FCFRP-USP por cuidar dos animais utilizados nos experimentos.

Aos meus colaboradores diretos: Dr Carlos A. Sorgi, Gabriel Pietro, Msc. Caroline Fontanari, Alyne F. Galvão e Dra Camila Peres Buzalaf. Muito obrigada! Com certeza os dias, finais de semana e noites na P3 foram muito mais suaves e divertidos quando vocês estiveram lá comigo auxiliando na realização dos experimentos e na discussão dos resultados.

À Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos e Prof. Dr. Edson G Soares pela colaboração com as análises histopatológicas, assim como à Elaine e Ana pela confecção das mesmas.

Ao Prof. Dr. Moisés Palaci por ter cedido as cepas de Mycobacterium tuberculosis utilizadas no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa concedida para o desenvolvimento deste trabalho, processo número 2009/01689-7, e à CAPES pela bolsa sanduíche processo BEX-PDSE número 2652-11-0.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inflamação e Imunologia das Parasitoses do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, no Laboratório de Vacinas Gênicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, onde encontra-se a Cabine de Segurança Biológica de Nível 3 (tese principal) e no Laboratório de Interações Parasita-Hospedeiro com Ênfase em Infecções Bacterianas e Imunidade Inata na Divisão de Doenças Infecciosas, Departamento de Medicina Interna; Microbiologia e Imunologia dos Programas de Imunologia, Biociências e Ciências da Reprodução da Universidade de Michigan, MI, EUA (trabalho em anexo). Essa tese foi financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP-processo número 2009/01689-7) e a bolsa Sanduíche financiada pela Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-BEX-PDSE-processo número 265211-0).

Lista de Figuras

Figura 1. Cinética da produção de TNF- α e nitrito por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068	Pág. 58
Figura 2. Concentração de LTB ₄ e PGE ₂ no sobrenadante de MAs infectados com as duas cepas de Mtb	Pág. 60
Figura 3. Tratamento com MK886 inibe a produção de LTB ₄ mas não de PGE ₂ por MAs infectados com a cepa SV068	Pág. 62
Figura 4. Efeito do tratamento com ácido caféico, na produção de LTB ₄ e PGE ₂ por MAs infectados com Mtb	Pág. 64
Figura 5. Tratamento com MK886 não altera a produção de nitrito e de TNF- α por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068	Pág. 66
Figura 6. Efeito do tratamento com ácido caféico na produção de nitrito e TNF- α por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068	Pág. 68
Figura 7. Atividades fagocítica e microbicida de MAs são diferentes após infecção com as cepas SV068 e SV009	Pág. 70
Figura 8. Unidades formadoras de colônias recuperadas de MAs infectados após tratamento com MK886 ou ácido caféico	Pág. 72
Figura 9. Tratamento com MK886 diminui parcialmente a formação de CLs em macrófagos infectados com a cepa SV068	Pág. 74
Figura 10. Efeito do tratamento com ácido caféico na formação de CLs por MAs infectados com as cepas SV009 e SV068	Pág. 76
Figura 11. Curvas de sobrevivência de camundongos Balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 e tratados ou não com MK886	Pág. 80
Figura 12. Carga bacilar nos pulmões e baço de camundongos balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 de Mtb	Pág. 83
Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos Balb/c corados com Hematoxilina&Eosina, Tricrômio de Gomori e Ziehl Neelsen 30 e 60 dias após a infecção com as cepas de Mtb	Pág. 86
Figura 14. Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de camundongos balb/c infectados com bacilos das cepas SV009 e SV068 de Mtb, e tratados ou não com MK886	Pág. 91
Figura 15. Óxido nítrico produzido nos pulmões de camundongos balb/c infectados com as cepas de Mtb	Pág. 94
Figura 16. Citocinas produzidas pelas células do parênquima pulmonar de camundongos balb/c infectados ou não com as duas cepas de Mtb	Pág. 96
Figura 17. Produção de LTB ₄ e PGE ₂ no homogeneizado pulmonar de camundongos balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 de Mtb	Pág. 99
Figura 18. Infecção de camundongos 129 e 5LO ^{-/-} com as cepas SV009 e SV068 induzem aumento do recrutamento celular para o LBA	Pág. 102
Figura 19. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO ^{-/-} corados com Hematoxilina & Eosina	Pág. 104
Figura 20. Carga bacilar nos pulmões de camundongos 129 e 5LO ^{-/-} infectados com as cepas SV009 e SV068 de Mtb	Pág. 106
Figura 21. Concentração de citocinas no parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO ^{-/-} infectados com as duas cepas de Mtb	Pág. 109
Figura 22. Concentração de quimiocinas no parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO ^{-/-} infectados com as duas cepas de Mtb	Pág. 110

Lista de Abreviaturas

- 5-LO-** enzima 5 lipoxigenase
- 5HETE-** hidroperoxieicosatetraenóico
- AIDS:** síndrome da imunodeficiência adquirida
- AINES:** antiinflamatórios não esteroidais
- AA-** ácido araquidônico
- BLT₁-** antagonista do receptor LTB₄
- AMPc:** adenosina monofosfato cíclico
- COX:** ciclooxigenase
- CLs:** corpúsculos lipídicos
- ELISA:** ensaio imunoenzimático
- FLAP-** proteína ativadora da 5- lipoxigenase
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína
- HIV:** Human immunodeficiency virus
- i.p.:** intraperitoneal
- i.t.:** intratraqueal
- IFN- γ :** interferon gama
- LTA₄-** leucotrieno A₄
- LTA_H-** leucotrieno A₄ hidrolase
- LTA_C-** leucotrieno A₄ sintetase
- LTB₄-** leucotrieno B₄
- LTC₄-** leucotrieno C₄
- LT-**leucotrieno
- Mtb:** *Mycobacterium tuberculosis*
- NEED :** cloreto de N-(1-naftil)etil-enediamina di-hidratado
- NO:** óxido nítrico
- NO²:** Nitrito
- NOS-2:** *do inglês* nitric oxide synthase 2

OMS: organização mundial de saúde

PAMPs: *do inglês*- pathogen associated molecular patterns- padrões moleculares associados a patógenos

PG-prostaglandina

PLA₂c: fosfolipase A₂ citosólica

PGE₂-prostaglandina E₂

PBS: salina tamponada com fosfato

PMN: polimorfonucleares

PLC: *do inglês*- phospholipase C- fosfolipase C

PRRs: *do inglês*- pattern recognition receptors- receptores de reconhecimento padrão

RE: retículo endoplasmático

RIN: reativos intermediários do nitrogênio

ROI: reativos intermediários do oxigênio

SBF: soro bovino fetal

TNF- α : fator de necrose tumoral alfa

UFC- unidades formadoras de colônias

Sumário

<i>Resumo</i>	20
<i>Abstract</i>	23
<i>Introdução</i>	25
1.1 Tuberculose e resposta imune	26
1.2 Mediadores lipídicos como moduladores da resposta imune	29
1.3 Inibidores farmacológicos da atividade catalítica das lipoxigenases	32
1.4 Corpúsculos lipídicos e sua inibição farmacológica	33
1.5 Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbida.....	35
<i>Justificativas e Objetivo</i>	38
<i>Material e Métodos</i>	42
3.1. Animais.....	43
3.2. Cepas de <i>M. tuberculosis</i> isoladas de pacientes com diferentes formas de TB	43
3.3. Preparação do inóculo das diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> para infecção experimental.....	44
3.4 Tratamento dos camundongos com inibidor da síntese de leucotrienos (MK886).....	44
3.5. Infecção intratraqueal com as cepas de <i>M. tuberculosis</i> por procedimento cirúrgico	45
3.6. Análise da sobrevivência de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	45
3.7. Determinação de UFC (Unidades Formadoras de Colônia)	45
3.8. Análise do recrutamento celular para espaço broncoalveolar de camundongos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	46
3.9. Análise Histopatológica do Pulmão	47
3.10. Obtenção de macrófagos alveolares para o ensaio de fagocitose e atividade microbida.....	48
3.11. Marcação dos bacilos de <i>M. tuberculosis</i>	48
3.12. Ensaio de Fagocitose.....	48
3.13 Avaliação da atividade microbida.....	49
3.14 Coloração e contagem de CLs	51
3.15 Purificação e detecção de leucotrienos B ₄ , prostaglandina E ₂ em homogeneizados de pulmões e no sobrenadante de cultura de macrófagos	51
3.16. Detecção de quimiocinas e citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	53
3.17. Detecção de nitrito	54

3.18. Análise estatística	55
<i>Resultados - In vitro</i>	56
<i>Resultados In vivo</i>	77
<i>Discussão</i>	111
<i>Conclusão</i>	123
<i>Referências Bibliográficas</i>	125
<i>Anexos</i>	133

Resumo

RESUMO

Soares, EM. Avaliação da participação de mediadores lipídicos nas infecções experimentais induzidas por diferentes isolados de *Mycobacterium tuberculosis* de humanos [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina , 2013. 206 F.

Os mecanismos que conferem resistência do *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) à destruição pelo hospedeiro, além da sua capacidade em permanecer e/ou multiplicar-se no interior das células fagocitárias são ainda pouco compreendidos. Nosso grupo de pesquisa tem contribuído para o entendimento do papel dos mediadores lipídicos, que incluem prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) na tuberculose. PGs inibem a resposta imune celular T_H1 , a produção de citocinas e a fagocitose, e assim facilita a infecção. LTs estão envolvidos no recrutamento de leucócitos, e na modulação da síntese de citocinas, no aumento da fagocitose e dos mecanismos microbicidas, e assim contribui para a eliminação da micobactéria. Neste projeto, avaliamos *in vivo* e *in vitro* a produção e o envolvimento dos mediadores lipídicos induzidos por dois diferentes isolados clínicos de *Mtb*. Demonstramos que macrófagos alveolares (MAs) infectados com os bacilos da cepa SV009 induzem maior produção de $TNF-\alpha$, nitrito e PGE_2 do que aqueles infectados com a cepa SV068. Em contraste, MAs infectados com os bacilos da cepa SV068 induzem maior produção de LTB_4 . O tratamento com MK886, inibidor da síntese de LTs, diminuiu a atividade microbicida de MAs infectados com bacilos da cepa SV068; enquanto o tratamento com ácido caféico, também inibidor da síntese de LTs, diminuiu a atividade microbicida de MAs infectados com a cepa SV009 em relação à cepa SV068. A cepa SV068 induz maior formação de corpúsculos lipídicos (CLs), e o tratamento com MK886 ou ácido cafeíco inibiu a mesma. Além disso, bacilos da cepa SV068 foram mais fagocitados por MAs *in vitro*, embora essas células não foram eficientes em matá-los. A infecção de camundongos balb/c com a cepa SV068 diminuiu a sobrevivência dos animais em relação à infecção com a SV009, e o tratamento desses animais infectados com MK886 os protegeu parcialmente da morte, embora a carga bacilar no pulmão e baço tenha permanecida inalterada. Essa cepa induziu maior produção de nitrito pelas células do pulmão e foi mais eficiente em recrutar neutrófilos para o espaço broncoalveolar. Além disso, a infecção com a cepa SV068 promoveu maior comprometimento do parênquima

pulmonar com intensa deposição de colágeno e multiplicação bacilar. Encontramos diferenças significativas em relação à produção de citocinas inflamatórias e mediadores lipídicos após 30 e 60 dias de infecção de camundongos balb/c com as cepas SV009 e SV068. Animais 129 e 5LO^{-/-} também foram infectados com as duas cepas, e vimos que os animais 5LO^{-/-} foram mais eficientes em eliminar os bacilos após 21 dias de infecção com cepa SV068. As células dos animais 5LO^{-/-} produziram menos citocinas inflamatórias e o recrutamento celular foi menor após infecção com a SV068 em relação à cepa SV009. Sugerimos que as cepas são diferentes, e a resposta desencadeada depende de um conjunto de fatores e mecanismos, dentre eles a produção de TNF- α , LTB₄ e PGE₂.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Leucotrieno B₄, Prostaglandina E₂

Abstract

ABSTRACT

Soares, EM. Evaluation of lipid mediators participation in the experimental infections induced by different isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from human. [thesis]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, 2013. 206 F.

The mechanisms that confer resistance to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for destruction by the host, in addition to its ability to retain and/or multiply within phagocytic cells are still poorly understood. Our research group has contributed to the understanding of the role of lipid mediators, including prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) in tuberculosis. PGs inhibit Th1 cell immune response, cytokine production and phagocytosis, thus facilitating the infection. LTs are involved in the leukocytes recruitment, and modulation of cytokines synthesis, phagocytosis and microbicidal mechanisms increase, and contribute to the elimination of the mycobacteria. In this project, we evaluated *in vivo* and *in vitro* the lipid mediators production and involvement induced by the two clinical *Mtb* strains. We showed that alveolar macrophages (AMs) infected with bacilli from SV009 strain lead to an increase of TNF- α , nitrite and PGE₂ production, than those infected with the strain SV068. On the other hand, AMs infected with bacilli from SV068 strain induced more LTB₄ production. MK886 (LTs synthesis inhibitor) treatment decreased killing of SV068 bacilli by AMs, while caffeic acid treatment (also LTs synthesis inhibitor) decreased killing of SV009 bacilli by AMs. *In vitro* infection with SV068 strain induces more lipid bodies (LBs) formation, and MK886 or caffeic acid treatment inhibited its formation. Furthermore, the bacilli of SV068 strain were more phagocytosed by AMs, although these cells were not effective in killing them. The mice infection with SV068 strain decreased the survival of animals comparing with the ones infected with SV009 strain, and treatment of these infected animals with MK886 partially protected them from the death, but the bacterial load in

the lungs and spleens have stayed unchanged. This strain induced higher nitrite production by lung cells and was more efficient in recruiting neutrophils to the bronchoalveolar space. In addition, infection with SV068 strain promoted greater involvement of the lung parenchyma showing intense collagen deposition and multiplication of bacilli. We found significant differences in the production of inflammatory cytokines and lipid mediators following the infection by 30 and 60 days with the SV009 and SV068 strains in balb/c mice. The 129 and 5LO^{-/-} mice were also infected with both strains, and we found that the 5LO^{-/-} mice were more efficient to do the bacterial clearance after 21 days post infection with SV068 strain. Cells obtained from 5LO^{-/-} produced less inflammatory cytokines and had reduced cellular recruitment after infection with SV068 when compared to SV009. We suggest that the strains are different, and the response triggered depends on a number of factors and mechanisms, including production of TNF- α , PGE₂ and LTB₄.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Leukotriene B₄, Prostaglandin E₂

Introdução

1.1 Tuberculose e resposta imune

Doenças infecto-contagiosas, como a tuberculose (TB) acometem a população mundial com incidência variável devido a diversos fatores, como hábitos e condições de vida irregulares. No final do século XIX Robert Koch ^[1] identificou o agente causador dessa patologia, o *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) (ou bacilo de Koch), o que possibilitou um grande avanço no entendimento e combate à infecção por essa micobactéria. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que mais de 30% da população mundial está infectada com o *Mtb*, com 9,2 milhões de novos casos (139 para cada 100.000 habitantes) e 1,7 milhões de mortes por TB somente em 2006 ^[2]. A reemergência global da TB tem sido relacionada, entre outros fatores, à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) ^[3], que suprime o sistema imune do hospedeiro possibilitando a proliferação do bacilo que poderia estar em estado latente. Dados mais recentes da OMS reportaram uma estimativa de mais de 8.7 milhões de novos casos em 2011, dos quais 13% são co-infectados com o vírus HIV ^[4]. Paralelamente, fatores como a ineficiência dos sistemas de saúde, as condições de desnutrição e pobreza em determinadas regiões, o crescimento de fluxos migratórios e a dificuldade de adesão aos extensos esquemas terapêuticos contribuíram para o aumento da incidência da TB ^[5, 6].

Após décadas sendo negligenciada, o imenso impacto da TB na saúde pública foi reconhecido e o desenvolvimento de novas ferramentas para combater e controlar a epidemia tornou-se prioridade internacional. A atual estratégia para o controle da TB é baseada na redução de contágio através do tratamento de indivíduos com TB ativa e da vacinação de crianças em áreas endêmicas. A OMS implantou um sistema de

terapia diretamente observada (DOTS) em diversas regiões do mundo, o que ajudou no controle, mas não foi suficiente para conter a epidemia de TB global, ou prevenir o aumento de cepas multidrogas-resistentes, em parte pela desistência dos indivíduos infectados ao tratamento com complexos esquemas terapêuticos ^[3].

Em humanos, a infecção por *Mtb* ocorre após a inalação dos bacilos, que entram em contato com os macrófagos e células dendríticas residentes no pulmão, podendo ser eliminado naturalmente pelo hospedeiro, permanecer de forma latente no interior de granulomas (90% dos casos) ou induzir uma pneumonia grave em pacientes imunossuprimidos ^[7]. A infecção persistente por *Mtb* é o resultado de uma complexa interação entre o sistema imune do hospedeiro e os mecanismos de sobrevivência da bactéria. O contato do *Mtb* com macrófagos alveolares ocorre através de receptores presentes na membrana destas células ^[8], e embora a maioria dos bacilos seja degradada no interior dos fagolisossomos por enzimas lisossomais e outros mecanismos microbicidas como a produção de intermediários reativos do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RIN) ^[9], diversos bacilos ainda sobrevivem no seu interior devido à mecanismos de escape intrínsecos do patógeno. Portanto, o ponto mais importante da patogenicidade da micobactéria acontece após a fagocitose, uma vez que ela impede a fusão fagossomo-lisossomo evitando o microambiente de degradação dos fagolisossomos, garantindo assim a replicação da bactéria ^(revisado por [10, 11]). Como já mencionado a ativação da resposta imune leva à produção de citocinas que irão ativar os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, que por sua vez liberam interferon gama (IFN- γ) e fator de

necrose tumoral (TNF- α) que aumentam a capacidade dos macrófagos em produzir metabólitos do ROI e RIN, controlando assim o crescimento dos bacilos no interior destas células. O TNF- α pode atuar de formas distintas na resposta contra micobactérias ^[12, 13] sendo esta citocina primordial no “clearance” desta bactéria pelo macrófago ^[13, 14]. No entanto, *in vivo*, o papel do TNF- α vai além da ativação de macrófagos, pois regula o recrutamento de leucócitos e é fundamental para a organização e manutenção do granuloma ^[15]. A produção de TNF- α pelas células que fagocitaram os bacilos é seguida pela produção de IL-12, RIN e expressão de moléculas co-estimulatórias ^[16]. Um dos mais bem estudados mecanismos microbicidas é o da via dependente da NOS-2 (Nitric oxide synthase 2), que dá origem aos RIN tóxicos, como o óxido nítrico ^[17, 18]. Camundongos deficientes de RIN são altamente susceptíveis à infecção por *Mtb* ^[19]. Além disso, a produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas presentes no sítio de infecção, desencadeia a diferenciação de progenitores hematopoéticos, proliferação e aumento da atividade citotóxica de células T, diferenciação de células T em células T_H1 produtoras de IFN- γ culminando com o estabelecimento de resposta imune eficaz contra patógenos intracelulares ^[20]. Também, a IL-12 é crucial para a formação de granuloma ^[20, 21], sendo que a importância desta citocina na TB foi confirmada pelo aumento da resistência à infecção experimental após a administração de IL-12 exógena ^[22] e aumento da suscetibilidade dos camundongos deficientes das subunidades IL-12p35 e IL-12p40 ^[22, 23]. Ativadas pela IL-12, as células T CD4⁺ e T CD8⁺ que reconhecem antígenos apresentados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs), passam a produzir IFN- γ , que ativa os mecanismos microbicidas de macrófagos ^[24, 25]. Indivíduos com imunodeficiências que

afetam os genes que codificam o IFN- γ ou o seu receptor (IFNGR) são mais susceptíveis a infecções por micobactérias ^[26], assim como ocorre em camundongos deficientes de IFN- γ devido à falha de ativação de macrófagos e da baixa expressão de NOS-2 ^[27, 28].

1.2 Mediadores lipídicos como moduladores da resposta imune

Os produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA) são liberados após ativação celular por toxinas ^[29], complexos imunes ^[30], patógenos ou mediadores solúveis ^[31]. Estes fatores produzem distúrbio da membrana celular e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação da fosfolipase A₂ citosólica para as membranas nuclear e citoplasmática, culminando na liberação do AA dos fosfolípidios de membrana. O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem às prostaglandinas (PGs), tromboxanos, lipoxinas, 15-HETE e aos leucotrienos (LTs), substâncias estas chamadas coletivamente de eicosanóides ^[32].

As PGs são mediadores lipídicos derivados do AA pela via das cicloxigenases 1 e 2 (COX-1 e COX-2). As duas isoformas catalisam uma reação de dois passos que convertem AA em PGH₂, que é instável, e origina as PGS ^[33]. De maneira geral, a COX-1 é constitutivamente expressa em todas as células nucleadas, enquanto a COX-2 é preferencialmente detectada em tecidos inflamados. Baseado nesta expressão diferenciada, tem sido sugerido que a COX-1 é responsável pela produção basal de prostanóides envolvidos em processos fisiológicos, enquanto a COX-2 é responsável pelo aumento de prostanóides, principalmente de PGE₂, durante a inflamação e injúria tecidual ^[34, 35]. A PGE₂ é produzida pelas APCs, tais como macrófagos e células

dendríticas [36, 37]. Este mediador apresenta funções reguladoras na ativação de linfócitos T e na secreção de citocinas [38, 39]. Snijdwint *et al* [38], demonstraram que a PGE₂ inibe de modo dose-dependente, a produção de IFN- γ por leucócitos do sangue periférico e linfócitos CD4⁺, aumenta a liberação de IL-5, mas não altera a de IL-4. Ainda, a PGE₂ solúvel inibe a produção de IL-1 [40] e TNF- α por macrófagos, e a produção de IL-2 por linfócitos [38], diminuem a fagocitose de *Klebsiella pneumoniae* e *Histoplasma capsulatum* [41, 42] e suprimem a atividade microbicida das células NK [43]. Também, Aronoff *et al* [41], demonstraram *in vitro*, que a PGE₂ inibe a fagocitose de bactérias mediada pelo receptor Fc γ R, por mecanismo dependente do aumento de AMPc após a interação deste prostanóide com o seu receptor EP₂. Posteriormente o mesmo grupo descreveu que tanto PGE₂ endógena quanto exógena suprimem a capacidade microbicida de macrófagos alveolares infectados com *Klebsiella pneumoniae* e que estes efeitos são mediados pelos receptores EP₂ e EP₄ [44].

Alguns trabalhos relatam o papel da PGE₂ na TB, mas não o da PGD₂. Edwards *et al* [45] encontraram em camundongos infectados com *Mycobacterium intracellulare* alta produção de PGE₂, sendo que o tratamento destes animais com IFN- γ ou indometacina, inibidor da síntese de PGs, diminuiu o número de bacilos no pulmão e no baço. Os autores sugeriram que PGE₂ inibe a produção de IFN- γ pelos linfócitos, suprimindo assim as funções microbicidas dos macrófagos. Posteriormente, Moreno *et al* [46] mostraram que na fase crônica da infecção murina por *Mtb*, a supressão farmacológica da produção de PGE₂ contribuiu para a redução do número de bacilos nos pulmões, aumento da produção de TNF- α , IFN- γ , iNOS e do tamanho dos granulomas. Estes dados sugerem que PGE₂ produzida na fase tardia da infecção têm

participação na patogênese da TB. Dados do nosso laboratório demonstraram que a infecção pelo *Mtb* induz a produção de PGE₂ nos pulmões e que a inibição das PGs pelo tratamento com celecoxibe, diminui a liberação de TNF- α , IL-1 e IL-6, sugerindo que estes lipídeos indiretamente regulam o recrutamento e ativação de leucócitos resultando na diminuição de bacilos nos pulmões mantendo em 100% a sobrevivência dos animais ^[47].

Além das PGs, os LTs constituem um grupo importante de mediadores lipídicos envolvidos no recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos, ativação celular e regulação da resposta imune ^[48-54]. LTs são metabólitos derivados do AA pela via da 5-lipoxigenase, e são secretados por macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos ^[55, 56]. Wirth e Kierszenbaum ^[57, 58] foram os primeiros a relatar *in vitro*, o papel dos LTs nos mecanismos de defesa, pois demonstraram que tanto LTB₄ quanto LTC₄ aumentam a fagocitose e a morte de *Trypanosoma cruzi* por macrófagos peritoneais. Posteriormente, o papel de LTs na atividade bactericida *in vivo* foi descrito por Demitsu *et al* ^[59], após mostrarem que a administração de LTB₄ na cavidade peritoneal, aumentou o “clearance” destes microorganismos por células do local. Nosso grupo de pesquisa demonstrou, que a inibição da síntese de LTs na TB, pelo tratamento dos animais com MK886, um inibidor da via da 5 lipoxigenase, não alterou o recrutamento celular e a liberação de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, mas resultou na inibição da síntese de IL-12 na fase crônica e de IL-2 nas fases aguda e crônica da infecção, e resultou na morte de 50% dos animais ^[47, 60].

Nos últimos anos, vários artigos têm reforçado a importância dos LTs nos mecanismos de defesa nas infecções. Bailie *et al* ^[61] foram os primeiros a relatar que

animais deficientes da enzima 5-LO (5-LO^{-/-}) são mais suscetíveis à infecção por *K. pneumoniae*. Atualmente, sabe-se que o aumento da suscetibilidade dos animais 5-LO^{-/-} está associado com deficiência da fagocitose e da atividade microbicida dos macrófagos [62], sendo que a adição exógena de LTB₄ às culturas de macrófagos alveolares obtidos de animais 5-LO^{-/-} restaura estes mecanismos [61, 63]. Além disso, Chen, *et al* [64] demonstraram que os LTs têm importante função no controle da replicação viral independente da deficiência da síntese de IFN- γ e IL-12. Sabe-se ainda que pacientes portadores do vírus do HIV apresentam aumento da suscetibilidade às infecções pulmonares pela deficiência na síntese de LTs devido à redução da expressão da FLAP (*do inglês 5-lipoxygenase activate protein*) [65-67]. Macrófagos alveolares (MA) e polimorfonucleares (PMN) obtidos destes indivíduos apresentam atividade microbicida reduzida para *Cryptococcus neoformans*, sendo que a adição exógena de LTB₄ reverte esta deficiência [67]. Outros trabalhos têm demonstrado que os LTs regulam a resposta imune protetora, quer seja do padrão T_H1 ou do T_H2, em infecções como aquelas por *K. pneumoniae* [61], *H. capsulatum* [54], *Strongyloides venezuelensis* [68], *Leishmania amazonensis* [69]. Neste contexto, mostramos que a infecção pelo *Mtb* induz produção de LTB₄ nos pulmões, persistente até pelo menos 60 dias após a infecção, sendo esta importante para o desenvolvimento de resposta protetora do hospedeiro [70]. Nestas infecções, os LTs regulam a fagocitose, os mecanismos microbicidas e a produção de citocinas [70].

1.3 Inibidores farmacológicos da atividade catalítica das lipoxigenases

O ferro é essencial para a atividade catalítica da via das lipoxigenases e está presente na 5-LO na forma de âncoras tríade que é uma característica comum do sítio

ativo mononuclear de enzimas com Fe^{2+} em núcleo não-heme ^[71]. Durante a catálise da 5-LO, ocorrem ciclos de ferro entre as formas Fe^{2+} e Fe^{3+} . Existem estratégias farmacológicas eficazes para a inibição da síntese celular dos produtos da 5-LO. Os inibidores diretos da 5-LO podem ser classificados de acordo com o modo de ação: i) inibidores redox-ativos da 5-LO, que atuam através da redução do ferro do sítio ativo, assim dissociando o ciclo catalítico da enzima; ii) inibidores de ligantes de ferro, contendo grupos de ácido hidroxâmico ou N-hidroxiuréia que quelam o ferro do sítio ativo; iii) inibidores não-redox do tipo que competem com AA para ligação a 5-LO sem propriedades redox. Dentre estes inibidores, existe uma classe dos redox-ativos lipofílicos da 5-LO, de origem vegetal que é o ácido caféico. Fármacos derivados do ácido caféico mantêm o sítio ativo do ferro no estado ferroso, assim, desacoplando o ciclo catalítico da enzima. Eles são inibidores eficientes da 5-LO na formação do produto, mas a maioria deles tem pouca biodisponibilidade e possuem baixa seletividade para 5-LO ^[72, 73]. O ácido caféico além de ser um antioxidante inibidor de 5-LO, também possui a capacidade de inibir o crescimento de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, e algumas leveduras ^[74].

1.4 Corpúsculos lipídicos e sua inibição farmacológica

Embora a via enzimática da formação de eicosanóides seja bem compreendida, a região celular de ação das enzimas envolvidas na biossíntese destes mediadores e a fonte celular do AA durante o processo inflamatório não estão bem elucidados. O reservatório de fosfolipídios que armazenam AA está localizado nas membranas. No entanto, há vários estudos demonstrando a formação de estruturas intracelulares ricas

em lipídios não associadas à membrana, denominadas corpúsculos lipídicos (CLs) ^[75]. Diferente dos adipócitos, nos leucócitos a formação de CLs é específica e dependente do estímulo ^[76-78], do tipo celular ^[79] e de receptores ^[77, 80-82]. Os CLs são tipicamente escassos em leucócitos não ativados, mas caracteristicamente aumentados em número e tamanho *in vitro* e *in vivo* em células inflamatórias ^[76, 82-86]. Os CLs compartimentalizam enzimas envolvidas na biossíntese e catabolismo dos lipídios ^[87-92], incluindo aquelas que formam os eicosanóides ^[79, 93, 94]. Ultraestruturalmente, os CLs aparecem como organelas osmiofílicas variáveis ^[95]. Após estudos demonstrando o conteúdo protéico e lipídico dos CLs e sua associação com outras organelas intracelulares, estes foram declarados como domínios intracelulares que funcionam como organelas multifuncionais com funções de sinalização celular, ativação, regulação do metabolismo lipídico e da síntese e secreção de mediadores inflamatórios ^[96]. A inibição da formação de CL como alvo terapêutico antiinflamatório tem sido motivo de vários estudos. Aspirina e outros antiinflamatórios não-esteróides (AINEs) inibiram a formação de CL *in vivo* e *in vitro* ^[80, 97, 98]. Salicilato de sódio e indometacina, também inibem a formação de CL em macrófagos ^[80, 97]. Há evidências que confirmam a hipótese de que PGE₂ endógena derivada de CL modula a resposta inibitória em macrófagos infectados por micobactérias ^[37, 99]. Assim, a inibição de CL em macrófagos não só leva à diminuição destas organelas, mas também aumenta a morte celular dos macrófagos infectados com micobactérias, dando suporte a hipótese de que os CLs podem ter implicações na patogênese da infecção por micobactéria ^[100].

1.5 Mecanismos moleculares envolvidos na fagocitose e atividade microbicida

Os macrófagos são importantes células envolvidas nos mecanismos de defesa contra microorganismos e suas atividades podem ser reguladas pelos mediadores lipídicos. Neste contexto, Mancuso e Peters-Golden ^[101] demonstraram que LTs aumentam a fagocitose *in vitro* de bactérias opsonizadas com soro imune ou IgG. As interações dessas opsoninas com seus receptores ativam cascatas de sinalização que resultam, no aumento de Ca^{2+} intracelular, liberação de AA e ativação de quinases como SyK, PI-3K, MAPK e PKC. Além disso, sabe-se que diferentes isoformas de PKC ativam proteínas do complexo NADPH oxidase, responsáveis pela geração dos ROI importantes nos mecanismos microbicidas dos macrófagos ^[102]. Ainda quanto à atividade microbicida, Serezani e colaboradores ^[44] mostraram que o tratamento de MAs com PGE_2 inibe a morte de *K. pneumoniae*, e que o tratamento com indometacina, restaura a atividade microbicida dos macrófagos. Lee e colaboradores ^[103], demonstraram que balanço existente entre LTB_4 e PGE_2 regula a fagocitose de macrófagos alveolares via adenosina monofosfato cíclico (AMPC). Sabe-se ainda, que após fagocitose de alvos opsonizados com IgG, há liberação de LTB_4 , o qual se liga ao seu receptor BLT1, que ativa a cascata de sinalização intracitoplasmática culminando com a diminuição de AMPC e aumento da fosforilação de Syk levando à ativação celular. Essa ligação também ativa PLC (via proteína $\text{G}\alpha_{q/11}$) que leva ao aumento de IP_3 , que juntamente com a sinalização desencadeada por $\text{FC}\gamma\text{R}$ favorecem a fagocitose e morte de bactérias intracelulares por MAs ^[104]. No entanto, a ativação inicial dos macrófagos por cepas de micobactérias virulentas, na maioria das vezes, é

insuficiente para eliminá-los, e freqüentemente a bactéria persiste principalmente nos indivíduos susceptíveis ou imunocomprometidos.

Embora existam vários trabalhos caracterizando a base molecular da patogenicidade do *Mtb*, ainda não se compreende totalmente os mecanismos que conferem resistência das micobactérias à destruição pelo hospedeiro, e quais os fatores relacionados com sua capacidade em permanecer e/ou multiplicar-se no interior das células fagocitárias. Pouco se conhece sobre quais os fatores da bactéria ou do hospedeiro que determinam as diferentes formas clínicas da doença. Sabe-se que a infecção por *Mtb* pode se apresentar em diferentes formas, pulmonar cavitária, pulmonar não cavitária, ou ainda extrapulmonar. A pulmonar é a forma clínica mais freqüente e a mais grave, e a extrapulmonar é decorrente da disseminação dos bacilos pelas correntes sanguínea e/ou linfática, a partir do foco inicial no pulmão. Freqüentemente, as reinfecções comprometem preferencialmente os pulmões e resultam em lesões circunscritas, com evolução e reação inflamatória mais intensa devido à hipersensibilidade tardia com cavitação e fibrose. A TB pulmonar que evolui para a forma cavitária é conseqüência da liquefação e drenagem do conteúdo caseoso da lesão granulomatosa. Neste caso, as lesões são mais comuns nos ápices pulmonares, devido à maior tensão tecidual de oxigênio, necessário ao desenvolvimento do bacilo [105].

O grupo de pesquisa do Prof. Dr. Moisés Palaci tem estudado na TB, a resistência aos medicamentos, o impacto da vacinação com BCG e também o uso de técnicas como PCR para identificação de diferentes isolados do *Mtb* de amostras clínicas [106-109]. Apesar destes pesquisadores possuírem inúmeros isolados de *Mtb*,

obtidos de pacientes com diferentes formas clínicas da TB, até o momento não identificaram quais fatores dos bacilos ou do hospedeiro, são responsáveis pelas diferentes manifestações da doença. Estudos têm demonstrado que diferentes cepas de *Mtb*, que induzem resposta imune diferente no hospedeiro, quando inoculadas em animais apresentam diferenças quanto à virulência e à capacidade de induzir lesões em animais experimentais ^[110]. Uma maior virulência de cepas de *Mtb* pode ser notada através da observação de características clínicas da doença em indivíduos sintomáticos como, por exemplo, carga bacilar, severidade da doença, transmissibilidade, disseminação e letalidade ^[110-113]. De fato, alguns *clusters* de cepas virulentas de *Mtb* foram identificados dessa forma. As famílias de cepas W/Beijing e CDC 1551 são exemplos de cepas virulentas geneticamente caracterizadas somente após a observação de quadros clínicos e epidemiológicos de virulência, ressaltando a importância da análise epidemiológica na identificação desses grupos ^[111]. Nosso grupo, também tem trabalhado com duas cepas de *Mtb* isoladas de pacientes. Nós demonstramos que aquela que não possui os genes da fosfolipase C (PLC), induz reação inflamatória menos intensa, menor produção de citocinas e mediadores lipídicos na fase crônica da infecção, e é menos virulenta que a cepa que possui os genes que codificam a PLC, e são mais eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro. Estes resultados sugerem que a PLC do *Mtb* constitui um fator de virulência deste bacilo e está envolvido na patogenicidade da doença ^[114].

Justificativas e Objetivo

Nosso grupo de pesquisa tem estudado o papel dos mediadores lipídicos, PGs e LTs na resposta imune na tuberculose. Demonstramos que a infecção de animais com a cepa H37Rv induz síntese de PGE_2 e LTB_4 , e que a inibição desses mediadores através do tratamento dos animais infectados com celecoxibe (inibidor da síntese de PGs) resultou em aumento da sobrevivência com diminuição da carga bacilar nos pulmões. Por outro lado o tratamento com MK886 (inibidor da síntese de LTs) levou à diminuição da sobrevivência, com aumento de bacilos nos pulmões ^[115]. Também mostramos que a PLC de *Mtb* é um fator de virulência do bacilo ^[114], e que este fenômeno parece estar relacionado com a indução diferencial de mediadores lipídicos pelo hospedeiro. No entanto, ainda nada se sabe sobre a relação entre a produção destes mediadores lipídicos por macrófagos alveolares, e a patogenicidade em animais, de outros isolados clínicos, os quais, em humanos, são responsáveis pela tuberculose extrapulmonar e não-cavitária. Assim, temos como hipótese neste projeto, que a patogenicidade de diferentes isolados de *Mtb*, em camundongos, pode estar relacionada com a capacidade destes em induzirem maior ou menor produção de citocinas, LTs e/ou PGs, pelos macrófagos alveolares, que são as primeiras células a entrarem em contato com os bacilos na infecção pulmonar e também responsáveis pelo início da ativação da resposta imune. Este estudo poderá auxiliar no desenvolvimento de abordagem terapêutica mais eficaz.

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar em camundongos, a relação entre a patogenia da infecção, os mecanismos efetores da resposta imune inata e a produção de citocinas, de LTs e/ou PGs induzidos por dois isolados clínicos de *Mtb*.

Para isso, as estratégias de estudo utilizadas foram:

Estudos in vitro

Macrófagos alveolares obtidos de ratos Wistar foram infectados ou não *in vitro* com as cepas SV068 e SV009, e tratados ou não com os inibidores da síntese de LTs , os compostos MK886 e ácido caféico para a avaliação:

1. Da produção de nitrito e TNF- α ;
2. Da produção de LTB₄ e PGE₂;
3. Da formação de corpúsculos lipídicos.

Avaliamos também:

1. A atividade fagocítica;
2. A atividade microbicida.

Estudos in vivo

Em camundongos Balb/c infectados intratraquealmente (i.t.) com as cepas SV068 e SV009 foram avaliadas:

1. A curva de sobrevivência;
2. As unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e dos baços;
3. A histopatologia dos pulmões;

4. A cinética do recrutamento celular para os pulmões;
5. A produção de citocinas;
6. A produção de nitrito;
7. A produção de mediadores lipídicos.

Para avaliação do envolvimento dos LTs na infecção *in vivo*, utilizamos camundongos 129 e 5LO^{-/-} que foram infectados intratraquealmente (i.t.) com as cepas SV068 e SV009 para análise:

1. Das unidades formadoras de colônias (UFC) recuperadas dos pulmões e dos baços;
2. Da cinética do recrutamento celular para os pulmões;
3. Da produção de citocinas;
4. Da histopatologia dos pulmões.

Material e Métodos

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c, sv129 e 129-*Alox5^{tm1Fun}* (5LO^{-/-}) (20 – 25 g), e ratos Wistar (220-270 g), provenientes do Biotério Unidade II da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Após a infecção dos camundongos, os mesmos foram mantidos com livre acesso a água e alimento em isoladores no laboratório de biosegurança nível 3 (NBS3) do Núcleo de Pesquisa em Tuberculose (NPT) - Departamento de Bioquímica e Imunologia - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. Os experimentos foram realizados com 5/6 animais por período de análise (*in vivo*). Os ratos foram utilizados para obtenção de macrófagos alveolares para os estudos *in vitro*. A eutanásia dos camundongos foi feita por superdose de anestésico, utilizando Cloridrato de Quetamina e Xylasina nas doses de 80 mg/kg e 15 mg/kg respectivamente. Quanto aos ratos, os mesmos foram eutanasiados individualmente em de câmara CO₂/O₂.

3.2. Cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes com diferentes formas de TB

As cepas de *Mtb* utilizadas neste projeto foram obtidas de pacientes e fornecidas pelo Prof. Dr. Moisés Palaci do Núcleo de Doenças Infecciosas da UFES, e caracterizadas molecularmente pela Doutoranda Solange Alves Vinhas, de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos e mediante a aprovação das Comissões de Ética em Pesquisa da UFES, protocolo 098/2006. Foram utilizadas cepas isoladas de pacientes com a TB extrapulmonar (SV068) e não cavitária (SV009) sendo que todas possuem os genes que codificam a

fosfolipase C (*plcA*, *plcB*, *plcC* e *plcD*). As cepas foram mantidas em meio de cultura líquido Midlebrook 7H9 (Difco, Detroit, Michigan), a 37°C, durante 10 dias, período em que a cultura atinge a fase logarítmica de crescimento. Todos os procedimentos com os bacilos provenientes destas cepas foram realizados na cabine de segurança biológica nível 3. Nesta, foram realizadas as infecções com os bacilos e as manipulações de material contaminado. Utilizamos para alguns experimentos *in vitro* a cepa de *Mtb* padrão conhecida como H37Rv-cepa virulenta.

3.3. Preparação do inóculo das diferentes cepas de *M. tuberculosis* para infecção experimental

A preparação do inóculo dos isolados para a infecção foi feita a partir de colônias que crescerem em meio de cultura líquido Midlebrook após 10 dias de cultura. A suspensão foi agitada em vórtex até adquirir aspecto homogêneo e, em seguida, comparada com a escala McFarland, onde o índice 1 equivale a 3×10^8 bacilos/ml. A viabilidade do inóculo foi testada com diacetato de fluoresceína e brometo de etídeo (Sigma Chemical Co., St Louis USA), de acordo com McDonough & Kress ^[116]. A infecção foi realizada quando a viabilidade encontrou-se superior a 80%.

3.4 Tratamento dos camundongos com inibidor da síntese de leucotrienos (MK886)

Os camundongos Balb/c receberam tratamento por via oral (gavagem), com o inibidor da síntese de LTs (MK886) (doador pela Merck Frosst Canada Inc), sendo a primeira dose uma hora antes da infecção com as cepas SV009 e SV068, posteriormente, receberam o tratamento diário sempre no mesmo horário e ao final do

experimento uma hora antes da eutanásia. O composto foi diluído em 100 µL de etanol mais 900 µL de água e completou-se o volume adequado de acordo com o número de camundongos a serem utilizados. Assim, a dose administrada para cada animal foi de 5mg/Kg em 0,5 mL.

3.5. Infecção intratraqueal com as cepas de *M. tuberculosis* por procedimento cirúrgico

Camundongos balb/c, 129 e 5LO^{-/-} foram anestesiados i.p. (intraperitonealmente) com quetamina e xylasina, nas doses de 80 mg/kg e 15 mg/kg, respectivamente. Os mesmos tiveram suas traquéias expostas e inoculadas intratraquealmente (i.t.) com 100 µL de suspensão contendo 1×10^5 bacilos das cepas SV009 e SV068 de *Mtb*. Os animais controle receberam 100 µL da solução PBS estéril.

3.6. Análise da sobrevivência de camundongos infectados com *M. tuberculosis*

Camundongos balb/c foram infectados com 1×10^5 bacilos viáveis das cepas SV009 e SV068 de *Mtb*. Os camundongos infectados foram tratados por via oral (gavagem) com MK886 ou não, e a sobrevivência foi acompanhada. A morte dos camundongos dos diferentes grupos foi registrada diariamente, e a curva de sobrevivência determinada.

3.7. Determinação de UFC (Unidades Formadoras de Colônia)

Após 21 dias de infecção com as cepas SV009 e SV068 para os camundongos 129 e 5LO^{-/-} e 30 e 60 dias de infecção para os camundongos balb/c, tiveram os pulmões e baços removidos e submetidos à pesagem em placas de Petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo 3 mL de RPMI-I (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA).

Para determinação das UFCs no baço, a suspensão de células foi obtida através da dispersão de células dos órgãos em peneiras de nylon. Após a obtenção da suspensão, e diluições de 1:100 e 1: 1000, 100 µL das amostras foram adicionadas em placas de Petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.) contendo BHI-ágar 7H11, preparado com ágar 7H9 suplementado com glicerol. Após 21-30 dias de cultivo em estufa 37 °C, o número de UFCs foi contado e o valor corrigido em UFC por órgão. Para determinação das UFCs no pulmão, foi utilizado o segundo lóbulo esquerdo. Após a retirada, o mesmo foi pesado e em seguida cortados em pequenos fragmentos. Após o processamento dos cortes, os fragmentos foram transferidos para tubos cônicos de 50 mL contendo meio RPMI-I e 0,5 µg/mL de collagenases (Liberase Blendzymes, Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN, USA) e incubados a 37 °C, durante 30 minutos sob agitação (agitador orbital a 150 rpm, Incubator Shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). Decorrido o tempo de incubação, a dispersão das células pulmonares foi realizada com auxílio de uma seringa de 20 mL. Diluições de 1:1000, 1:10.000 e 1:100.000 foram feitas, e alíquotas de 100 uL da suspensão celular de cada amostra foram adicionadas em placas de Petri (Falcon, BD, Franklin Lakes, N.J.), contendo BHI-ágar 7H11, preparado com ágar 7H9 suplementado com glicerol (Cinética Química Ltda, Brasil). Após 21-30 dias de cultivo em estufa 37 °C, o número de UFCs foi contado e o valor corrigido de UFC por grama do órgão ^[47, 117].

3.8. Análise do recrutamento celular para espaço broncoalveolar de camundongos infectados com *M. tuberculosis*

Após 30 e 60 dias de infecção (para os camundongos balb/c) e 21 dias de infecção (para os camundongos 129 e 5LO^{-/-}), as células do lavado broncoalveolar

(LBA) foram obtidas através da inserção de um catéter acoplado a uma seringa contendo 1 mL de PBS estéril. Este procedimento foi repetido 3 vezes com o mesmo volume para obtenção da suspensão celular. O exsudato foi coletado individualmente de cada animal e adicionado separadamente em tubos de plásticos. A contagem de células totais presentes nos lavados foi feita empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram feitas a partir de esfregaço preparado em citocentrífuga (Cytospin 3, Shadon Southern products Ltd., Chesshire, UK) e submetidas à coloração por Panótico Rápido (Laborclin LTDA, Pinhais, Paraná, Brasil) ^[54, 118].

3.9. Análise Histopatológica do Pulmão

Nos períodos de infecção descritos acima, os pulmões dos camundongos balb/c, 129 e 5LO^{-/-} foram removidos e fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina. No dia seguinte os pulmões foram transferidos para álcool 80% e os tecidos foram fixados em tampão de Millonig (10% de formaldeído-Sigma St. Louis, MO, USA) 1,86% de fosfato de potássio monobásico e 0,42% de hidróxido de sódio-MERCK, Montreal, Canadá, pH = 7.4) e inclusos em parafina. Cortes histológicos, com 5 µm de espessura, foram corados com hematoxilina&eosina (HE), Ziehl-Neelsen (específica para os bacilos) e Tricrômio de Gomori (deposição de colágeno) ^[119]. As análises histopatológicas foram feitas em colaboração com Prof. Dr. Edson G. Soares e Profa. Dra. Simone G. Ramos do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

3.10. Obtenção de macrófagos alveolares para o ensaio de fagocitose e atividade microbicida

Ratos Wistar não infectados foram eutanasiados individualmente utilizando câmara de CO₂/O₂ e as células do LBA obtidas como descrito [120]. Após centrifugação as células foram ressuspensas em RPMI- I 1640, a viabilidade determinada com Azul de Trypan, e após contagem a suspensão final de células foi ajustada para 2×10^6 células/mL. Desta suspensão, 100 µl foram distribuídos em placas de 96 poços e incubadas por 3 horas (37°C, 5% CO₂), e em seguida as células não aderentes foram removidas com lavagem com RPMI-I. As células aderentes foram cultivadas durante a noite em 200 µl RPMI contendo 10% de soro bovino fetal (RPMI-C) foram posteriormente utilizadas para avaliar a atividade fagocítica e microbicida após infecção *in vitro* com as cepas H37Rv, SV 009 e SV 068.

3.11. Marcação dos bacilos de *M. tuberculosis*

A marcação dos bacilos de *Mtb*, foi feita através da incubação com solução 0,5 µg/mL de isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA) durante uma hora à 37°C. Após duas lavagens com 10 mL de PBS 1 vez concentrado para retirada de excesso de FITC, os bacilos foram utilizados nos ensaios de fagocitose.

3.12. Ensaio de Fagocitose

Macrófagos alveolares (2×10^5) foram obtidos de ratos wistar conforme descrito no item 3.10. Dois poços contendo macrófagos foram tratados com um inibidor de fagocitose, a citocalasina D (5 µg/mL) (Sigma Chemical Co., St Louis, USA), por 30

minutos. Em seguida foram adicionados os bacilos das cepas H37Rv, SV009 e SV068 (2×10^5) previamente marcados com FITC como descrito no item 3.11, na proporção de um bacilo para um macrófago (1:1) ^[120] por 2 horas (tempo para que ocorra a fagocitose). O sobrenadante foi descartado e a placa de cultura lavada duas vezes com 100 µl/poço de PBS. Em seguida foi adicionado 100 µl de Azul de Tripán (0,25mg/mL) (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) para quelar a fluorescência extracelular, e após 1 minuto na ausência de luz foi feita a leitura. A média da intensidade de fluorescência (MIF) emitida pelos bacilos marcados foi avaliada em espectrofluorímetro (Gemini XPS, Molecular Devices) ^[120, 121] utilizando comprimentos de onda 485nm (emissão) e 538 nm (excitação). A avaliação da fagocitose foi determinada através da média de intensidade de fluorescência obtida da leitura dos poços contendo células e *H. capsulatum*, subtraído dos valores obtidos nos poços citocalasina D e ligação não específica (LNE).

3.13 Avaliação da atividade microbicida

Para avaliação da atividade microbicida, macrófagos alveolares obtidos de ratos wistar (2×10^5) foram incubados com os bacilos das cepas H37Rv, SV009 e SV068 na proporção de 1:1. Após 2 horas de incubação, as células foram lavadas 2 vezes com PBS estéril morno para remoção dos bacilos não fagocitados. Nos poços controle foram adicionados 200 µL de saponina 0,5% e incubados em estufa 37 °C por 10 minutos para a lise das células, e 100 µL foram plaqueados em BHI-ágar 7H11 para a determinação das UFCs. As UFCs recuperadas (contadas) destes poços foram

consideradas como UFCs controle. Os poços restantes receberam tratamentos específicos ou RPMI-I. O tempo de cultura para avaliação da atividade microbicide foi de 24 horas em estufa 37 °C/5% CO₂. Após este período, o sobrenadante foi coletado e armazenado para posterior quantificação de citocinas, mediadores lipídicos e óxido nítrico. Para determinação das UFC após 24 horas, as células foram lisadas com 20 uL de saponina 0,5% e incubados em estufa 37 °C por 10 minutos para a lise das células e 100 uL de cada poço foi plaqueada em BHI-ágar 7H11. Após 21-30 dias de cultivo em estufa a 37 °C, as UFCs foram contadas e os valores foram considerados como UFC experimental. A atividade microbicide foi calculada de acordo com a fórmula: $[100 - (\text{UFC experimental} \times 100 / \text{UFC controle})]$ ^[70, 117].

Outro método utilizado para determinação da atividade microbicide foi o ensaio de Alamar Blue (Invitrogen, Life Technologies). Esse reagente contém um composto chamado resazurina que interage com enzimas mitocondriais de células viáveis formando um composto fluorescente denominado resofurina. Para avaliarmos a atividade microbicide por este método, o ensaio foi realizado nas mesmas condições descritas acima. No entanto após a lise dos macrófagos com 0,5% de saponina foram adicionados 10 uL do Alamar Blue na concentração de 1mg/mL e o lisado foi incubado por 24 horas em estufa 37 °C/5% CO₂ para que ocorresse a metabolização da resazurina pelas leveduras viáveis. Após esse período, a intensidade de fluorescência foi avaliada em espectrofluorímetro com 560 nm (emissão)/ 590nm (excitação). Os resultados foram expressos como porcentagem das unidades relativas de fluorescência (RFU) das condições experimentais em relação ao RFU da condição controle (macrófago infectado e não tratado).

3.14 Coloração e contagem de CLs

Para coloração e contagem de CLs, lamínulas contendo macrófagos alveolares de ratos, infectados ou não com *Mtb*, foram fixadas por imersão em solução de formaldeído 3,7% (v/v) diluído em solução salina Hanks-HBBS (sem Ca^{+2} e Mg^{+2} ; pH 7,4), por 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem por imersão em água destilada por 5 minutos, 200 μL de tampão cacodilato 0,1 M (pH 7,4) foi adicionado, juntamente com 200 μL de solução de OsO_4 1,5% (m/v) diluído em tampão cacodilato e incubadas livre de luz por 30 minutos à temperatura ambiente. Após lavagem por imersão em água destilada, foram adicionados 300 μL de solução de tiocarbohidrazina 1,0 % (m/v) diluído em água destilada, por 5 minutos à temperatura ambiente, seguido de nova lavagem. Para melhor fixação do corante, foram novamente adicionados 200 μL de tampão cacodilato 0,1 molar, juntamente com 200 μL de solução de OsO_4 1,5% (m/v) por 3 minutos à temperatura ambiente, livre de luz. Novamente foram lavadas em água destilada, estas foram secas para posterior análise. A morfologia das células foi observada e os CLs contados em microscópio óptico com objetiva em óleo de imersão (100X). Cem células por lâmina foram avaliadas e os resultados expressos em número de CLs por células.

3.15 Purificação e detecção de leucotrienos B_4 , prostaglandina E_2 em homogeneizados de pulmões e no sobrenadante de cultura de macrófagos

A detecção de LTs e de PGs foi realizada após homogeneização dos pulmões com 2 mL de RPMI-I contendo EDTA na concentração de 1 mM e indometacina na concentração de 10 μM , ou no sobrenadante de cultura de macrófagos alveolares por

Ensaio Imunoenzimático Competitivo de acordo com as instruções do fabricante. Os pulmões foram homogeneizados com o homogeneizador Ultraturax T 50 IKA – Labortechnik, Germany. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 min a 4000 rpm (centrífuga Heraeus Megafuge 16 R, Thermo Scientific) e o sobrenadante foi coletado e armazenado à -70 °C até o momento da dosagem. Resumidamente, a fração lipídica das amostras foi purificada e as amostras foram acidificadas com HCl 1N pH 3,4 - 3,6 e passadas através das colunas Sep-Pak® C18 (Waters Associates, MA, USA) previamente lavadas com 10 mL de água e 10 mL de etanol 35%. Resumidamente, os mediadores lipídicos contidos nas amostras foram eluídos da coluna com 2 mL de etanol absoluto e liofilizadas em banho de nitrogênio até secagem completa. Após liofilização, as amostras foram ressuspensas em 200 µL de metanol e armazenadas até o momento da dosagem. A seguir, as amostras foram secas novamente e ressuspensas em 250 µL do tampão fornecido pelo kit utilizado (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA). Para o ensaio imunoenzimático, foram utilizadas as placas de 96 poços recobertas com anticorpos anti-igG fornecidas pelo fabricante e adicionados 100 µL de amostra nos poços específicos, juntamente com a curva padrão, branco, atividade total e ligação não específica. Também foram adicionadas a solução conjugada específica para LTB₄ ou PGE₂ e o anticorpo policlonal também específico para LTB₄ ou PGE₂. Após incubação de 2 horas, as placas foram lavadas e o substrato adicionado. Ao final do ensaio a solução de parar a reação foi adicionada e as placas lidas imediatamente utilizando densidade óptica de 405 nm. As concentrações foram calculadas a partir da curva padrão e após subtração do branco (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA).

3.16. Detecção de quimiocinas e citocinas por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Para detecção de quimiocinas e citocinas no sobrenadante de cultura ou homogenato de pulmão, utilizamos o método de ELISA e avaliamos RANTES, MCP-1, IL-8; IL-1 β e α , IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10 (R&D Systems, Inc., MN, USA) empregando anticorpos específicos e citocinas padrão, de acordo com as instruções do fabricante.

Para quantificação das citocinas e quimiocinas foram adicionados aos tubos um volume de RPMI-I correspondente ao peso do pulmão e os respectivos tubos foram submetidos à homogeneização (Ultraturrax T 50 IKA – Labortechnik, Germany). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 15 min a 4000 rpm (centrífuga Avanti 30, Beckman). A seguir, o sobrenadante foi coletado e submetido à dosagem de citocinas.

Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS na concentração de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$, e 100 μL /poço colocados na placa. Após incubação das placas por 18 horas a temperatura ambiente, as mesmas foram lavadas com PBS acrescido de Tween 0,05% (Sigma, MO,USA) (tampão de lavagem). Após as lavagens e secagem das placas, foram adicionados 200 μL de tampão bloqueio (R&D Systems, Inc., MN, USA) diluído em água Milli-Q na concentração de 200 ng/mL seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após o bloqueio, os poços foram lavados novamente com tampão de lavagem, e então adicionados 100 μL de amostra (sobrenadante de cultura ou homogenato de pulmão) para a quantificação das citocinas ou quimiocinas. Após a incubação por 2 horas à temperatura ambiente, foram repetidas as lavagens e

adicionados 100 µL dos anticorpos de detecção diluídos em tampão bloqueio. A seguir, foi feita a amplificação da reação pela adição de 100 µL/poço da enzima estreptoavidina/peroxidase diluída em tampão bloqueio e incubadas por mais 20 minutos. Após novo ciclo de lavagem, foram adicionados 100 µL/poço da solução de substrato (TMB), e as placas foram observadas até a formação de cor suficiente para parar a reação utilizando 50 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4 1M) em cada poço. A densidade ótica foi avaliada em leitor de microplacas em 450 nm (μ Quant, Bio-Tek instruments Inc., VT, USA) e a concentração de citocinas e quimiocinas calculadas a partir da curva padrão.

3.17. Detecção de nitrito

Os sobrenadantes de cultura dos macrófagos de ratos e homogenato de pulmão de camundongos foram coletados e armazenados até o momento da detecção de óxido nítrico pelo método de Griess. Para a dosagem, foram utilizadas microplacas sendo adicionados 100 µL/poço dos sobrenadantes de cultura de 24 horas ou homogenato de pulmão de 30 e 60 dias após a infecção com as cepas SV009 e SV068, nos quais foram adicionados 100µL do reagente de Greiss [composto de uma solução de 1:1 de NEED a 0,1% (Sigma, St. Louis, MO) e sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico (H_3PO_4)]. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, a densidade ótica foi avaliada em espectrofotômetro (BioTec Instruments, Inc.- μ Quant) com filtro de 540 nm. Para determinação quantitativa de NO_2^- , na mesma placa foi preparado uma curva de nitrito de sódio com concentrações entre 3,12 a 200 µM. Os dados estão apresentados em micromoles de NO_2^- .

3.18. Análise estatística

Foi utilizado o teste ANOVA e teste t para análise das diferenças entre os grupos experimentais aqui apresentados. A significância estatística foi considerada para valores de $P < 0,05$. Para análise da curva de sobrevivência utilizamos Mantel-Cox Log rank teste.

Resultados - In vitro

Diferente da cepa SV068, cepa SV009 de *Mtb* induz produção tempo dependente de TNF- α e nitrito por MAs de ratos infectados *in vitro*

Sabendo-se da importância da produção de TNF- α e óxido nítrico na TB, MAs obtidos de ratos Wistar foram infectados *in vitro* com cada cepa de *Mtb*, e após 2, 6, 12 e 24 horas de infecção, o sobrenadante foi retirado e armazenado a -20 °C para posterior quantificação. Como demonstrado na figura 1, a produção de TNF- α (A) e nitrito (B) ocorreu de modo tempo dependente após infecção com a cepa SV009, atingindo o pico máximo de produção em 24 horas. Por outro lado a cepa SV068 não foi capaz de induzir a produção destes mediadores por essas células. Nos experimentos seguintes utilizamos o tempo de 24 horas para as análises, pelo fato de ser o tempo onde elevada produção dos mediadores foi observada. Nossos dados estão de acordo com a literatura pois já foi demonstrado que na defesa do hospedeiro contra a *Mtb* é essencial a liberação de nitrito, e que a liberação deste é regulada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α ^[122].

Figura 1. Cinética da produção de TNF- α e nitrito por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço. Os mesmos foram infectados com as cepas SV009 ou SV068 na proporção de 1:1 (bacilo por célula). Após 2, 6, 12 e 24 horas as concentrações de TNF- α (A) e nitrito (B) foram quantificados no sobrenadante de cultura. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos independentes, onde * representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), e #SV009 vs. SV068 ($P < 0.05$).

Infecção in vitro com as cepas SV068 e SV009 induzem maior produção de LTB₄ e de PGE₂, respectivamente

A produção dos mediadores lipídicos foi determinada no sobrenadante de cultura dos MAs infectados por 24 horas com as cepas SV009 e SV068. Como demonstrado na figura 2A, a infecção das células com a cepa SV068 induziu aumento de 7.1 vezes mais LTB₄ em relação àquela induzida pela cepa SV009 e 15.3 vezes quando comparado com o controle. A infecção com a cepa SV009 também induziu aumento significativo de 2.1 vezes mais LTB₄ em relação ao controle. Por outro lado, a infecção com a cepa SV009, induziu aumento de 25 vezes da produção de PGE₂ em relação ao controle e 2,5 vezes em relação à infecção com a cepa SV068. A infecção com a cepa SV068 por sua vez, levou à um aumento de 3.3 vezes mais PGE₂ em relação ao controle (Figura 2B).

Figura 2. Concentração de LTB₄ e PGE₂ no sobrenadante de MAs infectados com as duas cepas de *Mtb*. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço e os mesmos foram infectados com as cepas SV009 e SV068 na proporção de 1:1 (bacilo por célula) por 24 horas. Em seguida, as concentrações de LTB₄ e PGE₂ foram quantificados no sobrenadante de cultura como descrito na seção de *Material e Métodos*, e seguindo as instruções do fabricante. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos onde * representam diferenças estatísticas entre os grupos infectados em relação ao controle ($P < 0.0001$) e # entre as cepas SV009 vs. SV068 ($P < 0.0001$).

Tratamento com MK886 inibe a produção de LTB₄ mas não de PGE₂ por MAs infectados com a cepa SV068 de Mtb, enquanto não altera a produção de ambos por células infectadas com a cepa SV009

Após observarmos que houve produção diferenciada de mediadores lipídicos induzidos pelas duas cepas, empregamos o composto MK886, inibidor da síntese de LTs, para a avaliação do efeito inibitório deste sobre a síntese dos mediadores nessas condições. Os MAs foram pré tratados com MK886 durante 30 minutos seguidos da infecção com as cepas SV009 ou SV068, e o inibidor permaneceu em cultura durante todo o período de infecção (24 horas). Nesse período os sobrenadantes foram coletados para a quantificação de LTB₄/PGE₂. Utilizamos meio suplementado contendo DMSO a 0,01% (veículo do composto MK886) como controle do tratamento farmacológico. Como demonstrado na figura 3 e observado anteriormente na figura 2A, a infecção com a cepa SV068 induziu aproximadamente 16.5 vezes mais LTB₄ em relação ao controle. Além disso, o tratamento com MK886 nas concentrações de 0,1 e 1 µM inibiu significativamente, mas não totalmente, a produção deste mediador, sendo que a diferença da produção em relação às células não infectadas foi de apenas 2 vezes. A inibição de LTs pelo tratamento com MK886 não induziu alterações significativas da síntese de LTB₄ em células infectadas com a cepa SV009. Por outro lado, a infecção dos macrófagos com a cepa SV009 induziu aumento da liberação de PGE₂ (27 vezes mais em comparação com controle (Figura 3B)) no sobrenadante destas células. Como esperado, a produção de PGE₂ (Figura 3B) por MAs infectados com ambas cepas não foi influenciada pelo tratamento com MK886.

Figura 3. Tratamento com MK886 inibe a produção de LTB₄ mas não de PGE₂ por MAs infectados com a cepa SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço, e os mesmos foram tratados com MK886 (0,1 e 1 μM) durante 30 minutos antes da infecção dos macrófagos com as cepas SV009 ou SV068 na proporção de 1:1 (bacilo por célula). Após 24 horas de infecção, foi quantificado no sobrenadante de cultura a concentração de LTB₄ (A) e de PGE₂ (B). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos, onde *representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao grupo controle ($P < 0,001$) e # representa diferenças dos grupos tratados com MK886 em relação ao veículo ($P < 0,001$).

Tratamento com ácido caféico inibe a produção de LTB₄ mas não de PGE₂ por MAs infectados com a cepa SV068 de Mtb, mas não altera a produção de ambos por células infectadas com a cepa SV009

A seguir, o potencial inibitório de LTB₄ e PGE₂ foi adicionalmente avaliado após tratamento das células com o ácido caféico, composto inibidor da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Para tanto, os macrófagos foram pré tratados com o ácido caféico nas concentrações de 10 e 100 µM durante 1 hora seguidos da infecção com as duas cepas. Como dito anteriormente, o inibidor foi mantido na cultura durante o tempo da infecção. Células controle receberam meio suplementado contendo DMSO a 0,01%. Após 24 horas, o sobrenadante de cultura foi coletado e submetido à quantificação de LTB₄ e PGE₂. Como podemos observar na figura 4A, o tratamento com 100 µM de ácido caféico inibiu significativamente a produção de LTB₄ por MAs infectados com a SV068 quando comparado ao controle, enquanto não alterou a produção induzida pela cepa SV009. Além disso, como observado anteriormente com o composto MK886 a produção de PGE₂ (Figura 4B) por MAs não foi alterada, independente da infecção com as cepas.

Figura 4. Efeito do tratamento com ácido caféico, na produção de LTB₄ e PGE₂ por MAs infectados com *Mtb*. Foram utilizados 2×10^5 MAs e os mesmos foram pré tratados com ácido caféico (10 e 100 μM) durante 1 hora antes da infecção com as cepas SV009 e SV068 na proporção de 1:1 (bacilo por célula) que permaneceu em cultura por todo o período (24 horas). Após este período, foi quantificado no sobrenadante de cultura a concentração de LTB₄ (A) e de PGE₂ (B). Como controle negativo do tratamento utilizamos meio com DMSO a 0,01% (veículo). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 8) de dois experimentos, onde * representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao grupo controle ($P < 0,0001$), # representam diferenças entre o grupo tratado com ácido caféico em relação ao veículo ($P < 0,0001$).

A síntese de nitrito e TNF- α por MAs infectados com as cepas não foi diferente após o tratamento com MK886

Com o objetivo de avaliar se o LT endógeno influencia a produção de nitrito e TNF- α , os MAs foram pré tratados durante 30 minutos com MK886 nas concentrações 0,1 e 1 μ M previamente à infecção com as cepas SV009 ou SV068. Após 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para quantificação de nitrito e TNF- α . O grupo de células controle receberam meio contendo DMSO a 0,01% como veículo. Como observado anteriormente, a infecção dos MAs com a cepa SV009 foi capaz de induzir o aumento da produção de nitrito e TNF- α (Figuras 1A e B; 5A e B). No entanto, não foram observadas alterações significativas na liberação de nitrito e TNF- α quando os LTs foram inibidos, independente da concentração (Figura 5 A e B).

Figura 5. Tratamento com MK886 não altera a produção de nitrito e de TNF- α por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs e os mesmos foram pré tratados durante 30 minutos com MK886 (0,1, 1 e 10 μM) antes da infecção dos macrófagos com as cepas SV009 ou SV068 na proporção de 1:1 (bacilo por célula). Após 24 horas de infecção, foram quantificados nitrito (A) e TNF- α (B) no sobrenadante das células. Como controle negativo do tratamento foi adicionado aos poços meio com DMSO a 0,01% (veículo). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos onde *representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao grupo controle ($P < 0.05$).

Efeito do tratamento com ácido caféico na liberação de mediadores inflamatórios por MAs infectados com as cepas de Mtb

Depois de verificar que o tratamento com MK886 não altera a produção de nitrito ou TNF- α , avaliamos se o tratamento com ácido caféico interfere na produção desses mediadores. No tratamento com 10 μ M de ácido caféico por 1 hora antes da infecção, a cepa SV009 induziu diminuição significativa na produção de TNF- α e nitrito por MAs (Figura 6). Nenhuma alteração foi observada no sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados com a SV068. De forma inesperada, o tratamento com 100 μ M de ácido caféico não modificou a liberação de nitrito ou TNF- α .

Figura 6. Efeito do tratamento com ácido caféico na produção de nitrito e TNF- α por MAs infectados com as cepas SV009 ou SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço e o tratamento com ácido caféico (10 e 100 μ M) permaneceu por 24 horas em cultura durante a infecção com as cepas SV009 e SV068 na proporção de 1:1 (bacilo/célula). Após 24 horas de infecção, foi quantificado no sobrenadante de cultura a produção de TNF- α (A) e nitrito (B). Como controle negativo do tratamento foi adicionado aos poços meio contendo DMSO a 0,01% (veículo). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos, onde *representam diferenças entre grupos infectados em relação ao grupo controle ($P < 0.05$), #representam diferenças entre grupo tratado com ácido caféico em relação ao veículo ($P < 0.05$).

Macrófagos alveolares fagocitam mais bacilos da cepa SV068 em relação à SV009, mas matam menos

As atividades fagocítica e microbicida dos macrófagos já foram descritas e constituem importantes mecanismos no controle da infecção contra diversos patógenos incluindo *Mtb*. Sendo assim, comparamos a fagocitose e atividade microbicida de MAs infectados com os bacilos das duas cepas. Utilizamos a cepa H37Rv de *Mtb* como controle, sendo considerada como 100% na representação gráfica. Como podemos observar na figura 7A, as células infectadas com a cepa SV009 fagocitaram significativamente menos bacilos quando comparado com a cepa H37Rv. No entanto, os bacilos da cepa SV068 foram aproximadamente 80% mais fagocitados pelos MAs em relação ao controle e 120% em relação à cepa SV009. A atividade microbicida foi determinada pela porcentagem de morte em relação aos bacilos fagocitados para cada cepa. Embora os MAs tenham fagocitado mais bacilos da cepa SV068, essas células foram menos eficientes (em 18%) em matar os bacilos fagocitados quando comparado com a cepa SV009 (Figura 7B). Quando comparado com a cepa H37Rv, ambos foram significativamente mais eliminados pelos MAs após 24 horas de infecção.

Figura 7. Atividades fagocítica e microbicida de MAs são diferentes após infecção com as cepas SV068 e SV009. Foram utilizados 2×10^5 MAs obtidos de ratos Wistar, e os mesmos foram infectados com 2×10^5 bacilos das cepas H37Rv, SV009 e SV068 de *Mtb*, previamente marcados com FITC. Após 2 horas a 37 °C, 5% de CO₂, a fagocitose foi determinada por fluorescência (A). Nesse período, as mesmas condições em placas separadas, os bacilos não fagocitados foram removidos por lavagem e as células lisadas plaqueadas para contagem das UFCs fagocitadas. Em placa adicional, as células contendo os bacilos fagocitados foram mantidas em cultura por 24 horas. Em seguida as mesmas foram lisadas e plaqueadas em meio 7H11. Após 30 dias, as UFC foram contadas sendo os resultados obtidos pela subtração das UFC fagocitadas e recuperadas após 24 horas. Os resultados foram expressos como média $\pm$ SEM (n = 6), gráfico representativo de três experimentos, onde * representam diferenças em relação à H37Rv ($P < 0.0001$), e # representam diferenças em relação a SV009 ($P < 0.0001$).

Efeito do tratamento de MAs com MK886 e ácido caféico na recuperação das UFCs das cepas SV009 e SV068 de *Mtb*

Para avaliar o efeito da inibição da síntese de LTs na recuperação de UFCs, MAs foram pré tratados com MK886 ou ácido caféico durante 30 e 60 minutos respectivamente, e em seguida foram infectados com as diferentes cepas de *Mtb*. Após 24 horas, a recuperação de UFCs foi determinada. Como nos experimentos anteriores, as células não infectadas foram mantidas em meio contendo DMSO a 0,01%. O tratamento das células com 1 μ M de MK886 aumentou em aproximadamente 60% e 5% o número de UFC recuperados de bacilos de bacilos das cepas SV068 e SV009 respectivamente (Figura 8 A). por outro lado, quando as células foram tratadas com ácido caféico nas concentrações de 10 e 100 μ M, a recuperação de UFCs dos bacilos da cepa SV009 foi significativamente maior que as células controle (Figura 8 B). Além disso, o tratamento com ácido caféico não alterou a recuperação de UFC da SV068 (Figura 8 B).

Figura 8. Unidades formadoras de colônias recuperadas de MAs infectados após tratamento com MK886 ou ácido caféico. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço e estes foram pré tratados com MK886 (0,1 e 1 μ M) por 30 minutos (A) ou com ácido caféico (10 e 100 μ M) por 1 hora (B). A seguir, as células foram infectadas com as cepas SV009 e SV068 na proporção de 1:1 por 24 horas. As células foram lisadas e, o sobrenadante foi plaqueado em ágar sólido 7H11 para contagem das UFCs. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM, de um experimento realizado em triplicata, onde *representam diferenças significativas em relação ao veículo ($P < 0.05$) e # representam diferenças significativas entre as cepas SV068 vs. SV009 ($P < 0.05$).

Tratamento com MK886 inibe a formação de corpúsculos lipídicos somente em MAs infectados com a cepa SV068 de Mtb

Sabendo que os CLs constituem importantes fontes de síntese dos mediadores lipídicos, a seguir avaliamos a capacidade dos dois isolados em induzir formação dos mesmos na ausência ou presença de MK886. Nosso e outros grupos de pesquisa já demonstraram que infecções com diferente patógenos e estímulos são capazes de induzir a formação dos CLs [82, 114, 123]. A infecção de MAs com cepa SV068 pelo período de 24 horas induziu maior número de CLs quando comparado com a cepa SV009 e o controle não infectado (Figura 9). O tratamento com MK886 (nas concentrações de 0,1 e 1 μ M) previamente à infecção inibiu a formação de CLs induzida pela cepa SV068, enquanto não alterou o número de CLs em resultado à infecção com a cepa SV009 (Figura 9).

Figura 9. Tratamento com MK886 diminui parcialmente a formação de CLs em macrófagos infectados com a cepa SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs por poço tratados ou não com MK886 (0,1 e 1 μ M) por 30 minutos. A seguir, as células foram infectadas com as cepas SV009 ou SV068 na proporção de 1:1. Após 24 horas de infecção, as células foram preparadas em lâminas de *citospin*, fixadas e coradas com tetraóxido de ósmio para a identificação dos CLs. A contagem dos mesmos foi realizada em microscópio de luz branca (aumento de 100x) a partir de 100 células por lâmina. Os resultados estão expressos como a média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos independentes, onde *representam diferenças entre o grupo infectado em relação ao grupo controle, #representam diferenças entre grupo controle vs. grupo tratado com MK886 e & entre as cepas SV068 vs. SV009.

Tratamento com ácido caféico induz aumento discreto da formação de CLs induzida pela cepa SV009 enquanto inibe a formação de CLs estimulada daqueles pela cepa SV068

Após verificarmos que o MK886 foi capaz de diminuir especificamente a formação de CLs por MAs infectados com a cepa SV068, avaliamos o efeito do ácido caféico na formação dos CLs induzida pelas diferentes cepas de *Mtb* após 24 horas. Os MAs infectados com a cepa SV068 e tratados com 100 μ M de ácido caféico apresentaram menor formação de CLs comparado com as células infectadas com a SV009, não sendo observadas diferenças nas demais concentrações (Figura 10). Além disso, o tratamento com ácido caféico, em nenhuma concentração estudada, alterou significativamente a formação de CLs induzida pela cepa SV009 (Figura 10).

Figura 10. Efeito do tratamento com ácido caféico na formação de CLs por MAs infectados com as cepas SV009 e SV068. Foram utilizados 2×10^5 MAs, e os mesmos foram pré tratados ou não com ácido caféico (10, 100 e 500 μM) por 1 hora. A seguir, as células foram infectadas com as cepas SV009 e SV068 na proporção de 1:1. Após 24 horas de infecção as células foram preparadas em lâminas de *cytospin*, fixadas e coradas com tetraóxido de ósmio para a identificação dos CLs. A contagem dos mesmos foi realizada em microscópio de luz branca (aumento de 100x) a partir de 100 células por lâmina. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$) de dois experimentos, onde *representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao controle ($P < 0.05$) e # entre os grupos tratados com ácido caféico em relação ao veículo ($P < 0.05$).

Resultados- In vivo

Cepa SV068 de Mtb é mais virulenta do que a SV009 em infecção experimental de camundongos balb/c

A infecção *in vitro* com as cepas SV068 e SV009 promoveram diferentes respostas em MAs, sendo que a primeira induziu o aumento de LTB_4 enquanto a segunda liberou significativamente mais PGE_2 , $TNF-\alpha$ e nitrito. A seguir, avaliamos a resposta imune do hospedeiro submetidos à infecção com as duas cepas. Para tanto, camundongos balb/c foram infectados por via i.t. com 1×10^5 bacilos das cepas SV009 ou SV068, e a sobrevivência dos mesmos foi acompanhada durante 80 dias após a infecção. Como podemos observar na figura 11 A, 100% dos camundongos infectados com a cepa SV068 morreram até o 60º dia de infecção, enquanto que aproximadamente 30% dos infectados com a cepa SV009 sobreviveram até o final do período observado. A seguir, a sobrevivência dos animais infectados foi acompanhada sob tratamento diário com MK886, com o objetivo de avaliar o papel dos LTs ao longo da infecção. Peres *et al.*^[60], demonstraram anteriormente que camundongos infectados com os bacilos da cepa H37Rv de *Mtb*, quando tratados com MK886 apresentam diminuição significativa da sobrevivência e aumento das UFC recuperadas dos pulmões. Nossos resultados mostraram que o tratamento com MK886 aumentou a sobrevida em aproximadamente 18% dos camundongos infectados com a cepa SV009 (Figura 11 B), enquanto que antecipou a morte de animais infectados com o isolado SV068 ocorreu no período de 20 e 40 dias. A partir desse período, enquanto animais infectados e sem tratamento continuaram a morrer, a inibição dos LTs pelo MK886 não alterou a sobrevida dos animais infectados (Figura 11 C). Ao final do período avaliado,

o tratamento aumentou a sobrevivência dos animais infectados com a cepa SV068 em aproximadamente 17%.

Figura 11. Curvas de sobrevivência de camundongos balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 e tratados ou não com MK886. Camundongos balb/c foram infectados *i.t.* com 1×10^5 bacilos de SV009 ou SV068. A sobrevivência dos animais foi acompanhada por até 80 dias (A). Os animais infectados com SV009 (B) ou SV068 (C) foram adicionalmente tratados diariamente com MK886 (5 mg/Kg) por gavagem e a sobrevivência foi observada por 60 dias. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM, de dois experimentos $n = 12$ para A; $n = 11$ para B e C camundongos por grupo. Em A, * representa diferenças significativas entre cepa SV068 em relação à SV009 ($P < 0.05$), em B e C, * representa diferenças significativas do grupo infectado tratado em relação ao grupo infectado não tratado ($P < 0.05$). As análises estatísticas foram feitas utilizando teste Log-rank (Mantel Cox Test).

Diferença no perfil da sobrevivência entre as cepas não foi acompanhada por diferenças na recuperação de UFCs dos pulmões e baços de camundongos balb/c infectados

Como observado na figura anterior, a infecção com a cepa SV068 induziu aumento da morte dos animais em relação à cepa SV009. Avaliamos, a seguir, se essa diferença estava ou não relacionada a um aumento da carga bacilar nos pulmões e baço. A recuperação das UFCs dos órgãos foi avaliada após 30 e 60 dias da infecção. Como mostrado na figura 12 A, não observamos diferenças no número de UFCs dos pulmões dos animais infectados com as cepas SV068 e SV009. Além disso no 30º dia de infecção, observamos diminuição (em 0,5 log₁₀) significativa no número de UFCs recuperadas do baço dos animais infectados com a cepa SV068 em relação à SV009 (Figura 12 B). No 60º dia, não foram observadas diferenças entre as cepas (Figura 12 B). No entanto, pode-se concluir que a infecção com ambas as cepas não se restringiu aos pulmões, promovendo a infecção extrapulmonar através da disseminação dos bacilos para o baço. Após 60 dias nenhuma diferença estatística foi observada.

Figura 12. Carga bacilar nos pulmões e baço de camundongos balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 de *Mtb*. Unidades formadoras de colônias recuperadas a partir do pulmão (A) e baço (B) de camundongos Balb/c infectados *i.t.* com 1×10^5 bacilos viáveis das cepas SV009 ou SV068 após 30 e 60 dias de infecção. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM ($n = 5/6$), gráfico representativo de dois experimentos, onde * representa diferenças significativas entre as cepas SV068 e SV009 ($P < 0,001$).

Cepa SV068 de Mtb provoca maior dano tecidual pulmonar em camundongos balb/c

Embora a cepa SV068 tenha diminuído mais a sobrevivência dos animais infectados, não observamos diferença com relação à carga bacilar nos pulmões. Nosso próximo passo foi avaliar se o grau de comprometimento pulmonar através de análises histopatológicas poderia ser um indicativo de morte dos animais infectados com a cepa SV068. Para isso, após infecção dos camundongos Balb/c com as cepas SV009 e SV068 após 30 e 60 dias, os pulmões foram retirados e processados para histologia, e em seguida corados por Hematoxilina Eosina (HE) (Quadro 1) para análise do infiltrado celular, Tricrômio de Gomori (TG) (Quadro 2) para análise da deposição de colágeno e Ziehl Neelsen (ZN) (Quadro 3) para análise da presença dos bacilos de *Mtb*.

No quadro 1 da Figura 13, estão representados os cortes de pulmão de camundongos inoculados *i.t.* com PBS (A) e infectados com as cepas SV009 (B) e SV068 (C) de *Mtb* corados com HE após 30, (D) SV009 e (E) SV068 após 60 dias de infecção. Enquanto observa-se parênquima preservado e sem deposição de colágeno nos animais controle (A), o tecido de pulmão de camundongos infectados com as cepas SV009 e SV068 induziram infiltrado inflamatório após 30 e 60 dias de infecção. A infecção com a cepa SV009 promoveu lesão do parênquima pulmonar com grande infiltrado leucocitário, predominante ao redor dos vasos, com tendência à formação de células gigantes e com grande número de neutrófilos (Quadro 1 B- Figura 13). Houve ainda deposição de colágeno após 30 e 60 dias de infecção como confirmado pela

coloração de TG (Quadro 2 B e D- Figura 13) e presença de bacilos demonstrado através da coloração de ZN (Quadro 3 B e D-Figura 13).

No entanto, os cortes histopatológicos obtidos de camundongos infectados com a cepa SV068, demonstraram lesões parenquimatosas mais extensas acometendo todo o tecido pulmonar. Como podemos observar, após 30 (Quadro 1 C-Figura 13) e 60 (Quadro 1 E- Figura 13) dias após a infecção, o parênquima pulmonar apresentou intenso infiltrado neutrofílico e linfocitário ao redor dos septos alveolares. Também observamos deposição de colágeno (Quadro 2 C e E-Figura 13) com maior quantidade de bacilos pelo parênquima (Quadro 3 C-Figura 13), que se multiplicaram e permaneceram no tecido até o 60º após a infecção, período final avaliado.

Quadro 1

Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos balb/c corados com Hematoxilina & Eosina. Cortes histológicos do tecido pulmonar obtidos após 30 e 60 dias da infecção com as cepas SV009 e SV068 ou controle. Em A, estão representados os parênquimas pulmonares de camundongos inoculados com PBS; em B e D os tecidos pulmonares de camundongos infectados com a cepa SV009 e SV068, respectivamente após 30 dias de infecção e em C e E, 60º dia. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio Leica DM5000B equipado com câmera digital DFC500 (Leica Microsystems) com aumento de 10X. as fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes, sendo cada um constituído por grupos contendo com n = 3 animais para o grupo PBS e n = 5 ou 6 para os grupos infectados.

Quadro 2

Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos balb/c corados com Tricrômio de Gomori. Cortes histológicos do tecido pulmonar obtidos após 30 e 60 dias da infecção com as cepas SV009 e SV068 ou controle. Em A, estão representados o parênquima pulmonar de camundongos inoculados com PBS; em B e D, os tecidos pulmonares de camundongos infectados com a cepa SV009 e SV068, respectivamente após 30 dias de infecção e em C e E no 60º dia. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio Leica DM5000B equipado com câmera digital DFC500 (Leica Microsystems) com aumento de 10X. As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes, sendo cada constituído por grupos contendo 3 animais para o grupo PBS e 5 ou 6 para os grupos infectados.

Quadro 3

Figura 13. Fotomicrografias representativas do tecido pulmonar de camundongos balb/c corados com Ziehl Nielsen. Cortes histológicos do tecido pulmonar obtidos após 30 e 60 dias da infecção com as cepas SV009 e SV068 ou controle. Em A, estão representados o parênquima pulmonar de camundongos inoculados com PBS; em B e D, os tecidos pulmonares de camundongos infectados com a cepa SV009 e SV068, respectivamente após 30 dias de infecção e em C e E no 60º dia. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio Leica DM5000B equipado com câmera digital DFC500 (Leica Microsystems) com aumento de 100X. As fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes, sendo cada constituído por grupos contendo 3 animais para o grupo PBS e 5 ou 6 para os grupos infectados.

Cinética de migração de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de camundongos balb/c infectados e tratados ou não com MK886

A seguir, avaliamos o perfil de células inflamatórias recrutadas para o espaço broncoalveolar após 30 e 60 dias da infecção animais balb/c com as cepas SV009 e SV068, e tratados ou não com MK886. No 30º dia de infecção, houve aumento do número de células totais induzidos por ambas cepas em relação ao controle não infectado. Embora a infecção com a cepa SV068 tenha aumentado discretamente o número de células totais em relação à cepa SV009, não observamos diferenças significativas entre as cepas e em relação ao tratamento com MK886 (Figura 14 A).

O número de neutrófilos recrutados para o espaço broncoalveolar aumentou significativamente após infecção com as cepas SV009 e SV068 no 30º e 60º dias, quando comparados ao grupo inoculado somente com PBS (Figura 14 B). No entanto, o número dessas células foi significativamente maior após infecção com a cepa SV068 quando comparado ao recrutamento induzido pela cepa SV009, no 30º e 60º dias após infecção (Figura 14 B). Como podemos observar na figura 14 B, o tratamento com MK886 diminuiu significativamente o número de células recrutadas somente quando induzido pela infecção com a cepa SV068, em ambos períodos avaliados.

Com relação ao número de células mononucleares, observamos que estas foram recrutadas no 30º e 60º dias em maior quantidade após a infecção com as duas cepas, quando comparado com o grupo controle. diferença significativa com relação ao recrutamento de mononucleares entre os dois isolados nos períodos avaliados (Figura 14 C). Como demonstrado na figura 14 C, o recrutamento foi significativo ao longo dos

60 dias observados, quando comparados com o grupo que recebeu apenas PBS. A infecção com as duas cepas induziu um aumento do recrutamento, mas não observamos diferenças significativas quando comparamos os grupos infectados em 30 e 60 dias, com exceção de diminuição do recrutamento de mononucleares aos 60 dias após a infecção provocado pela infecção com a cepa SV068. Além disso, o tratamento com MK886 não alterou o recrutamento de mononucleares após infecção com a cepa SV009, mas aumentou o número dessas células induzido pela cepa SV068 (Figura 14 C).

Figura 14. Cinética do recrutamento de células inflamatórias para o espaço broncoalveolar de camundongos balb/c infectados com bacilos das cepas SV009 e SV068 de *Mtb*, e tratados ou não com MK886. Camundongos Balb/c foram infectados com 1×10^5 bacilos viáveis das cepas SV009 ou SV068 de *Mtb* e o número de células recrutadas para o espaço broncoalveolar foi determinado após 30 e 60 dias de infecção. Animais controles receberam 100 μ L (i.t.) de PBS estéril. Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 6$), de um experimento, representativo de dois realizados independentemente, onde *representam diferenças significativas entre os grupos infectados em relação ao grupo PBS ($P < 0,05$), e # entre o grupo infectado não tratado e tratado com MK886 ($P < 0,05$).

Cepa SV068 de Mtb induz maior produção de nitrito do que a SV009 por células pulmonares de camundongos balb/c infectados

Sabemos que o óxido nítrico é um fator determinante e importante nos mecanismos microbicidas dos macrófagos, avaliamos a produção deste mediador por células do pulmão de camundongos infectados com duas cepas. A quantificação foi realizada através do método de Griess e comparado com animais não infectados. Como podemos observar figura 15, a infecção com as cepas SV009 e SV068 induziram produção significativa de nitrito nos pulmões 30 dias após a infecção, quando comparado com aquelas que só receberam PBS. A infecção com a cepa SV068 induziu aumento de aproximadamente 30% de nitrito aos 30 dias de infecção quando comparado com a cepa SV009. Embora não tenham diferenças significativas, no 60º dia de infecção, a quantidade de nitrito induzido pela cepa SV068 foi menor em relação àquela induzida pela cepa SV009 e ao controle.

Figura 15. Óxido nítrico produzido nos pulmões de camundongos balb/c infectados com as cepas de *Mtb*. Concentração de nitrito no homogeneizado do pulmão de animais Balb/c infectados com 1×10^5 bacilos das cepas SV009 e SV068 de *Mtb* após 30 e 60 dias da infecção. Os animais controles receberam 100 μL de PBS estéril *i.t.* Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 6$) de um experimento representativo de dois realizados independentemente, onde * representam diferenças entre os grupos infectados em relação ao grupo PBS ($P < 0.05$).

Citocinas no homogeneizado pulmonar de camundongos balb/c infectados com as duas cepas de Mtb

Com o objetivo de avaliar a resposta imune inflamatória induzida pelas duas cepas, quantificamos as citocinas IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-10, TNF- α e IFN- γ no homogeneizado dos pulmões de camundongos infectados com as cepas SV009, SV068 e controles.

A produção das citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-6 e TNF- α foi significativamente aumentada nos grupos infectados com as cepas em relação ao controle (Figuras 16 A, C e F), embora não diferente entre as cepas no período de 30 dias. No 60º dia, as concentrações das mesmas foram reduzidas e aumentadas significativamente nos animais infectados com a cepa SV009 comparado à cepa SV068, exceto para a IL-1 α . A produção de IL-12, citocina envolvida na diferenciação da resposta imune celular, aumentou significativamente no grupo infectado com a cepa SV068 quando comparado com a SV009 no 30º dia, embora sua produção não foi alterada entre as cepas após infecção no 60º dia (Figura 16 E). Com relação à citocina ativadora de macrófagos IFN- γ , não foram observadas diferenças induzidas pela infecção entre as cepas no 30º dia, embora menor concentração foi observada no grupo infectado com a SV068 (Figura 16 D). Além disso, a IL-10, citocina reguladora da ativação dos macrófagos, encontrou-se elevada significativamente no grupo infectado com a SV068 quando comparado com a SV009 no 30º dia, mas não foi alterada no 60º dia de infecção (Figura 16 B).

Figura 16. Citocinas produzidas pelas células do parênquima pulmonar de camundongos balb/c infectados ou não com as duas cepas de *Mtb*. Concentração de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF- α (C), IFN- γ (D), IL-12 (E) e IL-1 α (F) no homogeneizado do pulmão de camundongos Balb/c infectados com 1×10^5 bacilos das cepas de *Mtb* SV009 ou SV068. Os camundongos do grupo controle receberam 100 μ L de PBS estéril por via *i.t.* (cuja média de produção está representada pela linha tracejada). Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n = 5 e 6), de um experimento representativo, de 2 experimentos realizados independentemente, onde * representa diferenças significativas em relação ao grupo PBS ($P < 0.05$), # SV068 em relação à SV009 ($P < 0.05$).

Infecção com as cepas SV009 e SV068 induz produção in vivo de LTB₄ e PGE₂ por células de camundongos balb/c

Após verificar *in vitro* que as cepas SV009 e SV068 induzem produção diferencial de LTB₄ e PGE₂, avaliamos a produção destes mediadores *in vivo*.

Como podemos observar na figura 17 A, embora a produção de LTB₄ induzida pela infecção com as duas cepas SV009 e SV068 tenha sido maior quando comparada ao grupo controle nos períodos avaliados, não observamos diferenças significativas entre as duas cepas de *Mtb* após 30 e 60 dias de infecção. O mesmo pode ser observado quanto à produção de PGE₂ após a infecção com as cepas SV009 e SV068 nos mesmos períodos de infecção (Figura 17 B). Vale ressaltar que a concentração de PGE₂ produzida foi muito maior quando comparamos com a de LTB₄. Assim, comparamos a relação existente das concentrações de PGE₂ e LTB₄ entre os diferentes grupos experimentais (Figura 17 C).

Observamos que no grupo infectado com a cepa SV068 houve aumento significativo desta razão quando comparado com o grupo controle após 30 e 60 dias da infecção. Quando comparamos a produção entre as cepas não observamos alteração significativa na PGE₂/LTB₄, embora a infecção com cepa SV068 tenha aumentado a produção em relação à cepa SV009 (Figura 17 C). Após 60 dias de infecção, a razão da produção entre os mediadores no grupo infectado com a cepa SV068 foi significativa com aumento de 1.1X, quando comparado com o grupo infectado com a cepa SV009.

Figura 17. Produção de LTB₄ e PGE₂ no homogeneizado pulmonar de camundongos balb/c infectados com as cepas SV009 ou SV068 de *Mtb*.

Camundongos Balb/c foram infectados *i.t.* com 1×10^5 bacilos das cepas SV009 ou SV068, e a produção dos mediadores lipídicos LTB₄ (A) e PGE₂ (B) foi avaliada após 30 e 60 dias de infecção. Os dados foram usados para o cálculo da razão da produção de PGE₂/LTB₄ (C). Os camundongos do grupo controle receberam 100 µL de PBS estéril por via *i.t.* (cuja média de produção está representada pela linha tracejada). Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 4 e 5 em 30 dias) (n = 6 e 7 em 60 dias), de um experimento representativo, onde *representa diferenças significativas em relação ao PBS ($P < 0,05$) e # SV068 em relação à SV009 ($P < 0,05$).

Avaliação das células inflamatórias presentes no espaço broncoalveolar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as duas cepas de *Mtb*

Uma vez determinada a produção de mediadores lipídicos induzidas pelas duas cepas *in vitro* e *in vivo*, nosso próximo passo foi avaliar em camundongos 129 e nocautes da enzima 5-LO (5LO^{-/-}), o recrutamento celular após infecção com as cepas SV009 e SV068 de *Mtb*. Avaliamos a migração de células para o LBA 21 dias após a infecção, e como podemos observar na figura 18 A, houve diferença significativa dos grupos infectados quando comparamos com o grupo controle, e também entre os grupos infectados com as cepas SV009 e SV068.

O recrutamento de neutrófilos (Figura 18 B) e células mononucleares (Figura 18 C) para o LBA foi maior nos animais 129 infectados com a cepa SV009, quando comparado com os infectados com a SV068. Além disso o número de neutrófilos recrutados para o LBA nos animais 129 infectados com a SV009 foi maior do que os 5LO^{-/-} infectados com a mesma cepa. No entanto, quando comparado os animais 129 e 5LO^{-/-}, infectados com a cepa SV068, só observamos diferenças no número de células mononucleares.

Quando comparamos o recrutamento de neutrófilos e células mononucleares induzido pela SV009 e SV068 nos animais 5LO^{-/-}, observamos que a primeira induziu mais recrutamento de células para o LBA do que a SV068, mas somente a indução do recrutamento de células mononucleares foi significativa.

Figura 18. Infecção de camundongos 129 e 5LO^{-/-} com as cepas SV009 e SV068 induzem aumento do recrutamento celular para o LBA. Camundongos 129 e 5LO^{-/-} foram infectados com 1×10^5 bacilos viáveis das cepas SV009 e SV068 de *Mtb* e o número de células recrutadas para o espaço broncoalveolar foi determinado após 21 dias de infecção. Animais controles receberam 100 μ L de PBS estéril via *i.t.* Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM ($n = 8$ e 9), gráfico de um experimento representativo, de 2 realizados independentemente, onde *representa diferenças dos grupos infectados em relação ao grupo PBS ($P < 0,0001$), # SV068 em relação à SV009, \$ e grupo 129 em relação ao 5LO^{-/-}.

Avaliação do dano tecidual pulmonar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} após infecção com as cepas SV009 ou SV068 de Mtb

Após avaliação do recrutamento celular, foram feitas as análises histopatológicas dos pulmões de camundongos 129 e 5LO^{-/-} após 21 dias de infecção. Os pulmões foram retirados e processados para histologia e em seguida corados por HE para análise do infiltrado celular.

Como podemos observar na figura 19, os parênquimas pulmonares de camundongos inoculados com PBS (A e D), se apresentaram bem preservados e sem deposição de colágeno como esperado. Por outro lado, o parênquima pulmonar de camundongos 129 infectados com as cepas SV009 (B) e SV068 (C), apresentou intensa e extensa lesão do parênquima pulmonar com grande infiltrado leucocitário e neutrofílico 21 dias após a infecção. Também observamos que o parênquima do pulmão de camundongos 5LO^{-/-}, apresentou lesão com grande infiltrado leucocitário e neutrofílico, com tendência à formação de granuloma e presença de infiltrado linfocitário após 21 dias de infecção induzidos pela infecção com a cepa SV009, mas principalmente após infecção com a cepa SV068.

Figura 19. Fotomicrografias representativas do parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} corados com Hematoxilina & Eosina. Cortes histológicos do tecido pulmonar obtidos após 21 dias após a infecção com as cepas SV009 e SV068. Coloração com HE sendo: (A e D) cortes do tecido pulmonar de camundongos inoculados com PBS somente nos grupos 129 e 5LO^{-/-} respectivamente; (B e E) cortes do tecido pulmonar de camundongos infectados com a cepa SV009 nos grupos 129 e 5LO^{-/-} respectivamente, e (C e F) cortes do tecidos pulmonar de camundongos infectados com a cepa SV068 nos nos grupos 129 e 5LO^{-/-} respectivamente. As imagens foram adquiridas utilizando microscópio Leica DM5000B equipado com câmera digital DFC500 (Leica Microsystems) com aumento de 10X. as fotomicrografias são representativas de dois experimentos independentes, sendo cada um constituído de grupos contendo n = 3 animais para o grupo PBS e n = 8-10 para os grupos infectados.

Unidades formadoras de colônias recuperadas dos pulmões de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as cepas de Mtb

Em seguida, avaliamos a susceptibilidade dos camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as cepas SV009 e SV068 através da determinação das UFCs no pulmão, 21 dias após a infecção. Como podemos observar na figura 20, não houveram diferenças estatísticas entre os grupos infectados com as duas cepas nos animais 129. Por outro lado, os camundongos 5LO^{-/-} infectados com a cepa SV068, apresentaram redução significativa do número de UFCs quando comparado com o grupo infectado com a cepa SV009.

Figura 20. Carga bacilar nos pulmões de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as cepas SV009 e SV068 de *Mtb*. Camundongos 129 e 5LO^{-/-} foram infectados com 1×10^5 bacilos viáveis das cepas SV009 e SV068 de *Mtb* e após 21 dias de infecção as UFCs dos pulmões foram recuperadas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ SEM (n = 8-10), de um experimento representativo de 2 realizados independentemente, onde ** representa diferenças significativas do grupo 5LO^{-/-} infectado com a cepa SV068 em relação à cepa SV009 ($P < 0.05$), e \$ representa diferenças significativas do grupo 5LO^{-/-} em relação ao grupo 129 infectado com a cepa SV068.

Citocinas e quimiocinas no homogeneizado pulmonar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as cepas SV009 ou SV068 de Mtb

Quantificamos IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IFN- γ no homogeneizado dos pulmões de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as cepas SV009 e SV068. Como podemos observar na figura 21 A, houve aumento significativo de IL-6 induzido pela infecção com as cepas SV009 e SV068 após 21 dias de infecção quando comparado ao grupo que recebeu apenas PBS. Observamos também que a infecção com a cepa SV068 foi menos eficiente em induzir esta citocina tanto pelas células dos animais 129 quanto dos 5LO^{-/-} quando comparado com a SV009.

Após a infecção com a cepa SV068, observamos menor produção de IL-10 após 21 dias, quando comparada com a produção induzida pela infecção com a cepa SV009, somente nos animais 129. Não foram observadas diferenças na produção de IL-10 pelas células dos animais 5LO^{-/-} infectados ou do grupo controle (Figura 21 B).

Quanto à produção de TNF- α e INF- γ pelas células do pulmão dos camundongos 129 e 5LO^{-/-}, observamos que 21 dias após a infecção com as duas cepas houveram diferenças significativas em relação ao grupo que recebeu PBS, e entre as linhagens de camundongos. De modo semelhante, células dos animais 129 e 5LO^{-/-} infectados com a SV068 produziram menos TNF- α e INF- γ do que aqueles infectados com a cepa SV009 (Figura 21 C e D). Em relação à IL-1 β , só houve diferença de produção, pelas células dos animais 5LO^{-/-} infectados com a SV068 (Figura 21 E).

A figura 22 ilustra a produção de quimiocinas também por células do pulmão, após infecção dos animais 129 e 5LO^{-/-} com as duas cepas de *Mtb*. Podemos observar que a produção de KC e MCP-1 foi menor por células de ambos os grupos de animais infectados com a cepa SV068, quando comparada com aqueles infectados com a SV009. Não houve diferença significativa entre o grupo que recebeu somente PBS e o infectado com a cepa SV009 (Figura 22 A e B).

Figura 21. Concentração de citocinas no parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as duas cepas de *Mtb*. Concentração de IL-6 (A), IL-10 (B), TNF-α (C), IFN-γ (D), IL-1 β (E) no homogeneizado do pulmão de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com 1×10^5 bacilos das cepas de *Mtb* SV009 e SV068. Os camundongos do grupo controle receberam 100 µL de PBS estéril por via *i.t.* Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=8-10), de 1 experimento, onde *representam diferenças significativas dos grupos infectados em relação ao grupo PBS ($P < 0,05$), #e SV068 em relação à SV009 ($P < 0,05$).

Figura 22. Concentração de quimiocinas no parênquima pulmonar de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com as duas cepas de *Mtb*. Concentração de KC (A) e MCP-1 (B) no homogeneizado do pulmão de camundongos 129 e 5LO^{-/-} infectados com 1×10^5 bacilos das cepas de *Mtb* SV009 e SV068. Os camundongos do grupo controle receberam 100 μ L de PBS estéril por via *i.t.* Os resultados são expressos como média $\pm$ SEM (n=8-10), de 1 experimento, onde *representa diferenças significativas dos grupos infectados em relação ao grupo PBS ($P < 0,05$), #e SV068 em relação à SV009 ($P < 0,05$).

Discussão

Os eventos da resposta imune inata e adaptativa que ocorrem após infecção pulmonar pelo *Mtb*, ainda não são totalmente conhecidos, especialmente no que se refere aos mecanismos de escape e aos fatores de virulência do *Mtb*. Com intuito de entender melhor a relação entre diferentes cepas de *Mtb* e o hospedeiro nesta infecção, nós utilizamos no presente trabalho, duas cepas isoladas de humanos com TB ativa caracterizadas por desenvolver a doença do tipo não cavitária (SV009) e a extrapulmonar (SV068). Esse modelo nos permitiu estudar os mecanismos imunes e inflamatórios que possam ser responsáveis pela imunopatologia da TB. Sabendo que, o controle da infecção da TB na população depende do melhor entendimento dos mecanismos desencadeados pelas respostas dos bacilos e do hospedeiro, esperamos que o presente trabalho possa contribuir nesta área.

Os dados foram obtidos a partir de experimentos *in vitro* e *in vivo*. Para os experimentos *in vitro*, utilizamos MAs, que são umas das principais e primeiras células residentes no pulmão a entrarem em contato com diversos agentes infectantes incluindo o *Mtb*.

Sabendo que TNF- α e nitrito são importantes para a defesa do hospedeiro contra o *Mtb* quantificamos a produção desses mediadores *in vitro* e mostramos que a cepa SV009 induziu maior produção de TNF- α e nitrito do que a SV068 após 24 horas de infecção. Além disso, a cepa SV009 estimulou maior produção de PGE₂, porém menor de LTB₄ ao contrário do observado com a cepa SV068.

Para entender melhor o efeito biológico envolvido na produção diferencial dos mediadores, avaliamos as atividades fagocítica e microbicida das diferentes cepas, os quais constituem importantes mecanismos efetores da resposta imune inata. Sabe-se que a infecção se inicia com a fagocitose dos bacilos por MAs e por células dendríticas, e que este fenômeno é dependente do reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) presentes nas células do sistema imune. Assim, tem sido sugerido que dependendo de como o patógeno é reconhecido, a ativação dos macrófagos pode ocorrer de diferentes maneiras ^[124]. Assim, nossa hipótese foi a de que as cepas pudessem apresentar capacidades diferenciais em serem fagocitadas ou mortas *in vitro*. Nossos dados, mostraram que *in vitro*, a bactéria SV068 embora mais fagocitada pelos macrófagos, sobrevive mais no interior destas células, como mostrado na figura 7. O aumento da fagocitose dos bacilos da cepa SV068 por MAs quando comparado com a SV009, pode ser explicado pela maior liberação de LTB₄. Dados da literatura ^[63, 103] e do nosso laboratório ^[117, 121] já demonstraram que LTs aumentam a fagocitose de patógenos. No entanto, apesar da cepa SV068 ter induzido menos PGE₂, os MAs foram menos eficientes em matar a mesma. Resultados da literatura mostram que PGE₂, via seu receptor EP2 inibe a morte de patógenos. O tipo de morte celular induzida pela infecção com *Mtb* pode ser regulada simultaneamente PGE₂ e LXA₄ (lipoxina A₄), e esta regulação determina o resultado da infecção. Cepas virulentas de *Mtb* evadem os mecanismos de defesa através da indução da produção de LXA₄ e inibição de PGE₂, levando à necrose e inibição da apoptose dos macrófagos, resultando em propagação dos bacilos ^[125-127]. Desta maneira, frente a estes dados aparentemente contraditórios,

podemos sugerir que os MAs foram ineficientes em matar as bactérias, talvez devido ao excesso de bactérias fagocitadas (pelo aumento de LTB₄), ou por estas células estarem morrendo mais por necrose, e permitindo assim a sobrevivência de maior número de bacilos. Esta última hipótese é suportada por dados ainda não publicados do nosso laboratório que demonstraram que bactérias que expressam todos os genes da PLC, induzem menor produção de PGE₂ e sobrevivem mais no interior de macrófagos do que *Mtb* sem os genes da PLC, e que induzem mais deste mediador e morrem mais ^[114, 128]. Experimentos adicionais deverão ser feitos para avaliar estas hipóteses.

Além disso, o fato das cepas terem induzido produção diferente dos mediadores TNF- α e óxido nítrico sugere que os dois isolados de *Mtb* possuem em sua superfície diferentes moléculas que interagem com diferentes PRRS, e assim estimulam de forma diversa a cascata de sinalização celular e produção de mediadores por macrófagos. Em projeto futuro, pretendemos identificar os possíveis PAMPs dos isolados SV068 e SV009, através de análise proteômica dos extratos obtidos a partir da membrana celular dos mesmos.

Sabendo que os LTs contribuem para os mecanismos efetores da resposta imune ^[47, 53, 54, 60, 63, 101, 117, 121], nosso próximo passo foi investigar o impacto da inibição de LTs pelo composto MK886, na recuperação de UFC. Como esperado, observamos que o tratamento com MK886, de macrófagos infectados com a SV068 reduziu a liberação de LTB₄, mas não a de TNF- α , nitrito ou PGE₂ (Figuras 3 e 5), e resultou em recuperação de maior número de UFC. Por outro lado, o tratamento com o composto

MK886, resultou em discreto aumento na recuperação das UFC da cepa SV009, e modificou a produção de LTB₄ somente na maior concentração utilizada, sem alterar a produção de PGE₂. Por outro lado, o tratamento dos macrófagos com ácido caféico, inibiu a produção de TNF- α e nitrito, somente por macrófagos infectados com a SV009, resultando em aumento da recuperação de UFC desta bactéria, sem alterar o número de UFC da SV068. Estes dados estão parcialmente de acordo com outros, como por Kyung-Min Shin *et al*, que demonstraram que um derivado metilado do ácido caféico (inibidor da síntese de LTs) é efetivo inibidor de óxido nítrico, PGE₂ e TNF- α ^[129]. Em conjunto, nossos dados *in vitro*, sugerem que diferentes mecanismos efetores dos macrófagos são ativados pelos isolados SV009 e SV068, sendo um dependente de mediadores lipídicos ^[114, 127] e outro de TNF- α e nitrito ^[130, 131]. A ativação diferencial dos macrófagos pode estar relacionada com interação de diferentes PAMPS dos dois isolados de *Mtb*, com os PRRs de macrófagos ^[132-134]. Estes resultados inéditos poderão esclarecer diferenças descritas na literatura relacionadas com o papel de TNF- α e mediadores lipídicos na tuberculose.

Trabalhos da literatura já demonstraram uma relação entre a produção inicial de eicosanóides derivados da 5-LO, COX-1 e 2 e a formação CLs *in vitro* ^[80, 135-140]. Estas são estruturas intracelulares ricas em lipídios não associadas à membrana, cuja indução é específica, dependente do estímulo, ^[77, 80] do tipo celular ^[79] e do receptor ^[77, 80, 94]. Nossos dados mostram diferenças na formação de CLs após infecção pelos dois isolados, sendo a SV068 mais eficiente que a SV009, sugerindo novamente diferenças no reconhecimento destas bactérias pelos macrófagos. Como a bactéria SV068 foi

maior indutora da produção de LTB₄, podemos sugerir que os CLs formados por MAs infectados com esta cepa são fontes preferenciais de LTs, fato que parece não ocorrer com MAs infectados com os bacilos da cepa SV009. Esta hipótese parece ser verdadeira, uma vez que o composto MK886 inibiu a formação de CLs somente em macrófagos infectados com a SV068, e o ácido caféico inibiu somente a formação de CLs em resposta a SV009. A inibição diferencial da formação de CLs também já foi demonstrada anteriormente por Bozza e colaboradores [76, 77, 94].

Baseado nos dados *in vitro*, e principalmente no fato de que a infecção com as duas cepas de *Mtb* levam à produção diferencial de LTB₄, de PGE₂, nitrito e TNF- α , iniciamos os estudos *in vivo* para determinar se distintos mecanismos efetores também são ativados *in vivo*, em respostas à infecção com os isolados SV009 e SV068. Primeiramente, empregando camundongos Balb/c, suscetíveis à infecção por *Mtb*, determinamos a curva de sobrevivência dos animais infectados com as cepas SV009 ou SV068. Como observado, a cepa SV068 induz a morte de mais camundongos quando comparada à cepa SV009. No entanto, a maior mortalidade parece não estar associada à maior recuperação de UFCs nos pulmões e nem no baço. Nossos dados são distintos a outros da literatura, que demonstraram que diferenças na virulência entre diversas cepas de *Mtb*, como as cepas H37Rv, Canetti, Beijing-1, Beijing-2,3, Africa-2 e Somalia-2, estão relacionadas com maior ou menor carga bacilar nos pulmões [141]. As H37Rv, Canetti e Beijing-1 induzem recuperação de menor número de UFC e foram consideradas menos virulentas que a Beijing 2,3 e a Somalia-2 [141]. Peres *et al* também demonstraram que o número de UFCs recuperado dos pulmões de

animais infectados com a cepa que contém todos os genes da fosfolipase C, foi maior e matou mais quando comparado com a cepa sem tais genes, mostrando uma relação entre os dois fatores ^[114]. No entanto, a SV068 induziu grande comprometimento do parênquima pulmonar com aumento do infiltrado inflamatório crônico e deposição de colágeno, diminuindo consideravelmente a extensão de alvéolos. Assim, o aumento da mortalidade dos animais infectados com a SV068, pode ter sido uma consequência de comprometimento do parênquima pulmonar como resultado da estimulação exacerbada da resposta imune inflamatória, e à não diminuição da replicação dos bacilos propriamente dita. As análises histopatológicas dos pulmões dos animais infectados com a SV068 demonstraram não apenas intenso recrutamento de células inflamatórias, mas também perda da arquitetura característica do parênquima pulmonar, e em alguns casos formação de fibrose, especialmente 60 dias após a infecção. Intensa reação inflamatória também foi encontrada no espaço broncoalveolar dos animais infectados com a SV068, que apresentaram 4.7 e 2.1 vezes mais neutrófilos, aos 30 e 60 dias após a infecção respectivamente, do que os animais infectados com a SV009 (Figura 14). Embora, o papel dos neutrófilos não tenha sido investigado, dados da literatura demonstram que estas células são importantes para o recrutamento dos fagócitos mononucleares que têm papel ativo na formação do granuloma e eliminação das micobactérias, sendo recrutados ao sítio de infecção persistentemente ^[47, 142]. Appelberg et al. ^[143] também observaram que os neutrófilos são recrutados por um longo período de tempo na infecção por *Mycobacterium avium*, tendo dois picos de recrutamento, sendo um no primeiro e outro no 15º dia após a infecção, e que o infiltrado é persistente durante a fase crônica da infecção. Artigos

recentes sugerem que os neutrófilos são “células de assinatura” na TB, pois foram estudadas vias de sinalização ao longo da infecção que mostraram que o recrutamento dos neutrófilos pode ser induzido por excesso dessa sinalização por interferons do tipo I (IFN tipo I) como demonstrado em humanos com TB ativa ^[144]. Além disso também tem sido demonstrado que IFN- γ ^[144] e IL-17 ^[145] podem contribuir para o aumento do recrutamento de neutrófilos durante a infecção por *Mtb*. Quanto às células mononucleares, aos 30 dias de infecção, não observamos diferenças expressivas entre os animais infectados com os dois isolados, mas aos 60 dias pequena redução foi observada naqueles animais infectados com a SV068, quando comparado com aqueles infectados com a SV009. A importância das células mononucleares já esta bem estabelecida na TB, pois sabe-se que estas células são essenciais para a formação do granuloma e contenção do *Mtb* ^[60]. Todas estas alterações relacionados a intensidade da resposta inflamatória justificariam o aumento da mortalidade dos animais infectados com a SV068, pois estariam dificultando a troca gasosa e o aporte de nutrientes, de modo semelhante ao que ocorrem em humanos que manifestam a TB, e apresentam extensa lesão pulmonar ^[14, 146].

Tendo como base os resultados *in vitro*, que mostraram que animais infectados com a SV068 produzem mais LTs, nosso próximo passo foi avaliar o impacto do tratamento dos animais infectados, com o composto MK886, sobre a sobrevida e inflamação pulmonar. Surpreendentemente, observamos que animais infectados com os dois isolados de *Mtb* e tratados com MK886 apresentam curva de sobrevivência semelhante a dos animais infectados e não tratados. Por outro lado, o tratamento dos

animais com MK886 reduziu o recrutamento de neutrófilos, mas aumentou o número de células mononucleares (Figura 14). Estes resultados diferem de outros publicados por nós que mostraram que camundongos infectados com a *Mtb* H37Rv e tratados com MK886, morrem mais do que animais somente infectados, mas que não modificam o número de neutrófilos no lavado broncoalveolar 30 e 60 dias após infecção [60]. Podemos sugerir que estas variações devem estar relacionadas à cepa de *Mtb* H37Rv, de modo semelhante ao que observamos com os isolados SV009 e SV068. Outros experimentos deverão ser feitos na tentativa de esclarecer estes questionamentos.

Posteriormente, avaliamos se os isolados SV009 e SV068 também induzem produção diferencial de citocinas e mediadores lipídicos por células dos pulmões. Como mostra a figura 16, o isolado SV068 induziu maior produção de IL-12 e IL10, aos 30 dias de infecção, além de maior concentração das citocinas inflamatórias, IL-6, TNF- α após 60 dias, mas menor liberação de IFN- γ neste período. A maior produção de TNF- α por animais infectados com o bacilo SV068, não foi semelhante aos dados observados *in vitro* (Figura 1). A produção de TNF- α juntamente com a IL-6, pode estar contribuindo para a maior intensidade da reação inflamatória nos pulmões dos animais infectados com a SV068.

Quanto aos mediadores lipídicos, não observamos diferença na produção de LTB₄, e contrário ao determinado *in vitro*, aos 30 dias, os animais infectados com a SV068, produziram mais PGE₂. Até o momento, não temos uma explicação para estas diferenças, mas podemos sugerir que isto ocorre devido a presença de outras células do sistema imune nos pulmões, e não somente macrófagos (como *in vitro*), como

contribuintes da síntese dos diferentes mediadores. Além disso, sabe-se que em períodos mais tardios dos processos inflamatórios e infecciosos, há maior produção de prostanóides, e que estes contribuem para o controle da resposta. Como estes dados são resultados de apenas um experimento, outros animais serão infectados para confirmar esses resultados.

Importante salientar que como esperado, ambos os isolados induziram nos pulmões, aumento significativo das citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-1 α , quando comparado com animais não infectados. O papel relevante destas citocinas na tuberculose já está bem descrito na literatura ^[22, 147, 148]. Sabe-se que a IL-12 e o IFN- γ são citocinas essenciais na resposta Th1 protetora ^[149], e que ao contrário, a IL-10 inibe diretamente a ativação dos macrófagos, modulando negativamente a intensidade da resposta imune celular ^[150]. Nossos resultados demonstraram que a SV068 induziu maior produção de IL-12 e IL-10, 30 dias após a infecção, mas menor liberação de IFN- γ . No entanto, as variações na produção destas citocinas, podem ter um caráter compensatório, e parecem não ser tão impactantes para os animais, uma vez que não observamos diferenças na carga bacteriana dos animais infectados com as duas cepas de *Mtb*.

Sabendo que as cepas SV009 e SV068 induzem diferencialmente a produção de LTs, nosso próximo passo foi investigar em animais deficientes da produção destes lipídios, a resposta pulmonar a estas bactérias, comparando com camundongos não deficientes. Inicialmente determinamos o recrutamento celular para o espaço broncoalveolar destes animais e observamos que nas duas linhagens de camundongos

ocorre recrutamento significativo de leucócitos, embora nos animais 5LO^{-/-} tenha sido sempre em menor número do que nos 129, especialmente as células mononucleares. Além disso, de forma inesperada, a bactéria SV068 nas duas linhagens de camundongos, foi menos inflamatória que a SV009, contrário ao observado nos animais balb/c. Menor inflamação pulmonar também foi observada no parênquima pulmonar dos animais 5LO^{-/-}, como mostram os cortes histológicos dos pulmões (Figura 19). Estes dados sugerem que nestes animais os LTs são pelo menos parcialmente, responsáveis pelo recrutamento de leucócitos para os pulmões, em resposta a estes dois isolados de *Mtb*. A menor intensidade da resposta inflamatória nos animais 5LO^{-/-} e 129, em resposta a bactéria SV068, pode também ser explicada pela menor indução das citocinas inflamatórias, IL-6, TNF- α e IFN- γ , e das quimiocinas KC e MCP1, nos pulmões (Figuras 21 e 22). Outra diferença fundamental observada nos animais 5LO^{-/-} quando comparado com os 129 (e também com os balb/c), foi a recuperação de menor UFC daqueles animais infectados com a bactéria SV068. Porém, não observamos diferença entre os camundongos 129 e 5LO^{-/-}, em relação ao número de bacilos recuperados da bactéria SV009, que é aquela que induz maior produção de TNF- α 21 dias após infecção (Figura 21 C), e também em macrófagos isolados *in vitro* (Figura 1). Assim, podemos sugerir que o TNF- α é o mediador fundamental para os mecanismos efetores da resposta imune, na infecção por bacilos da cepa SV009. Dados da literatura, relatam que o TNF- α é um fator determinante na proteção contra infecção por *Mtb* e diversos estudos tem demonstrado seu papel essencial para o controle da infecção [16, 149]. Neste contexto, foi demonstrado que camundongos nocautes de TNF- α

são mais suscetíveis à infecção por *Mtb* [151, 152]. No entanto, de modo surpreendente, animais 5LO^{-/-} foram mais eficientes em eliminar os bacilos SV068 (que induz maior produção de leucotrienos *in vitro*, figura 2), semelhante ao descrito por Báfica e col [153] e por nós observado (Frantz *et al*) [154], após infecção de animais Balb/c com a cepa H37Rv. Estes dados são intrigantes e ainda de difícil interpretação, frente aos resultados até agora obtidos. Outros experimentos deverão ser realizados para elucidar esta questão.

Como demonstrado em outros trabalhos da literatura e por nosso grupo de pesquisa, os mediadores lipídicos participam da resposta imune contribuindo para a resistência ou suscetibilidade à TB [47, 60, 126, 127, 153, 155]. Os resultados obtidos até o presente, após infecção com as cepas SV009 e SV068, ainda não permitiram uma conclusão definitiva para explicar diferenças observadas. No entanto, nossos dados confirmam que o TNF- α é uma citocina essencial na resposta imune na TB, mas que sua indução é dependente do bacilo de *Mtb*. Por outro lado, nossos dados confirmam que os mediadores lipídicos também participam e regulam os mecanismos efetores na tuberculose, mas outros experimentos são necessários para melhor compreendê-los.

Conclusão

Podemos concluir que os isolados SV068 e SV009 possuem diferenças na virulência, e que as mesmas dependem de um conjunto de fatores do hospedeiro. Estes fatores, incluem desde o “background” genético dos animais e das bactérias, como possivelmente a expressão diferencial de PAMPs na membrana celular das bactérias. Nossos dados também sugerem que diferentes mecanismos participam da resposta imune na TB, sendo um dependente de TNF- α e outro de mediadores lipídicos.

*Referências Bibliográficas**

* Estilo numérico de acordo com o estilo Vancouver publicados nas diretrizes para apresentação de Dissertações e Teses-USP 2013.

1. Koch, R., *Die Ätiologie der Tuberkulose*. Berliner Klinischen Wochenschrift., ed. Traduzido e editado por THOMAS D. BROCK. ASM Press. Vol. 15. 1882. 10.
2. WHO, *Global tuberculosis control : surveillance, planning, financing*, in *WHO report 2008.*, W. Press, Editor. 2008, World Health Organization, Geneva, Switzerland. p. 304.
3. Mandavilli, A., *A clash of cultures*. Nat Med, 2007. **13**(3): p. 268-70.
4. WHO, *Global Tuberculosis Report*. WHO, 2012: p. 100.
5. Bloom, B.R. and C.J. Murray, *Tuberculosis: commentary on a reemergent killer*. Science, 1992. **257**(5073): p. 1055-64.
6. Meacci, F., et al., *Drug resistance evolution of a Mycobacterium tuberculosis strain from a noncompliant patient*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3114-20.
7. Kaufmann, S.H., *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 20-30.
8. Pieters, J., *Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages*. Microbes Infect, 2001. **3**(3): p. 249-55.
9. Schnappinger, D., G.K. Schoolnik, and S. Ehrt, *Expression profiling of host pathogen interactions: how Mycobacterium tuberculosis and the macrophage adapt to one another*. Microbes Infect, 2006. **8**(4): p. 1132-40.
10. Fuller, C.L., J.L. Flynn, and T.A. Reinhart, *In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 2003. **71**(12): p. 7023-34.
11. Majlessi, L., et al., *Inhibition of phagosome maturation by mycobacteria does not interfere with presentation of mycobacterial antigens by MHC molecules*. J Immunol, 2007. **179**(3): p. 1825-33.
12. Silva, C.L. and L.H. Faccioli, *Tumor necrosis factor (cachectin) mediates induction of cachexia by cord factor from mycobacteria*. Infect Immun, 1988. **56**(12): p. 3067-71.
13. Silva, C.L., L.H. Faccioli, and G.M. Rocha, *The role of cachectin/TNF in the pathogenesis of tuberculosis*. Braz J Med Biol Res, 1988. **21**(3): p. 489-92.
14. O'Garra, A., et al., *The immune response in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 475-527.
15. Rook, G.A., et al., *IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design*. Trends Immunol, 2004. **25**(9): p. 483-8.
16. Flynn, J.L. and J. Chan, *Immunology of tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 93-129.
17. Chan, J., et al., *Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995. **63**(2): p. 736-40.
18. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
19. Flynn, J.L., et al., *Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis*. J Immunol, 1998. **160**(4): p. 1796-803.
20. Trinchieri, G., *Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(2): p. 133-46.
21. Ulrichs, T. and S.H. Kaufmann, *New insights into the function of granulomas in human tuberculosis*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 261-9.
22. Cooper, A.M., et al., *Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis*. J Exp Med, 1997. **186**(1): p. 39-45.
23. Holscher, C., et al., *A protective and agonistic function of IL-12p40 in mycobacterial infection*. J Immunol, 2001. **167**(12): p. 6957-66.
24. Lalvani, A., et al., *Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(1): p. 270-5.
25. Orme, I.M., et al., *Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Immunol, 1993. **151**(1): p. 518-25.
26. Ottenhoff, T.H., D. Kumararatne, and J.L. Casanova, *Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria*. Immunol Today, 1998. **19**(11): p. 491-4.
27. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.
28. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.

29. Suttorp, N., et al., *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin stimulates prostacyclin production in cultured pulmonary artery endothelial cells: membrane attack and calcium influx. *J Cell Physiol*, 1985. **123**(1): p. 64-72.
30. Rouzer, C.A., et al., *Secretion of leukotriene C and other arachidonic acid metabolites by macrophages challenged with immunoglobulin E immune complexes*. *J Exp Med*, 1982. **156**(4): p. 1077-86.
31. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
32. Peters-Golden, M., *Cell biology of the 5-lipoxygenase pathway*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. **157**(6 Pt 1): p. S227-32.
33. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998. **38**: p. 97-120.
34. Otto, J.C. and W.L. Smith, *Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2*. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995. **12**(2-3): p. 139-56.
35. Herschman, H.R., *Prostaglandin synthase 2*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1299**(1): p. 125-40.
36. Weinlich, R., et al., *TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(12): p. 1901-9.
37. D'Avila, H., et al., *Neutrophils recruited to the site of Mycobacterium bovis BCG infection undergo apoptosis and modulate lipid body biogenesis and prostaglandin E production by macrophages*. *Cell Microbiol*, 2008. **10**(12): p. 2589-604.
38. Snijdwint, F.G., et al., *Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes*. *J Immunol*, 1993. **150**(12): p. 5321-9.
39. Borger, P., et al., *Prostaglandin E2 differentially modulates IL-5 gene expression in activated human T lymphocytes depending on the costimulatory signal*. *J Allergy Clin Immunol*, 1998. **101**(2 Pt 1): p. 231-40.
40. Kunkel, S.L., S.W. Chensue, and S.H. Phan, *Prostaglandins as endogenous mediators of interleukin 1 production*. *J Immunol*, 1986. **136**(1): p. 186-92.
41. Aronoff, D.M., C. Canetti, and M. Peters-Golden, *Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP*. *J Immunol*, 2004. **173**(1): p. 559-65.
42. Nicolette, R., et al., *Prostaglandin E(2)-loaded microspheres as strategy to inhibit phagocytosis and modulate inflammatory mediators release*. *Eur J Pharm Biopharm*, 2008. **70**(3): p. 784-90.
43. Goto, T., et al., *Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity*. *J Immunol*, 1983. **130**(3): p. 1350-5.
44. Serezani, C.H., et al., *Prostaglandin E2 suppresses bacterial killing in alveolar macrophages by inhibiting NADPH oxidase*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007. **37**(5): p. 562-70.
45. Edwards, C.K., 3rd, et al., *Chronic infection due to Mycobacterium intracellulare in mice: association with macrophage release of prostaglandin E2 and reversal by injection of indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon-gamma*. *J Immunol*, 1986. **136**(5): p. 1820-7.
46. Rangel Moreno, J., et al., *The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis*. *Immunology*, 2002. **106**(2): p. 257-66.
47. Peres-Buzalaf, C., et al., *Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2011. **85**(2): p. 75-81.
48. Shak, S., H.D. Perez, and I.M. Goldstein, *A novel dioxygenation product of arachidonic acid possesses potent chemotactic activity for human polymorphonuclear leukocytes*. *J Biol Chem*, 1983. **258**(24): p. 14948-53.
49. Lee, T.H. and J. Arm, *Leukotrienes*. *Allergy Proc*, 1991. **12**(3): p. 139-42.
50. FACCIOLI, L.H., NOURSHARGH, S.; MOQBEL, R.; WILLIAMS, F.M.; SEHMI, R.; KAY, A.B.; WILLIAMS, T.J, *The accumulation of eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo*. *Immunology*, 1991. **73**: p. 222-227.
51. Medeiros, A.I., et al., *Leukotrienes are involved in leukocyte recruitment induced by live Histoplasma capsulatum or by the beta-glucan present in their cell wall*. *Br J Pharmacol*, 1999. **128**(7): p. 1529-37.
52. Goodarzi, K., et al., *Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(10): p. 965-73.

53. Medeiros, A.I., et al., *Leukotrienes are potent adjuvant during fungal infection: effects on memory T cells*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8544-51.
54. Medeiros, A.I., et al., *Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis*. Infect Immun, 2004. **72**(3): p. 1637-44.
55. Samuelsson, B., *Leukotrienes: a new class of mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation*. Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res, 1983. **11**: p. 1-13.
56. Lewis, R.A. and K.F. Austen, *The biologically active leukotrienes. Biosynthesis, metabolism, receptors, functions, and pharmacology*. J Clin Invest, 1984. **73**(4): p. 889-97.
57. Wirth, J.J. and F. Kierszenbaum, *Effects of leukotriene C4 on macrophage association with and intracellular fate of Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol, 1985. **15**(1): p. 1-10.
58. Wirth, J.J. and F. Kierszenbaum, *Stimulatory effects of leukotriene B4 on macrophage association with and intracellular destruction of Trypanosoma cruzi*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1989-93.
59. Demitsu, T., et al., *Enhanced bactericidal activity of macrophages by exogenous leukotriene B4*. Dermatologica, 1989. **179 Suppl 1**: p. 129-30.
60. Peres, C.M., et al., *Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, 2007. **9**(4): p. 483-9.
61. Bailie, M.B., et al., *Leukotriene-deficient mice manifest enhanced lethality from Klebsiella pneumonia in association with decreased alveolar macrophage phagocytic and bactericidal activities*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5221-4.
62. Peters-Golden, M., et al., *Leukotrienes: underappreciated mediators of innate immune responses*. J Immunol, 2005. **174**(2): p. 589-94.
63. Mancuso, P., et al., *5-Lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1998. **66**(11): p. 5140-6.
64. Chen, L., et al., *Single intranasal mucosal Mycobacterium bovis BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis*. Infect Immun, 2004. **72**(1): p. 238-46.
65. Coffey, M.J., et al., *5-Lipoxygenase metabolism in alveolar macrophages from subjects infected with the human immunodeficiency virus*. J Immunol, 1996. **157**(1): p. 393-9.
66. Krarup, E., et al., *Interleukin-8 and leukotriene B4 in bronchoalveolar lavage fluid from HIV-infected patients with bacterial pneumonia*. Respir Med, 1997. **91**(5): p. 317-21.
67. Coffey, M.J., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor administration to HIV-infected subjects augments reduced leukotriene synthesis and anticryptococcal activity in neutrophils*. J Clin Invest, 1998. **102**(4): p. 663-70.
68. Machado, E.R., et al., *Leukotrienes play a role in the control of parasite burden in murine strongyloidiasis*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3892-9.
69. Serezani, C.H., et al., *Leukotrienes are essential for the control of Leishmania amazonensis infection and contribute to strain variation in susceptibility*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3201-8.
70. Peres, C.M., et al., *Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, 2007.
71. Hegg, E.L. and L. Que, Jr., *The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes*. Eur J Biochem, 1997. **250**(3): p. 625-9.
72. Ford-Hutchinson, A.W., M. Gresser, and R.N. Young, *5-Lipoxygenase*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: p. 383-417.
73. McMillan, R.M. and E.R. Walker, *Designing therapeutically effective 5-lipoxygenase inhibitors*. Trends Pharmacol Sci, 1992. **13**(8): p. 323-30.
74. Campos, F.M., J.A. Couto, and T.A. Hogg, *Influence of phenolic acids on growth and inactivation of Oenococcus oeni and Lactobacillus hilgardii*. J Appl Microbiol, 2003. **94**(2): p. 167-74.
75. Triggiani M, O.A., Seeds MC, Bass DA, Marone G, Chilton FH *Migration of human inflammatory cells into the lung results in the remodeling of arachidonic acid into a triglyceride pool*. J Exp Med 1995.
76. Bozza, P.T., et al., *Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1515-25.
77. Bozza, P.T., et al., *Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects*. J Leukoc Biol, 1998. **64**(4): p. 563-9.

78. Bandeira-Melo, C., M. Phoofolo, and P.F. Weller, *Extranuclear lipid bodies, elicited by CCR3-mediated signaling pathways, are the sites of chemokine-enhanced leukotriene C4 production in eosinophils and basophils*. J Biol Chem, 2001. **276**(25): p. 22779-87.
79. Pacheco, P., et al., *Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular Loci involved in eicosanoid metabolism*. J Immunol, 2002. **169**(11): p. 6498-506.
80. Bozza, P.T., et al., *Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation: cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11091-6.
81. Bozza, P.T., W. Yu, and P.F. Weller, *Mechanisms of formation and function of eosinophil lipid bodies: inducible intracellular sites involved in arachidonic acid metabolism*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1997. **92 Suppl 2**: p. 135-40.
82. Sorgi, C.A., et al., *Histoplasma capsulatum cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection*. J Immunol, 2009. **182**(7): p. 4025-35.
83. Coimbra, A. and A. Lopes-Vaz, *The presence of lipid droplets and the absence of stable sudanophilia in osmium-fixed human leukocytes*. J Histochem Cytochem, 1971. **19**(9): p. 551-7.
84. Weinstein, J., *Synovial fluid leukocytosis associated with intracellular lipid inclusions*. Arch Intern Med, 1980. **140**(4): p. 560-1.
85. Beil, W.J., et al., *Ultrastructural immunogold localization of subcellular sites of TNF-alpha in colonic Crohn's disease*. J Leukoc Biol, 1995. **58**(3): p. 284-98.
86. Melo, R.C., et al., *Macrophage lipid body induction by Chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicosanoid formation during infection*. Tissue Cell, 2003. **35**(1): p. 59-67.
87. Wan, H.C., et al., *Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies*. FASEB J, 2007. **21**(1): p. 167-78.
88. Yu, W., et al., *Co-compartmentalization of MAP kinases and cytosolic phospholipase A2 at cytoplasmic arachidonate-rich lipid bodies*. Am J Pathol, 1998. **152**(3): p. 759-69.
89. Umlauf, E., et al., *Association of stomatin with lipid bodies*. J Biol Chem, 2004. **279**(22): p. 23699-709.
90. Fujimoto, Y., et al., *Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1644**(1): p. 47-59.
91. Liu, P., et al., *Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic*. J Biol Chem, 2004. **279**(5): p. 3787-92.
92. Brasaemle, D.L., et al., *Proteomic analysis of proteins associated with lipid droplets of basal and lipolytically stimulated 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46835-42.
93. Dvorak, A.M., et al., *Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies*. Int Arch Allergy Immunol, 1993. **101**(2): p. 136-42.
94. Bozza, P.T., et al., *Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 909-20.
95. Dvorak, A.M., *Human chorionic mast cells with numerous lipid bodies and a mixture of immature and mature granules are present in gastroschisis*. Pediatr Pathol, 1991. **11**(4): p. 673-6.
96. Bozza, P.T. and J.P. Viola, *Lipid droplets in inflammation and cancer*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010. **82**(4-6): p. 243-50.
97. Bozza, P.T., et al., *NS-398: cyclooxygenase-2 independent inhibition of leukocyte priming for lipid body formation and enhanced leukotriene generation*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **67**(4): p. 237-44.
98. Vieira-de-Abreu, A., et al., *Allergic challenge-elicited lipid bodies compartmentalize in vivo leukotriene C4 synthesis within eosinophils*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005. **33**(3): p. 254-61.
99. D'Avila, H., et al., *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3087-97.
100. Almeida, P.E., et al., *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis*. J Immunol, 2009. **183**(2): p. 1337-45.

101. Mancuso, P. and M. Peters-Golden, *Modulation of alveolar macrophage phagocytosis by leukotrienes is Fc receptor-mediated and protein kinase C-dependent*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(6): p. 727-33.
102. Serezani, C.H., et al., *Leukotrienes enhance the bactericidal activity of alveolar macrophages against Klebsiella pneumoniae through the activation of NADPH oxidase*. Blood, 2005. **106**(3): p. 1067-75.
103. Lee, S.P., et al., *Crosstalk between prostaglandin E2 and leukotriene B4 regulates phagocytosis in alveolar macrophages via combinatorial effects on cyclic AMP*. J Immunol, 2009. **182**(1): p. 530-7.
104. Peres, C.M., et al., *Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5454-61.
105. Campos, H., *Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas*. Pulmão RJ, 2006. **15**(1): p. 29-35.
106. Giampaglia, C.M., et al., *Multicentre evaluation of an automated BACTEC 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis*. Int J Tuberc Lung Dis, 2007. **11**(9): p. 986-91.
107. Dietze, R., et al., *Early and extended early bactericidal activity of linezolid in pulmonary tuberculosis*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(11): p. 1180-5.
108. Clemente, W.T., et al., *Phenotypic and genotypic characterization of drug-resistant Mycobacterium tuberculosis strains*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008. **62**(2): p. 199-204.
109. Sterling, T.R., et al., *Immune function in young children with previous pulmonary or miliary/meningeal tuberculosis and impact of BCG vaccination*. Pediatrics, 2007. **120**(4): p. e912-21.
110. Mathema, B., et al., *Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights*. Clin Microbiol Rev, 2006. **19**(4): p. 658-85.
111. Dormans, J., et al., *Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different Mycobacterium tuberculosis genotypes in a BALB/c mouse model*. Clin Exp Immunol, 2004. **137**(3): p. 460-8.
112. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 463-96.
113. Kato-Maeda, M., et al., *The nature and consequence of genetic variability within Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 533-7.
114. Peres, C.M.F., F G; Soares, EM; Fontanari, C; Sorgi, C A; Rosada, R S; Soares, E G; Leão, S C; Silva, C L; Faccioli, L H, *Mycobacterial phospholipase C promotes exacerbated pulmonary inflammation and impaired clearance of Mycobacterium tuberculosis*. In submission, 2013.
115. Peres-Buzalaf C, d.P.L., Frantz FG, Soares EM, Medeiros AI, Peters-Golden M, Silva CL, Faccioli LH., *Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids., 2011.
116. McDonough, K.A. and Y. Kress, *Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun, 1995. **63**(12): p. 4802-11.
117. Secatto, A., et al., *5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection*. PLoS ONE, 2012. **7**(3): p. e31701.
118. Faccioli, L.H., et al., *Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms*. Agents Actions, 1990. **30**(3-4): p. 344-9.
119. Hogaboam, C.M., et al., *Collagen deposition in a non-fibrotic lung granuloma model after nitric oxide inhibition*. Am J Pathol, 1998. **153**(6): p. 1861-72.
120. Aronoff, D.M., et al., *Synthetic prostacyclin analogs differentially regulate macrophage function via distinct analog-receptor binding specificities*. J Immunol, 2007. **178**(3): p. 1628-34.
121. Soares, E.M., et al., *Leukotriene B4 enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent Streptococcus pyogenes*. J Immunol, 2013. **190**(4): p. 1614-22.
122. Chan, J., et al., *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. The Journal of experimental medicine, 1992. **175**(4): p. 1111-22.
123. Araujo-Santos, T., et al., *Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E(2) production in murine macrophages*. PLoS Negl Trop Dis, 2010. **4**(11): p. e873.
124. Jo, E.K., *Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs*. Curr Opin Infect Dis, 2008. **21**(3): p. 279-86.

125. Behar SM, M.C., Booty MG, Nishimura T, Zhao X, Gan HX, Divangahi M, Remold HG., *Apoptosis is an innate defense function of macrophages against Mycobacterium tuberculosis*. Mucosal Immunol., 2011(3): p. 279-87.
126. Chen, M., et al., *Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE2 and LXA4 in the induction of macrophage death*. J Exp Med, 2008. **205**(12): p. 2791-801.
127. Divangahi, M., et al., *Eicosanoid pathways regulate adaptive immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 751-8.
128. Assis, P.E., MS; Paula e Silva, FG; Pereira, PAT; Leão, SC; Silva, CL; Faccioli LH, *Mycobacterium Tuberculosis expressing phospholipase C subverts PGE2 synthesis to induce necrosis In alveolar macrophages* in submission, 2013.
129. Shin, K.M., et al., *Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(12): p. 2327-36.
130. Quesniaux, V.F., et al., *TNF in host resistance to tuberculosis infection*. Curr Dir Autoimmun, 2010. **11**: p. 157-79.
131. Jacobs, M., et al., *Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection*. Microbes Infect, 2007. **9**(5): p. 623-8.
132. Kleinnijenhuis, J., et al., *Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis*. Clin Dev Immunol, 2011. **2011**: p. 405310.
133. Schafer, G., et al., *Non-opsonic recognition of Mycobacterium tuberculosis by phagocytes*. J Innate Immun, 2009. **1**(3): p. 231-43.
134. Tanne, A. and O. Neyrolles, *C-type lectins in immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Front Biosci (Schol Ed), 2011. **3**: p. 1147-64.
135. Bozza, P.T., et al., *Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation*. The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(6): p. 909-20.
136. Bozza, P.T., et al., *Pathways for eosinophil lipid body induction: differing signal transduction in cells from normal and hypereosinophilic subjects*. Journal of leukocyte biology, 1998. **64**(4): p. 563-9.
137. Bozza, P.T., et al., *Mechanisms of platelet-activating factor-induced lipid body formation: requisite roles for 5-lipoxygenase and de novo protein synthesis in the compartmentalization of neutrophil lipids*. The Journal of experimental medicine, 1996. **183**(4): p. 1515-25.
138. Silva, A.R., et al., *Monocyte chemoattractant protein-1 and 5-lipoxygenase products recruit leukocytes in response to platelet-activating factor-like lipids in oxidized low-density lipoprotein*. Journal of immunology, 2002. **168**(8): p. 4112-20.
139. Bartemes, K.R., et al., *Endogenous platelet-activating factor is critically involved in effector functions of eosinophils stimulated with IL-5 or IgG*. Journal of immunology, 1999. **162**(5): p. 2982-9.
140. Weller, P.F., et al., *Cytoplasmic lipid bodies in eosinophils: central roles in eicosanoid generation*. International archives of allergy and immunology, 1999. **118**(2-4): p. 450-2.
141. Aronoff, S.C. and P.V. Scoles, *Treatment of childhood skeletal infections*. Pediatr Clin North Am, 1983. **30**(2): p. 271-80.
142. Miller, J.M., et al., *Cruise ships: high-risk passengers and the global spread of new influenza viruses*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(2): p. 433-8.
143. Appelberg, R., *Macrophage inflammatory proteins MIP-1 and MIP-2 are involved in T cell-mediated neutrophil recruitment*. J Leukoc Biol, 1992. **52**(3): p. 303-6.
144. Berry, M.P., et al., *An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis*. Nature, 2010. **466**(7309): p. 973-7.
145. Nandi, B. and S.M. Behar, *Regulation of neutrophils by interferon-gamma limits lung inflammation during tuberculosis infection*. J Exp Med, 2011. **208**(11): p. 2251-62.
146. Young, D.B., et al., *Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis*. J Clin Invest, 2008. **118**(4): p. 1255-65.
147. Cooper, A.M., *Cell-mediated immune responses in tuberculosis*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 393-422.
148. Cooper, A.M., K.D. Mayer-Barber, and A. Sher, *Role of innate cytokines in mycobacterial infection*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 252-60.
149. Flynn, J.L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice*. Immunity, 1995. **2**(6): p. 561-72.

150. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10*. Annu Rev Immunol, 1993. **11**: p. 165-90.
151. Bean, A.G., et al., *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, 1999. **162**(6): p. 3504-11.
152. Kaneko, H., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice*. Lab Invest, 1999. **79**(4): p. 379-86.
153. Bafica, A., et al., *Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1601-6.
154. Frantz, F.S., CA; Rosada, RS; Fontanari, C; Soares, EM; Galvão, AF; Bitencourt, CS; Zoccal, KF; Brandão, I; Masson, AP; Ramos, SG; Silva, CL; Faccioli LH., *Leukotriene B4 drives host susceptibility to Mycobacterium tuberculosis infection* in submission, 2013.
155. Franco, L.H., et al., *Leukotrienes are not essential for the efficacy of a heterologous vaccine against Mycobacterium tuberculosis infection*. Braz J Med Biol Res, 2010. **43**(7): p. 645-50.

Anexos

ANEXO A- Manuscrito

Lipid mediators regulates the host response against *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates

Elyara Maria Soares¹; Gabriel Rodrigues Pietro¹; Adriana Secatto¹; Caroline Fontanari¹; Alyne Fávero Galvão¹; Camila Peres Buzalaf¹; Solange Alves Vinhas², Moises Palaci²; Simone Gusmão Ramos³, Célio Lopes Silva³, Carlos Artério Sorgi¹; **Lúcia Helena Faccioli^{1#}**

¹*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.*

²*Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Biomédico, 29040-091, Vitória, Espírito Santo, Brasil.*

³*Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14049-900, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.*

Corresponding author

Lúcia H. Faccioli

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 14040-903, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

Telephone: 55 16 36024303. Fax: 55 16 36024725. E-mail: faccioli@fcrp.usp.br

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, leukotriene B₄, prostaglandin E₂

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazil (EMS, LHF)

Abstract

The mechanisms that confer resistance to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for destruction by the host, in addition to its ability to retain and/or multiply within phagocytic cells are still poorly understood. Our research group has contributed to the understanding of the role of lipid mediators, including prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) in tuberculosis. PGs inhibit Th1 cell immune response, cytokine production and phagocytosis, thus facilitating the infection. LTs are involved in the leukocytes recruitment, and modulation of cytokine synthesis, phagocytosis and microbicidal mechanisms enhancement, and contribute to the elimination of the mycobacteria. In this project, we evaluated *in vivo* and *in vitro* the lipid mediators production induced by *Mtb* strains isolated from patients with active tuberculosis. We demonstrated in this study that alveolar macrophages infected with bacilli from SV009 strain lead to an increase of TNF- α production and nitrite, than those infected with the strain SV068. In contrast, alveolar macrophages infected with bacilli from SV068 strain induced more LTB₄ production when compared to SV009 infection. We obtained higher recovery colony forming units (CFU) of alveolar macrophages treated with MK886 and infected with bacilli from SV068 strain; while more CFUs were recovered after treatment with caffeic acid and infection with bacilli from SV009 strain. Regarding the lipid bodies (LBs) formation, we observed a greater number of these structures, when alveolar macrophages were infected with bacilli from SV068 strain. Still, we observed a decrease of LBs when the macrophages were treated with MK886 and caffeic acid. Bacilli from SV068 strain were more phagocytosed, but macrophages were not very effective in the microbicidal activity. In the *in vivo* experiments we found that mice infected with SV068 strain die more than the other and MK886 treatment partially protects the mice, besides, the mortality is not related to the higher bacterial load in the lung or spleen. There was an increase in neutrophil recruitment induced after infection, especially after infection with SV068

strain, and treatment with MK886 significantly inhibits recruitment when compared to infection with SV009 strain. Mononuclear cells were also recruited and remained increased until the end of the observed period, without many significant differences when comparing infection with SV009 and SV068 strains. The nitrite production was also found greater in animals infected with bacilli from SV068 strain. Histopathological analysis of the infected mice lungs showed an intense inflammatory reaction with greater impairment of the mice lungs when infected with bacilli from SV068 strain with an intense collagen deposition and multiplication of bacilli. We suggest that the SV068 strain is more virulent and participates of the immune response by lipid mediators dependent mechanisms.

Introduction

Infectious diseases such as tuberculosis (TB) affect the world population with incidence varying due to several factors, such as habits and irregular living conditions. At the end of the nineteenth century, Robert Koch^[1] identified the causative agent of this disease, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (or Koch's bacillus), which enabled a breakthrough in understanding and fighting this mycobacterium infection. Recent data from the World Health Organization show that there were 9 million new cases and 1.4 million deaths in 2010^[2]. The global resurgence of TB has been related, among other factors, the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)^[3], which suppresses the host immune system allowing the proliferation of the bacillus that could be dormant. In addition, factors such as the inefficiency of the health system, the conditions of malnutrition and poverty in certain regions, the growth of migration flows and the difficulty of adherence to treatment regimens extensive contributed to the increased incidence of TB^[4, 5]. The immense impact of TB on public health has been recognized and the development of new tools to combat and control the epidemic became international priority. The current strategy for TB control is based on the reduction of contagion through the treatment of individuals with active TB and vaccination of children in endemic areas. The World Health Organization has implemented a system of therapy in different regions of the world, which helped to control, but it was not enough to restrain the epidemic global TB and prevent the spread of multidrug-resistant strains, in part by withdrawal of infected individuals to complex regimens^[3].

TB is predominantly a disease of the lung, with pulmonary TB affecting 70% of cases, although *Mtb* can disseminate to other organs, including lymph nodes, bone and meninges, it can cause extrapulmonary disease too^[5, 6]. It is important to remember that estimated one third of the world is infected with *Mtb* but remains asymptomatic defined as having latent TB^[7]. Of those with

latent TB, only 5–10% will develop active TB disease in their lifetimes^[8, 9]. Some important gaps exist to understanding how to help better minimize the TB in the world.

Macrophages are important cells involved in the defense mechanisms against pathogens including Mtb, among these mechanisms are phagocytosis and microbicidal activity. The entrance of Mtb into the macrophage is mediated by different receptors, including scavenger, complement and mannose receptors^[10]. Also macrophages can eliminate Mtb via different mechanisms^[11]. Special attention should be paid for these basic mechanisms emphasizing the host microbial interactions.

The organization of the host immune response to Mtb results in the granuloma formation and depending on the stage of disease they can promote infection or being protective. The granulomas are composed of a central mass of infected macrophages, stimulated macrophages that have differentiated into multinucleated giant cells, epithelioid cells, foamy macrophages and neutrophils. This internal accumulation of cells becomes surrounded by lymphocytes and fibroblasts^[12]. Granuloma formation is extensively studied, but is still unclear if there are differences in its development when the study is related with extrapulmonary or pulmonary TB.

Eicosanoids are potent modulators of immunity that are oxygenated metabolites of the cell membrane constituent molecule arachidonic acid^[13]. They are produced in Mtb infected lungs and can have immune suppressive effects caused by prostaglandins (PGs) and protective effects induced by leukotrienes (LTs). Animals infected with H37Rv strain and treated with celecoxib

had a survival increase with diminished colony formatting units (CFUs) in the lungs and another infected group treated with MK886 abrogated survival and an augment in CFUs was observed ^[14, 15]. As we known, they have opposite effects considering *in vivo* and *in vitro* mechanisms in different models of infection including TB, but nothing is known what happens when the infection is prevenient from different strains isolated from patients with active TB.

Although there are several studies characterizing the molecular basis of Mtb pathogenicity, little is known about the mechanisms that confer resistance of mycobacteria to destruction by the host, and the factors related to its ability to retain and /or multiply within phagocytic cells, too little is known about what factors the bacteria or host that determine the different clinical forms of the disease. It is known that infection with Mtb can be cavitary or not, or extrapulmonary. The pulmonary form is the most severe and common; and extrapulmonary form is due to the spread of bacilli by currents blood and / or lymph from the initial focus in the lungs.

Based on these data, we hypothesized that the relationship between the pathogenesis of infection and the effector mechanisms of the innate immune response were dependent on LTs and/or PGs production induced by infection of different strains of Mtb.

Abbreviations used in this paper: AM- alveolar macrophage; Ca^{+2} -calcium; CFU- colony forming unit; COX- cyclooxygenase. DM- decidual macrophage; DMSO- dimethyl sulfoxide. FBS- fetal bovine serum; FITC- fluorescein isothiocyanate. GPCR- G protein coupled receptor. HK- heat killed. LT-leukotriene; LTB_4 -leukotriene B_4 . NADPHox- nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase. PGE_2 . prostaglandin E_2 ; ROI- reactive oxygen intermediate; $\text{RPMI}^{+/+}$ - RPMI 1640 supplemented with 1% antibiotic-antimycotic and 10% charcoal/dextran treated Fetal Bovine Serum (FBS); $\text{RPMI}^{+/-}$ - RPMI 1640 supplemented with 1% antibiotic-antimycotic in the absence of serum, PBS- Phosphate buffered saline, WT, wild type.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640 culture medium, antibiotic solution (penicillin and streptomycin) including an antimycotic (amphotericin) was from Invitrogen (Carlsbad, CA). FBS; Fluorescein isothiocyanate (FITC), trypan blue, saponin were from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). LTB_4 , PGE_2 and A23187 were from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI). ELISA kits to measure intracellular cAMP were from Enzo LifeSciences (Farmingdale, NY). Required dilutions of all compounds were prepared immediately before use, and equivalent quantities of vehicle were added to the appropriate controls. Compounds requiring reconstitution were dissolved in DMSO (Sigma).

Animals

Male 5-8-week-old BALB/c mice and pathogen-free 125 - 150 g Wistar rats were obtained from the animal facilities of the Faculdade de Ciências Farmacêuticas and Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo and were kept under barrier conditions at a level III biohazard laboratory. All experiments were approved and conducted in accordance with guidelines of the Animal Care Committee of the University (Protocol 09.1.201.53.7).

Mycobacterium tuberculosis clinical isolates

Clinical isolates were obtained from patients with active tuberculosis provided by Dr Moises Palaci and were approved conform to the protocol 098/2006. The standard strain H37Rv also was used in this work as a control in some experiments. The strains used were isolated from patients with extrapulmonary TB (068) and non cavitary (009). The strains were maintained in 7H9 Middlebrook at 37 °C for 10 days, during which time the culture reaches logarithmic growth phase. From this period, the strains were subcultured in solid Lowenstein-Jensen, where they remained in culture for 28 days, and subsequently kept at 4 °C to keep the viability of the strains. All the procedures with the bacilli were performed at level III biohazard laboratory. To prepare the inoculum, the culture was harvested by centrifugation, and the cell pellet was resuspended in sterile PBS and agitated vigorously. Viability of *M. tuberculosis* suspension was tested previously with fluorescein diacetate and ethidium bromide.

Infection with viable Mycobacterium tuberculosis clinical isolates and treatment with MK886

Mice were anesthetized with ketamine and xylasin intraperitoneally with 80 mg/kg e 15 mg/kg respectively. After that, they were infected by the intratracheal route and received either 100 µl of PBS or 10⁵ viable CFU of each *M. tuberculosis* strain in 100 µl of PBS. For experiments with

MK886, animals were divided in groups: (1) group of animals received intratracheally (i.t.) injections of PBS and were given water orally (0.5 ml) for 60 days. (2) The other groups were infected with Mtb strains and (3) Mtb plus a dose of 5 mg/kg/0.5 ml MK886 as has previously been shown to inhibit the synthesis of leukotrienes. It is important to know that the mice received treatment 1 h before the infection starts and when appropriate they were orally treated every day, 24 h later and at the same time^[14-16].

Bronchoalveolar lavage fluid

On days 30 and 60 following infection, animals were euthanized with anesthetic overdose and lavage fluid was recovered by lavage with 1 mL of PBS three times. Lavage fluid was recovered and placed on ice as previously described. Total cell counts were immediately performed in a Neubauer chamber. Differential counts were obtained using Panotico-stained cytopspin preparations^[15, 17].

Quantitation of bacterial loads

After 30 and 60 days post infection, the number of live bacteria recovered from the lungs was determined as colony formatting units (CFU) by plating 10-fold serial dilutions of homogenized tissue on Middlebrook 7H11 solid agar and colonies were counted after 21days at 37 °C, and data were expressed as log₁₀ of CFU as described before^[14, 15].

Histopathology Analysis

Lungs were harvested and were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, cut into 5 µm with haematoxylin and eosin, ziehl neelsen and masson thricrome stained sections. Analysis of these

sections was performed with a video camera (Leica Microsystems Ltd., Heebrugg, Switzerland) applied to a Leica microscope DMR (Leica, Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) that was attached to a computer. Images were processed by Leica QWin software (Leica Microsystems Image Solutions, Cambridge, UK).

Isolation and Culture of Alveolar Macrophages

Resident AMs of > 95% purity were obtained from rats via lavage and resuspended in RPMI 1640 at 2×10^6 cells/ml. Cells were adhered to tissue culture-treated slides or plates for 3 hr (37°C, 5% CO₂) followed by 2 washes with warm RPMI. Cells were cultured overnight in RPMI containing 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B before use. The next day cells were washed 2 times with warm medium to remove nonadherent cells^[18].

*Fluorometric Phagocytosis Assay with FITC-labeled *M. tuberculosis* clinical isolates*

The phagocytosis of unopsonized and viable FITC-labeled Mtb clinical isolates were assessed by rats AMs. Cells were plated in tissue culture treated 96 well-plate at 2×10^5 cells per well and the phagocytosis was performed how previously reported. After an overnight rest, media was removed and RPMI-I containing vehicle or different stimuli were added as indicated in the figure legends. After appropriate incubations, unopsonized and viable FITC-labeled Mtb clinical isolates were added at multiplicity of infection (MOI) 1:1 and incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 2 h. Extracellular bacterial fluorescence was quenched with trypan blue (500 µg/mL in 0.09 M citrate buffer) for 15 min in the dark before the fluorescence was determined on a microplate flourometer (485ex/535em), SPECTRAMax GEMINI EM; Molecular Devices, Sunnyvale, CA. A minimum of eight replicates were done for each condition in each experiment. Fluorometric data were expressed in arbitrary relative fluorescence emitted from intracellular phagocytosed

bacteria (RFU_i) and was determined by subtracting the fluorescence from unquenched, extracellular bacteria (RFU_{ex}) from the total fluorescence of the experimental well (RFU_{total}). The RFU_{ex} was determined using the fluorescence of cells exposed for 30 min to the phagocytosis inhibitor cytochalasin D (20 µg/mL). Thus, the PI = RFU_i = RFU_{total} – RFU_{ex} as described before ^[19, 20].

Bacterial Killing Assay

Rat AMs (2 x 10⁵ cells per well) were infected with a MOI of 1:1 CFU per macrophage of Mtb clinical isolates. After 2h at 37°C, the medium was removed and all the wells were washed twice with PBS to remove extracellular bacteria. Cells were lysed with 0.5% of saponin, and number of viable intracellular CFU was counted by plating 10-fold serial dilutions of the lysis solution onto Middlebrook 7H11. A parallel group of cells were utilized to evaluate the percentage of ingested organisms which were killed. They were treated or not for 24h at 37°C. After this time, these cells were lysed with 0.5% of saponin in PBS and plated in 7H11 medium. After 30 days at 37°C, the killing was determined by the CFU number grown after 24h x 100/CFU number grown after 2h^[14, 15].

Measurement of Lipid Mediators and Cytokines

The lungs were removed after 30 and 60 post infection for PGE₂ and LTB₄ measurements for *in vivo* experiments. Tissue was homogenized in 2 ml of RPMI-I, centrifuged at 1,500 rpm filtered, sterilized, and stored at -70 °C until assayed. Supernatants from cell culture after 24 h post *in vitro* infection also were used to measure PGE₂ and LTB₄. They were stored until the moment of the assay. Specific enzyme immunoassay was used to quantify the PGE₂ and LTB₄ in the samples.

The optical density of samples was determined at 450 nm in a microplate reader, and concentrations of eicosanoids were calculated based on a standard curve. For the cytokines quantification we used supernatants from cell culture of alveolar macrophages infected or not with the Mtb clinical isolates. Tissue was homogenized and stored as described above. Commercially available ELISA was used to measure TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN). Sensitivities used were 410 pg/ml.

Nitric Oxide measurement

Nitric oxide production was assessed by measuring the amount of nitrite in the lungs homogenates and in supernatants of AMs cell culture (2×10^5 cells per well), all obtained as described above. The quantitation of NO was measured by the Griess reagent. Values were determined using standard curve serial dilutions of NaNO₂.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean $\pm$ SEM and were analyzed with the Prism 5.0 statistical program (GraphPad Software). Comparisons among three or more experimental groups were performed with one-way ANOVA followed by a Bonferroni correction and between two experimental groups a Student *t* test was used, unless otherwise stated. Differences were considered significant for values of $P < 0.05$. Animal survival experiments were evaluated for differences using a Mantel-Cox log-rank test.

Results

SV009 and SV068 Mtb strains induced time-dependent production of TNF- α and nitrite by infected alveolar macrophages

Knowing the importance of TNF- α and nitric oxide production in tuberculosis, AMs obtained from rats were infected *in vitro* with two Mtb strains and after 2, 6, 12 and 24 of infection; the supernatant was removed and stored at -20 °C to quantify them. As shown in Figure 1, the TNF- α (A) and nitric oxide (B) production occurred in a time-dependent manner after infection with SV009, reaching a peak of production in 24 h. On the other hand SV068 was unable to induce the production of these inflammatory mediators by AMs. Whereas that in time point of 24 h was observed an increased production of those mediators, this was chosen as the standard time for the following experiments. Our data are consistent with the literature which it has been demonstrated that the host defense against Mtb is essential the nitrite release, and that this is regulated by the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α ^[21].

Infection of AMs with the SV068 and SV009 strains induced an augment in the LTB₄ and PGE₂ production respectively

Previously published works by our and other research groups have been demonstrated the role of lipid mediators in different infections and using different strains of Mtb. However, we evaluate the production of lipid mediators in the culture supernatants of AMs infected with the two strains after 24 h. As shown in Figure 2A, the infection with the SV068 induced an increase in the LTB₄ production 7.1 times greater compared to the SV009 and 3.15 times to the control. Infection with

SV009 also induced a significant increase of 2.1 times more LTB_4 compared to the control. On the other hand, infection with SV009, as can be seen in Figure 2B, induced an increase in PGE_2 production of 25-fold relative to the control and 2.5 times in relation to infection with SV068. Infection with strain SV068 led to an increase of 3.3 times more PGE_2 compared to the control (Fig. 2B).

MK886 treatment inhibits the LTB_4 but not PGE_2 production, released into the culture AMs supernatants infected with the SV009 or SV068 Mtb strains

After observe a differential production of lipid mediators induced by the two strains, we used MK886, LTs synthesis inhibitor, in different concentrations to evaluate the role of endogenous LTs and if any effect could be observed in the production of PGE_2 . Thus, AMs were pretreated 30 minutes before the infection with SV009 and SV068, and stimulation remained in the culture throughout the infection period. Supernatants were collected and LTB_4/PGE_2 were quantified. Medium supplemented with DMSO (0.01%) was used as a negative control. As shown in Figure 3 and in Figure 2A noted above, infection with the strain SV068 induced LTB_4 approximately 16.5 times more as compared to the control. Treatment with MK886 significantly inhibited the production of this mediator, and AMs infected with SV068 produced only 2 times more LTB_4 when given 0.1 and 1 μM of MK886 compared to the control. Moreover, macrophage infection with the SV009 induced significant release of PGE_2 (27 times compared with the control (Fig. 3B) in the culture supernatant infected AMs. As expected, PGE_2 production (Fig. 3B) by infected AMs with the two strains was not affected by MK886 treatment.

Caffeic acid effect in the lipid mediators production released from culture supernatants of infected AMs

It is known that caffeic acid also is an inhibitor of the enzyme 5-lipoxygenase (5-LO), and we assessed its effect on lipid mediator production by infected AMs with the two Mtb strains. To do so, AMs were pretreated for 1 hour prior to infection and stimulate in culture remained throughout the infection period (24 hours). We used 10 and 100 μ M of caffeic acid and used as the negative control medium supplemented with 0.01% DMSO (vehicle). After 24 hours of infection, the supernatants were collected and subjected to quantitation of PGE₂ and LTB₄. As illustrated in Figure 4A, 100 μ M of caffeic acid inhibited LTB₄ production by AMs infected with the SV068 when compared to the control, but no treatment has modified the PGE₂ production (Fig. 4B) by AMs infected with both strains.

Effect of MK886 treatment on the inflammatory mediators production from culture supernatants of infected AMs

In order to assess whether the LTs influences the endogenous production of nitrite and TNF- α , AMs were pretreated for 30 minutes with MK886 at concentrations of 0.1 and 1 μ M prior to the infection with SV009 and SV068 strains. The drug remained throughout the time period chosen as the best analysis (24 h). Then, the supernatants were collected and nitrite and TNF- α quantified. The negative control was used as a carrier medium plus DMSO (0.01%). As previously noted in Figure 1A and B, the infection with the SV009 was able to induce an increased nitrite production and TNF- α by AMs. We also saw in Figure 5A and 5B the same

pattern, but there were no significant changes in both mediators by AMs treated with different concentrations of MK886 and infected with the two strains.

Alveolar macrophages phagocytosed more but kill less bacilli of SV068 Mtb strain

The phagocytic and microbicidal activity of macrophages have been described as important mechanisms in controlling infection against various pathogens including Mtb. Thus, we evaluate these mechanisms using infected AMs with SV009 and SV068. As can be seen in Figure 6A, AMs infected with SV009 as those infected with strain H37Rv (considered 100%) has the same phagocytosis percentage. Moreover, AMs infected with SV068 phagocytosed 300% more when compared to AMs infected with H37Rv and SV009. Infected AMs killed 18% fewer bacilli when comparing SV068 to SV009, and approximately 40% more when compared to H37Rv as showed in Figure 6B.

Effect of MK886 and caffeic acid treatment on infected AMs in the UFCs recovery

To assess whether the inhibition of LT synthesis alters the recovery of colony forming units, AMs were pretreated with MK886 (0.1 and 1 μ M) for 30 minutes and were then infected with the strains. MK886 was maintained throughout the 24 h of infection. Pretreatment of AMs with caffeic acid (10 to 100 μ M) was 1 hour before infection and also remained in culture until the end of 24 hours after infection. Again we used as a negative control medium with DMSO (0.01%). In Figure 7A, we shown CFU recovery of Mtb infected AMs after treatment with 0.1 and 1 μ M of MK886. The CFU number recovered after AMs lysis which has received pretreatment with only vehicle and those ones infected with SV068 was significantly higher than

SV009. As expected, after treatment with 1 μ M of MK886 the CFU number recovered after SV068 infection increased approximately 60%, and had a significant increase of approximately 5% compared to SV009. Figure 7B shows the CFUs recovered after treatment with caffeic acid and infection with SV009 and SV068. AMs treated with caffeic acid and infected with the strain SV009 showed more CFU recovered compared to AMs that only received vehicle alone or those infected with SV068 and/or treated with caffeic acid.

MK886 treatment inhibits the lipid bodies formation by AMs infected with SV068Mtb strain

Then we evaluated the lipid bodies formation (LBs) knowing that they are organelles involved in the lipid mediators synthesis during inflammatory processes and also because we saw differences in lipid mediators production. Our and other research groups have shown that infections with pathogens and other stimuli are capable of inducing the synthesis of LBs^[22, 23]. The treatment with MK886 (0.1 and 1 μ M) was performed for 30 minutes prior to infection of AMs with SV009 and SV068, and the drug remained throughout the infection period (24 h). As shown in Figure 8A, the greatest formation of LBs was when the AMs were infected with SV068 compared to AMs infected with SV009 and also with vehicle alone. After treatment with MK886, infected AMs with SV068 showed a significant decrease in the LBs numbers.

Caffeic acid treatment induces a slight increase in the LBs formation by infected AMs with SV009 and inhibition of LBs in those infected SV068 Mtb strain

We saw that MK886 was able to decrease the LBs formation by infected AMs when infected only with SV068 strain, so, we evaluated the effect of treatment of AMs with caffeic acid. After

24 hours of infection, the supernatant was removed and the formaldehyde solution 3.7% (v/v) was added to fix the cells added to the wells of glass slides, which were then stained with OsO₄. As can be seen in figure 8B, AMs infected with SV068 and treated with caffeic acid at a concentration of 100 μ M showed less LB formation and there was a slight increase in the formation after treatment with a concentration of 10 μ M compared to AMs that received vehicle only.

SV068 strain is more virulent Mtb infection in experimental

Since the results obtained *in vitro* were interesting and infection the infection showed us, briefly that AMs infected with SV009 release significantly more PGE₂, TNF- α and nitrite than those infected with SV068, which release more LTB₄, we started the *in vivo* experiments using the same strains and evaluate the behavior and host immunity in response to infection. Thus, BALB/c mice were infected with 1×10^5 corresponding to SV068 and SV009, and survival was monitored over 80 days after infection. As can be seen in Figure 9A, mice infected with SV068 die more, while approximately 30% of those infected with SV009 survive until the end of the period observed. New infection was performed with the two strains and the animals were treated daily with MK886, in order to assess the role of LTs in the course of infection. Peres et al., previously demonstrated that mice infected with H37Rv, that MK886 impairs the control of infection by the host^[14]. The results in Figure 9B show that treatment with MK886 has an impact when using different strains, since approximately 60% of mice infected with the SV009 survive (Figure 9B) in contrast with 80% of those infected with SV009 and treated with MK886. We also observed that infection with SV068, leads to higher mortality of mice, surviving only 20%

of them (Figure 9C), and treatment of animals infected with strain SV068 and treated with MK886 had a survival rate of approximately 37% (Figure 9C).

CFUs recovered from the lungs and spleens of mice infected with the Mtb strains

As noted in the previous figure, the SV068 strain appears to be more virulent strain as compared to SV009. Thus we evaluated the susceptibility of those mice by determining the CFUs in the lung and spleen of these, 30 and 60 days after infection. In Figure 10A we can see that there was a 0.5 log reduction of the CFUs recovered after 30 days of infection with SV068 when compared to SV009. At 60 days after infection no difference was observed between the groups. However we cannot relate only CFUs recovered after infection as a determinant of mortality in mice infected with strain especially SV068. Moreover, as can be seen in Figure 10B, the bacilli were spread to the spleen of infected mice. We saw that 30 days after infection, there was a 0.5 log reduction in CFUs recovered from the spleen of mice infected with SV068 when compared with those obtained from mice infected with SV009. After 60 days no statistical difference was observed, but we can observe and say that there was bacilli spread to the spleens of both groups.

SV068 Mtb strain causes greater tissue damage in the lung parenchyma

After evaluate the survival and CFUs after infection, histopathological analyzes were performed to determine the tissue damage caused by the infection. For this, BALB/c mice were infected with both strains after 30 and 60 days, and the lungs were removed and processed for histology, and then stained with hematoxylin&eosin (HE) for analysis of the cellular infiltrate, with

Masson's Trichrome (TM) or Gomori Thrichrome (TG) analysis for collagen deposition and Ziehl Neelsen (ZN) to analyze the presence of the bacilli.

We observe in Figure 11-board 1, lung sections from mice inoculated with PBS (A) and mice infected with SV009 (B), SV068 (C) stained with HE after 30; (D) SV009 (E) SV068 after 60 days after infection. In A, we observe well-preserved lung tissue without collagen deposition, as expected. On the other hand, the lung tissue of infected mice with SV009 30 days after infection, presented lesions in the parenchyma lung where we found high leukocyte infiltration, predominantly around vessels with tendency to giant cells formation and large numbers of neutrophils as can be seen in the histological section shown in Figure 11B. There was also collagen deposition after 30 and 60 days after infection as confirmed by TG staining (Figure 11B and D-board 2) and multiplication of bacilli demonstrated by ZN staining (Figure 11B and D-board 3).

The histopathological sections obtained from mice infected with SV068, we observed a larger parenchymal injury affecting the entire lung tissue. As we can see, both after 30 (Figure 11C-board 1) or 60 (Figure 11- board 1) days after infection, the parenchyma lung showed intense lymphocytic and neutrophilic infiltrate around the alveolar septa. We also seen collagen deposition (Figure 11C and E-board 2) and also the ZN staining demonstrated an increased number of bacilli (Figure 11C and E-board 3), which were multiplied in tissue and remained until 60 days post infection.

Migration kinetics of inflammatory cells to the bronchoalveolar space of infected mice with the two Mtb strains

We also evaluated cell recruitment to the bronchoalveolar space, after infection of BALB/c mice with SV009 and SV068 and treated or not with MK886. As shown in Figure 12A, after 30 days of infection we observed an increase in total cell recruitment induced strains especially at 30 days. Although the number of cells induced by isolated SV068 was higher than those observed with strain SV009, the difference was significant only for the group inoculated with PBS and 60 days after infection showed no difference in recruitment.

The neutrophils recruitment to the bronchoalveolar space significantly increased followed by the infection after 30 days post infection with SV009 and SV068, also in 60 days when compared to the group inoculated with PBS alone (Figure 12B). However, the neutrophil recruitment induced by infection with SV068 was significantly 22% higher after 30 days post infection when compared to the recruitment induced by infection with SV009. The same phenomena can be observed after 60 days, but the number of recruited neutrophils to the bronchoalveolar space was less intense. Figure 12B shows that the treatment with MK886 only decreased the number of recruited neutrophils after infection with SV068, 30 and 60 days post infection.

We also evaluated the mononuclear cells recruitment to the bronchoalveolar space after infection with both strains. As shown in Figure 12C, recruitment was significant throughout the 60 days when compared with the group that received only PBS. The infection with the two strains induced an increase in recruitment, but no significant differences when comparing both groups infected at 30 and 60 days post infection. We only observed a decrease in the recruitment of mononuclear cells at 60 days after infection caused by SV068, which was found elevated, but no different compared to the group infected with SV009 and/or treated with MK886.

SV068 Mtb strain induces increased production of nitrite in the lungs homogenate of infected mice

We know that nitric oxide is a determinant key for the immune response and important in microbicidal mechanisms of macrophages. So, we evaluated the production of nitrite by lung cells of mice infected with the different strains, and the quantification was performed by the Griess method. As we can see in Figure 13, infection with SV009 and SV068 strains significantly augment nitrite production in the lungs 30 days after infection when compared to those that received only PBS. Infection with SV068 induced an increase of approximately 30% of nitrite after 30 days post infection when compared with SV009.

Figures

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8

Figure 9

Figure 10

Figure 11

Figure 12

Figure 13

Discussion

The events of the immune and inflammatory responses that occur after *Mtb* pulmonary infection still are not fully understood, especially with regard to the escape mechanisms and virulence factors for the *Mtb*. To better understand the host-parasite relationship, in this work we used different strains isolated from humans with active TB, in order to study the mechanisms that lead to different forms of the disease (non cavitory and extrapulmonary). We know also that the control of TB infection in the population depends on better understanding of the mechanisms of the immune response.

This study suggests that the strain SV068 which appears to be more virulent also induces more production of LTB₄ supernatants of infected AMs, whereas SV009 induces more of PGE₂, nitrite and TNF- α production. We have also saw that the inhibition of the LT synthesis with MK886 does not change the production of TNF- α , nitrite and PGE₂, but as expected, inhibits the LTB₄ production in the supernatants of infected AMs with the strains SV009 and SV068. Our results are new, and demonstrated differential production of mediators using two different strains, suggesting that LTB₄ and PGE₂ may reflect the severity or protection against *Mtb*. Earlier studies establish the importance of LTs and PGs *in vivo* or *in vitro* in other models and also in *Mtb* experimental infection^[14, 20, 24, 25]. Although these data provided an important rationale for our hypothesis, little is still known about the role of the lipid mediators *in vivo* or *in vitro* using these *Mtb* strains.

We also showed the importance of endogenous LTs using the LT synthesis inhibitors as our tools-(1) MK886 which do not alters the production of TNF- α , nitrite or PGE₂, but as expected inhibited the LTB₄ production in the supernatants of infected AMs with SV009 and SV068 strains; and (2) caffeic acid induces increased production of nitrite, TNF- α , but only for infected

AMs with SV009. Furthermore, we found that the concentration of 100 μ M, inhibits the production of LTB₄ infected AMs with SV068 and does not change PGE₂ production. The role of endogenous LTs was demonstrated before in TB in *in vivo* model by Peres and col. ^[14], and our data is new in this context. The results with caffeic acid are also new, but it was demonstrated previously by Shin et al, that a caffeic acid methylated form is able to inhibit nitrite, PGE₂ and TNF- α ^[26].

Among the mechanisms that comprise the *in vitro* studies are included phagocytic and microbicidal activity of macrophages. We know that the infection begins with the phagocytosis of bacilli by AMs and dendritic cells, and this phenomenon is dependent on the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and by pattern recognition receptors (PRRs) present on cells of the immune system. Thus, depending on how the bacillus is recognized and activated there may be different responses. So, we evaluate the phagocytosis of infected AMs and we saw that the SV068 phagocytosed more, but they kill less bacilli of this strain. Unpublished data from our laboratory demonstrated the role of lipid mediators in phagocytosis and killing of Mtb and it was used strains with or without genes for phospholipase C. Bufalaf-Peres et al. showed that the presence of phospholipase C favors the phagocytosis of the bacilli by AMs and that it is reduced in the presence of specific inhibitors for phospholipase C^[22].

We also know that together with lipid mediators, cells can produce LBs and there are some studies showing a relation between the lipid mediators production and LBs formation *in vitro*. Our results showed more LBs formation by AMs infected with the SV068 strain, which one induces more LTB₄ production. Our data is interesting and we will evaluate by which mechanism this happens. After that and knowing that the two strains induce differential lipid mediators production, we evaluate the *in vivo* immune response which occurs in the host in response to the infection. We observed that SV068 was more virulent and after the treatment with MK886 the

mice were partially protected against *Mtb*. This data seems to be a little bit different from the previous works, because they correlated data between more mortality of mice and more recovered CFUs, indicating that they die because of this. But we can suggest that the data observed by us can be related to the parenchymal injury of the lungs caused by SV068 strain. The neutrophils and mononuclear cells recruitment were intensified after the infection and MK886 was able to inhibit neutrophil recruitment but enhanced mononuclear cells recruitment to the bronchoalveolar space. This was demonstrated before, but no statistical significance was observed ^[14]. In addition, we also found more NO production by infected with SV068 strain especially at 30 days after infection. This result can be associated with the mortality of the mice. An excessive increase in nitrite production at 30 days can result in apoptosis of immunocompetent cells present in the lung parenchyma, resulting in a decrease at 60 days maybe because apoptosis. This phenomenon could be responsible for the failure of defense mechanisms, resulting in death of the animals (Figure 11). The inhibition of effector mechanisms and/or apoptosis of immune cells induced nitrite have been showed previously ^[27, 28].

This work has limitations, which underscore areas requiring investigation in future studies. For example, whether MK886 treatment can decrease the CFU recovery, also the role of endogenous PGs and the role of caffeic acid *in vivo*. Also we will work on the molecular basis and the lipidomics of the *Mtb* strains and see if we can correlate with our results.

In summary, this work newly demonstrates a differential production of lipid mediators *in vitro* by the two strains used. Also we saw that SV068 (induces more LTB₄ production) seems to be more virulent than SV009 (induces more PGE₂ production) and the immune response against *Mtb* can be regulated by the lipid mediators depending on which kind of strain is involved in the infection. Future studies are in order to approach those aspects. The global problem of TB is still

huge and there are fundamental mechanisms to be elucidate, which can help to identify them with a goal to participate as a targets for treatments and prevention.

Acknowledgements

The authors are grateful to the São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant# 2009/01698-7)

Disclosures

The authors have no conflict of interests.

Figure Legends

Figure 1. Kinetics of nitric oxide and TNF- α from infected AMs infected SV009 or SV068 strain. We used 2×10^5 AMs per well and infected with the strains SV009 or SV068 at 1:1 (bacilli per cell) at 2, 6, 12 and 24 h. The concentration of TNF- α (A) and nitrite (B) were measured in the culture supernatant. Results were expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments, $P < 0.05$, * infected compared to the negative control and #SV009 vs. SV068.

Figure 2. LTB₄ and PGE₂ concentration in the supernatants of infected AMs with the two strains . We used 2×10^5 AMs per well and infected with SV009 and SV068 at 1:1 (bacilli per cell) during 24 h. The concentration of LTB₄ (A) and PGE₂ (B) were measured in the culture supernatant as described in *material and methods*, following the manufacturer's instructions. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 8) of two experiments with $P < 0.0001$ for * infected compared to the negative control and # SV009 vs. SV068.

Figure 3. MK886 treatment inhibits the production of LTB₄ but not PGE₂ by infected AMs with SV009 or SV068 strains. We used 2×10^5 AMs per well and they were treated with MK886 (0.1 and 1 μ M) during 30 minutes prior to infection with SV068 strain SV009 at 1:1 (bacilli per cell). After 24 h of infection LTB₄ (A) and PGE₂ (B) were quantified in the supernatant. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments with $P < 0.001$ compared to * infected to the uninfected and #MK886 to the vehicle.

Figure 4. Effect of caffeic acid on PGE₂ and LTB₄ production by infected AMs with *Mtb*. We used 2×10^5 macrophages and they were pretreated with caffeic acid (10 and μ 100 M) during 1 hour prior to infection with SV009 and SV068 at 1:1 (bacilli per cell) and maintained in

culture for the entire period (24 h). After 24 h of infection concentrations of LTB₄ (A) and PGE₂ (B) were quantified in the culture supernatants. As a negative control we used medium with 0.01% DMSO (vehicle). Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments with $P < 0.0001$, * infected to the uninfected control, # caffeic acid treatment relative to vehicle.

Figure 5. MK886 treatment does not alter the production of nitrite and TNF- α infected AMs SV009 or SV068 strains. We used 2×10^5 AMs which were and pretreated during 30 minutes with MK886 (0.1, 1 and 10 μ M) before infection with the SV068 and SV009 at 1:1 (bacilli per cell). After 24 h of infection nitrite (A) and TNF- α (B) were quantified in the supernatants. As a negative control treatment medium plus 0.01% DMSO was added to the cells (vehicle). Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments where $P < 0.05$ * infected to uninfected control.

Figure 6. Effect of caffeic acid on the production of nitrite and TNF- α by infected AMs with SV009 or SV068 strains. We used 2×10^5 AMs per well and caffeic acid treatment (10 and 100 μ M) remained during 24 h in culture during infection with SV009 and SV068 at 1:1 (bacilli / cell). After 24 h of infection TNF- α (A) and nitrite (B) were measured in the supernatants. As a negative control medium plus 0.01% DMSO was added to the cells (vehicle). Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments where $P < 0.05$, * infected to the uninfected control, # caffeic acid treatment relative to vehicle.

Figure 7. AMs phagocytosed more but kill less bacilli of SV068 Mtb strain. We used 2×10^5 AMs obtained from healthy Wistar rats, and they were infected with 2×10^5 FITC-labeled bacilli with H37Rv, SV009 and SV068 Mtb strains, incubated for 2 hours at 37 ° C, 5% CO₂ and

phagocytosis was determined. The results were expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5) of three experiments, where $P < 0.05$, * H37Rv and #SV009.

Figure 8. CFU recovered from infected AMs after treatment with MK886 and caffeic acid.

We used 2×10^5 per well and AMs were infected with SV009 and SV068 at 1:1 during 24 h. After lysis, the supernatant was plated on 7H11 agar solid. CFUs were recovered from AMs pretreated with MK886 (0.1 and 1 μ M) during 30 minutes prior to infection (A) and treated with caffeic acid (10 to 100 μ M) during one hour prior to infection (B). Results are expressed as mean $\pm$ SEM of one experiment in which each condition was performed in triplicate, and $P < 0.05$ for infected with *SV068 vs. SV009 and # treatments vs. vehicle.

Figure 9. MK886 treatment only decreases LBs formations in AMs infected with the strain

SV068. We used 2×10^5 AMs per well and treated with MK886 (0.1 and 1 μ M) 30 minutes prior to infection with SV068 and SV009 strains at 1:1 (bacilli per cell). After 24 h of infection the number of LBs were quantified by counting 100 cells per slide at a magnification with lens of 100X. As a negative control we used AMs adhered on coverslips in medium with 12:01% DMSO (vehicle). Results are expressed as the mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments, with $P < 0.05$, * infected to uninfected control, #MK886 treatment to vehicle and &SV068 vs. SV009.

Figure 10. Effect of treatment with caffeic acid in the LBs formation by AMs infected with

SV009 and SV068 strains. We used 2×10^5 AMs, and they were pretreated with caffeic acid (10, 100 and 500 μ M) during 1 hour prior to infection with SV009 and SV068 strains. The treatment remained during the whole period (24 h). Then, the number of LBs were determined by counting 100 cells per coverslip with an augment in the 100X objective. As a negative control

treatment was added to the wells medium plus 0.01% DMSO (vehicle). Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 4) of two experiments with $P < 0.05$ for infected ^{*}compared to control uninfected and [#]caffeic acid treatment compared to vehicle.

Figure 11. Survival curve of Balb/c mice infected with SV009 and SV068 strains of *Mtb* treated or not with MK886. BAL /c mice were infected were i.t. 1×10^5 SV009 and SV068 bacilli and the animals were observed until 80 days after infection (Figure 11). In B, the animals were infected with 1×10^5 SV009 bacilli and were treated or not with MK886 (5 mg/kg) and followed up to 60 days. In C, the mice were infected with 1×10^5 SV068 bacilli and were treated or not with MK886 (5 mg/kg) and followed up to 60 days. Results are expressed as mean $\pm$ SEM, where two experiments were combined with n = 12 (A) mice per group, where $P < 0.05$ ^{*}compared to strain SV009. In (B) and (C) the results are expressed as mean $\pm$ SEM, where two experiments were combined with n = 11 mice per group. $P < 0.05$ in (C) and in relation to ^{*}SV068 strain. The analysis of the survival curve was made by the log-rank test (Mantel-Cox test).

Figure 12. Bacterial load in the lungs and spleen of infected BALB/c mice with SV009 and SV068 strains. CFU recovered from lungs (A) and spleen (B) of BALB/c mice infected i.t. with 1×10^5 viable bacilli of the SV068 and SV009 after 30 and 60 days after infection. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 5) of two experiments, with $P < 0.05$, and ^{*}related to the SV009 strain.

Figure 13. Representative photomicrographs of BALB/c lung tissue stained with Hematoxylin &Eosin, Masson's Trichrome and Ziehl Neelsen 30 and 60 days after infection with *Mtb* strains. Histological sections of lung tissue obtained after 30 and 60 days post

infection with SV009 and SV068 strains. The board 1 refers to HE staining of mice lung tissue inoculated only with PBS, (B and D) sections of lung tissue from mice infected with SV009 and SV068 30 days post infection and (C and E) after 60 days of infection respectively. The board 2 refers to staining with GT of mice lung tissue inoculated only with PBS, (B and D) sections of lung tissue from mice infected with SV009 and SV068 30 days post infection and (C and E) after 60 days of infection respectively. The board 3 refers to the ZN staining, of mice tissue lung inoculated only with PBS, (B and D) sections of lung tissue from mice infected with SV009 and SV068 30 days after infection and (C and E) after 60 days of infection respectively. Images were acquired using Leica microscope equipped with DM5000B DFC500 digital camera (Leica Microsystems) with magnification 10X. For ZN pictures we used 100X magnification. Each photo is representative of groups with $n = 3$ animals for PBS group and $n = 5/6$ for infected groups of two independent experiments.

Figure 14. Kinetics of inflammatory cells recruitment to the bronchoalveolar space of mice infected with SV009 and SV068 strains of *Mtb*. Balb/c mice were infected with 1×10^5 viable bacilli with V009 and SV068 strains and the cells numbers recruited to the bronchoalveolar space were determined after 30 and 60 days post infection. Control mice received 100 μ L of sterile PBS. Results are expressed as mean $\pm$ SEM ($n = 6$) of two experiments, $P < 0.05$ * compared with the PBS group, # untreated group compared with MK886.

Figure 15. Nitric oxide produced in the lungs infected mice with the *Mtb* strains. Nitrite levels in lung homogenates of Balb/c mice with 1×10^5 viable bacilli of SV009 and SV068 strains after 30 and 60 days post infection. Control animals received 100 μ L of sterile PBS by i.t.

route. Results are expressed as mean $\pm$ SEM (n = 6) in two experiments where $P < 0.05$
* compared with the PBS group.

References

1. Koch, R., Die Ätiologie der Tuberkulose. Berliner Klinischen Wochenschrift., ed. Traduzido e editado por THOMAS D. BROCK. ASM Press. Vol. 15. 1882. 10.
2. 2011/2102, W.W.H.O.T.G.F. (2012) WHO Stop TB Dep. http://www.who.int/tb/publications/2011/factsheet_tb_2011.pdf
3. Mandavilli, A., A clash of cultures. Nat Med, 2007. 13(3): p. 268-70.
4. Bloom, B.R., Tuberculosis. Back to a frightening future. Nature, 1992. 358(6387): p. 538-9.
5. Meacci, F., et al., Drug resistance evolution of a Mycobacterium tuberculosis strain from a noncompliant patient. J Clin Microbiol, 2005. 43(7): p. 3114-20.
6. Bloom, B.R. and C.J. Murray, Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. Science, 1992. 257(5073): p. 1055-64.
7. Dye, C., et al., Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. JAMA, 1999. 282(7): p. 677-86.
8. Comstock, G.W., V.T. Livesay, and S.F. Woolpert, The prognosis of a positive tuberculin reaction in childhood and adolescence. Am J Epidemiol, 1974. 99(2): p. 131-8.
9. Vynnycky, E. and P.E. Fine, Lifetime risks, incubation period, and serial interval of tuberculosis. Am J Epidemiol, 2000. 152(3): p. 247-63.
10. Kleinnijenhuis, J., et al., Innate immune recognition of Mycobacterium tuberculosis. Clin Dev Immunol, 2011. 2011: p. 405310.
11. Pieters, J., Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. Cell Host Microbe, 2008. 3(6): p. 399-407.
12. Russell, D.G., et al., Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. Nat Immunol, 2009. 10(9): p. 943-8.
13. Funk, C.D., Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. Science, 2001. 294(5548): p. 1871-5.
14. Peres, C.M., et al., Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of Mycobacterium tuberculosis. Microbes Infect, 2007. 9(4): p. 483-9.
15. Peres-Buzalaf, C., et al., Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2011. 85(2): p. 75-81.
16. Medeiros, A.I., et al., Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. Infect Immun, 2004. 72(3): p. 1637-44.
17. Faccioli, L.H., et al., The accumulation of ¹¹¹In-eosinophils induced by inflammatory mediators, in vivo. Immunology, 1991. 73(2): p. 222-7.

18. Peres, C.M., et al., Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. *J Immunol*, 2007. 179(8): p. 5454-61.
19. Aronoff, D.M., C. Canetti, and M. Peters-Golden, Prostaglandin E2 inhibits alveolar macrophage phagocytosis through an E-prostanoid 2 receptor-mediated increase in intracellular cyclic AMP. *J Immunol*, 2004. 173(1): p. 559-65.
20. Soares, E.M., et al., Leukotriene B4 enhances innate immune defense against the puerperal sepsis agent *Streptococcus pyogenes*. *J Immunol*, 2013. 190(4): p. 1614-22.
21. Chan, J., et al., Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med*, 1992. 175(4): p. 1111-22.
22. Peres, C.M.F., F G; Soares, EM; Fontanari, C; Sorgi, C A; Rosada, R S; Soares, E G; Leão, S C; Silva, C L; Faccioli, L H, *Mycobacterial phospholipase C promotes exacerbated pulmonary inflammation and impaired clearance of Mycobacterium tuberculosis*. In submission, 2013.
23. Araujo-Santos, T., et al., *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E(2) production in murine macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010. 4(11): p. e873.
24. Pereira, P.T., BC; Secatto, A; Nicolette, R; Peres-Buzalaf, ' ; Ramos, SG; Sadikot, R; Bitencourt, CS, Faccioli, LH, Celecoxib Improves Host Defense through Prostaglandin Inhibition during *Histoplasma capsulatum* Infection. *Mediators Inflamm*, 2013. In press.
25. Secatto, A., et al., 5-Lipoxygenase deficiency impairs innate and adaptive immune responses during fungal infection. *PLoS ONE*, 2012. 7(3): p. e31701.
26. Shin, K.M., et al., Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Biochem Pharmacol*, 2004. 68(12): p. 2327-36.
27. Herbst, S., U.E. Schaible, and B.E. Schneider, Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS ONE*, 2011. 6(5): p. e19105.
28. Sharma, S., M. Sharma, and M. Bose, *Mycobacterium tuberculosis* infection of human monocyte-derived macrophages leads to apoptosis of T cells. *Immunol Cell Biol*, 2009. 87(3): p. 226-34.

ANEXO B- Trabalho publicado na revista “The Journal of Immunology”

Leukotriene B₄ Enhances Innate Immune Defense against the Puerperal Sepsis Agent *Streptococcus pyogenes*

This information is current as of April 16, 2013.

Elyara M. Soares, Katie L. Mason, Lisa M. Rogers, Carlos H. Serezani, Lucia H. Faccioli and David M. Aronoff

J Immunol 2013; 190:1614-1622; Prepublished online 16 January 2013;
doi: 10.4049/jimmunol.1202932
<http://www.jimmunol.org/content/190/4/1614>

-
- References** This article cites 66 articles, 43 of which you can access for free at:
<http://www.jimmunol.org/content/190/4/1614.full#ref-list-1>
- Subscriptions** Information about subscribing to *The Journal of Immunology* is online at:
<http://jimmunol.org/subscriptions>
- Permissions** Submit copyright permission requests at:
<http://www.aai.org/ji/copyright.html>
- Email Alerts** Receive free email-alerts when new articles cite this article. Sign up at:
<http://jimmunol.org/cgi/alerts/etoc>

The Journal of Immunology is published twice each month by
The American Association of Immunologists, Inc.,
9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814-3994.
Copyright © 2013 by The American Association of
Immunologists, Inc. All rights reserved.
Print ISSN: 0022-1767 Online ISSN: 1550-6606.

ANEXO C- Manuscrito submetido para a revista “Innate Immunity”

CD18 deficiency enhances susceptibility to *Histoplasma capsulatum* infection

Elyara M. Soares¹, Walter M. Turato¹, Adriana Secatto¹, Camila Peres-Buzalaf^{1,3}, Fabiani G. Frantz¹, Prsio R. Junior², Carlos A. Sorgi¹, Edson G. Soares², Alexandra I. de Medeiros⁴, David M. Aronoff⁵ and Lcia H. Faccioli^{1#}

¹*Faculdade de Cincias Farmacuticas de Ribeiro Preto, Universidade de So Paulo, 14040-903, Ribeiro Preto, So Paulo, Brasil.*

²*Faculdade de Medicina de Ribeiro Preto, Universidade de So Paulo, 14049-900, Ribeiro Preto, So Paulo, Brasil.*

³*Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de So Paulo, 17012-901, Bauru, So Paulo, Brasil.*

⁴*Faculdade de Cincias Farmacuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, 14801-902, Araraquara, So Paulo, Brasil*

⁵*Division of Infectious Diseases, the Department of Internal Medicine; Department of Microbiology and Immunology, Reproductive Sciences Program, The University of Michigan School of Medicine, Ann Arbor, MI 48109 USA.*

[#]Corresponding author

Lcia H. Faccioli

Faculdade de Cincias Farmacuticas de Ribeiro Preto, Universidade de So Paulo, 14040-903, Ribeiro Preto, So Paulo, Brasil

Telephone: 55 16 36024303. Fax: 55 16 36024725. E-mail: faccioli@fcfrp.usp.br

Keywords: CD18, *Histoplasma capsulatum*, Histoplasmosis, Leukotriene B₄ (LTB₄)

***ANEXO D- Manuscritos publicados, submetidos ou em preparação
nos quais sou colaboradora***

Contents lists available at ScienceDirect

Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids

journal homepage: www.elsevier.com/locate/plefa

Control of experimental pulmonary tuberculosis depends more on immunostimulatory leukotrienes than on the absence of immunosuppressive prostaglandins

C. Peres-Buzalaf^a, L. de Paula^a, F.G. Frantz^a, E.M. Soares^a, A.I. Medeiros^a, M. Peters-Golden^b, C.L. Silva^c, L.H. Faccioli^{a,*}^a Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. do Café s/n., Ribeirão Preto, São Paulo 14040-903, Brazil^b Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Health Systems, Ann Arbor, MI, USA^c Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. Bandeirantes 3900, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 March 2010
Received in revised form
11 April 2011
Accepted 20 April 2011

Keywords:
Mycobacterium tuberculosis
Prostaglandins
Leukotrienes
Cytokines
Immune modulation

ABSTRACT

Prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs) are produced in *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb)-infected lungs and have immune suppressive and protective effects, respectively. Considering that both of these mediators are produced during mycobacterial infection, we investigated the specific and relative biological importance of each in regulating host response in experimental tuberculosis. Administration of celecoxib, which was found to reduce lung levels of PGE₂ and increase LTB₄, enhanced the 60-day survival of Mtb-infected mice in 14%. However administration of MK-886, which reduced levels of LTB₄ but did not enhance PGE₂, reduced 60-day survival from 86% to 43% in Mtb-infected mice, and increased lung bacterial burden. MK-886 plus celecoxib reduced survival to a lesser extent than MK-886 alone. MK-886- and MK-886 plus celecoxib-treated animals exhibited reduced levels of the protective interleukin-12 and gamma-interferon. Our findings indicate that in this model, the protective effect of LTs dominates over the suppressive effect of PGs.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The facultative intracellular acid-fast bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) is a major human pathogen that infects a third of the world's population and is responsible for ~2 million deaths each year [1]. Murine models of tuberculosis demonstrate that the outcome of this disease is determined by the nature (i.e., Th1 or Th2 cells) and magnitude of the T-cell and cytokine response. Th1-mediated immunity plays a crucial role in host defense against Mtb. Cytokines such as IL-12, IFN- γ , and TNF are essential for protection against this pathogen in the mouse model [2–5], while *in vitro* reduced IL-10 production is associated with resistant human disease [6].

Besides cytokines, eicosanoid lipid mediators derived from phospholipase-released arachidonic acid (AA) have been shown to greatly influence the host defense against Mtb. They include prostaglandins (PGs) and leukotrienes (LTs), which are involved in numerous homeostatic biological functions and inflammation [7].

Whereas both leukocytes and structural cells synthesize prostanooids, LT synthesis is confined primarily to cells of myeloid origin, by the action of cyclooxygenase (COX) isozymes and 5-lipoxygenase (5-LO) [8,9]. In particular, COX-derived prostaglandin E₂ (PGE₂) was shown to be highly expressed in the lungs during the late phase of tuberculosis and its inhibition resulted in the control of infection [10]. PGE₂ inhibits a variety of antimicrobial functions, including phagocytosis [11], bacterial killing [12], and the production of nitrite and Th1 cytokines, such as IL-1 and TNF- α by macrophages [13] and IL-2 and IFN- γ by lymphocytes [14]. Moreover, PGE₂ inhibits IL-12 production by antigen-presenting cells stimulated with LPS, but increases IL-10 production [15,16]. On the other hand, a study from our group has shown that *in vivo* reduction of endogenous LT synthesis increases susceptibility to mycobacterial infection [17]. This is consistent with increasing recognition of LTs and particularly leukotriene B₄ (LTB₄) as an important mediator in host defense against different pulmonary infectious agents [18–21].

Since PGE₂ and LTB₄ are both produced *in vivo* during infection by Mtb and seem to have opposite effects on antimicrobial defense mechanisms, it is of interest to understand the relative importance of each in regulating the immune response. To

* Corresponding author. Tel.: +55 16 3602 4303; fax: +55 16 3602 4725.
E-mail address: faccioli@fcp.usp.br (L.H. Faccioli).

Differential LTB₄ production and BLT₁ expression are associated with susceptibility and resistance to histoplasmosis

Adriana Secatto¹; **Elyara Maria Soares¹**; Gisele Aparecida Locachevic¹; Patricia Aparecida de Assis¹; Francisco Wanderlei Garcia Paula-Silva^{1,2}; Alexandra Ivo de Medeiros³ and Lúcia Helena Faccioli¹

¹Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Avenida do Café s/n, São Paulo, Brazil. ²Departamento de Odontopediatria, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Avenida do Café s/n, São Paulo, Brazil. ³Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rodovia Araraquara/Jau Km 1, Araraquara, São Paulo, Brazil.

Key words: *Histoplasma capsulatum*; leukotriene B₄; BLT₁ receptor

Corresponding Author:

Lúcia Helena Faccioli

Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Av. do Café, s/n – Monte Alegre – Ribeirão Preto

Phone: 55-16-3602-4303

Fax: 55-16-3602-4725

e-mail: faccioli@fcfrp.usp.br

Mycobacterial phospholipase C promotes exacerbated pulmonary inflammation and impaired clearance of *Mycobacterium tuberculosis*

Running title: Mycobacterial Plc-induced impaired host defense

Camila Matias Peres¹, Fabiani Gai Frantz¹, **Elyara Maria Soares¹**, Caroline Fontanari¹, Rogério Silva Rosada², Carlos Artério Sorgi¹, Édson Garcia Soares³, Sylvia Cardoso Leão⁴, Marc Peters-Golden⁵, Célio Lopes Silva², Lúcia Helena Faccioli¹

¹*Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto;* ²*Departamentos de Bioquímica e Imunologia e* ³*Patologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil;* ⁴*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de São Paul, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil;* ⁵*Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, University of Michigan Health Systems, Ann Arbor, Michigan*

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). (grant 03/130792) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (DECIT/CNPq 25/2006)

Reprints or correspondence: Dr. Lúcia Helena Faccioli, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Tel +55-16-3602-4303; fax: +55-16-3602-4725, Av. do Café, s/n, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil (faccioli@fcfrp.usp.br)

Leukotriene B₄ drives host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* infection

Short title: Mycobacterial susceptibility and lipid mediators

Fabiani Gai Frantz¹, Carlos Arterio Sorgi¹, Rogério Silva Rosada², Caroline Fontanari¹, **Elyara Maria Soares**¹, Alyne Fávero Galvão¹, Claudia S. Bitencourt¹, Karina Furlani Zoccal¹, Izaíra Brandão², Ana Paula Masson², Simone Gusmão Ramos⁴, Célio Lopes Silva², Lúcia Helena Faccioli^{1*}

¹Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; ²Departamentos de Bioquímica e Imunologia e Departamento de Patologia³ da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

* Corresponding author: Dr. Lúcia Helena Faccioli.

Adress: Av Cafe, s/n – Ribeirão Preto, SP – Brazil; Fax: +55 16 3602 4725; Phone: +55 -16 3602 4303

Email: faccioli@fcrp.usp.br

The dual effect of paradoxical sleep deprivation on murine macrophage-dependent functions *in vitro* and *in vivo*

Anderson Sá-Nunes^{1,*}, Bruna Bizzarro¹, Flávia Egydio², Michele S. Barros¹, Renata Sesti-Costa³, **Elyara M. Soares⁴**, Adriana Pina¹, Momtchilo Russo¹, Vera L. Calich¹, João S. Silva³, Lúcia H. Faccioli⁴, Sergio Tufik², Monica L. Andersen^{4,*}

¹*Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo - SP, Brazil.*

²*Departamento de Psicobiologia, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo - SP, Brazil.*

³*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brazil.*

⁴*Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto - SP, Brazil.*

*Corresponding authors:

Address correspondence and reprint requests:

Anderson Sá-Nunes. Email: sanunes@usp.br

Av. Prof. Lineu Prestes 1730 – ICB IV, Cidade Universitária. São Paulo, SP 05508-900, Brazil.

Phone: +55-11-3091-7487; Fax: +55-11-3091-7224

Monica L. Andersen. Email: mandersen@unifesp.br

Rua Napoleão de Barros 925, Vila Clementino, São Paulo SP XXXXX-XXX, Brazil.

Phone: +55-11-2149-0155; Fax: +55-11-5572-5092