PRISCILIA AGUILAR RAMIREZ

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DESENVOLVIDO PELO GENE
Slc11a1 NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DURANTE A
INDUÇÃO DE RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2012

PRISCILIA AGUILAR RAMIREZ

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DESENVOLVIDO PELO GENE
Slc11a1 NA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DURANTE A
INDUÇÃO DE RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Starobinas

Versão original

São Paulo
2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Aguilar Ramirez, Priscilia.

Avaliação do papel desenvolvido pelo gene *Slc11a1* na ativação de macrófagos durante a indução de respostas inflamatórias / Priscilia Aguilar Ramirez. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Nancy Starobinas.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunologia.

Versão do título para o inglês: Role of *Slc11a1* gene in macrophage activation during inflammatory response.

1. Macrófagos 2. Inflamação 3. Gene *Slc11a1* 4. *M. bovis* BCG 5. Tioglicolato I. Starobinas, Profa. Dra. Nancy II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB085/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Priscilia Aguilar Ramirez.

Título da Tese: Avaliação do papel desenvolvido pelo gene *Slc11a1* na ativação de macrófagos durante a indução de respostas inflamatórias.

Orientador(a): Profa. Dra. Nancy Starobinas.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **46** nas fls. **69** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Nancy Starobinas, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Avaliação do papel desenvolvido pelo gene SLC11a1 na ativação de macrófagos durante a indução de uma reação inflamatória** do qual participou(aram) o(s) alunos **Priscilia Aguilar Ramirez e os pesquisadores Olga Célia Martínez Ibañez, Wafa Hanna Koury Cabrera, Marcelo De Franco, Orlando Garcia Ribeiro Filho**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **05.05.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 06 de maio de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação do papel desenvolvido pelo gene *SLC11a1* na ativação de macrófagos durante a indução de uma reação inflamatória", protocolo nº 608/09, sob a responsabilidade de Nancy Starobinas e Priscilia Aguilar Ramirez, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 13/05/2009.

We certify that the research entitled "Evaluation of the role of gene *SLC11a1* in activation of macrophages during induction of acute inflammation reaction", protocol nº 608/09, under the responsibility of Nancy Starobinas and Priscilia Aguilar Ramirez, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 05/13/2009.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
05/2009 – 09/2012 Laboratório de Imunogenética	Total = 144/ camundongos AIRMax, AIRMax ^{RR} , AIRMax ^{SS} , AIRmin ^{RR} , AIRmin ^{SS}

São Paulo, 13 de Maio de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

**A Ricardo, meu amor e amigo,
presente em todo momento.**

AGRADECIMENTOS

A meu amado esposo Ricardo, presente em todo momento, celebrastes as minhas alegrias e choraste comigo minhas penas, sempre apoiando-me e incentivando-me. Obrigada por ser meu amor, meu amigo, meu cúmplice e sobretudo por querer formar uma família comigo. Te amo.

A mi mama Aicia e a mi papa Alexander, gracias por creer em mi, ustedes formam uma parte importante de mi corazón. Tu y mi papa me dieron las herramientas para seguir en esta vida, enseñandome que frente a todo, uno tiene que luchar por sus sueños, los amo mucho y los extraño. Gracias por todo.

Alicia, Peter y Nova gracias por todos estos años compartidos, a veces me acuerdo cuando eramos niños, cuando jugabamos en casa compartiendo hasta el último caramelito encontrado en el sofá. Los extraño tanto, no saben como sueño em encontrarme de nuevo com uds, los amo mucho. A mi querido Fabiancito, el famoso chinito por devolver la alegría a mi casa, por ser um niño bueno y travieso.

Nancy Starobinas (minha orientadora), obrigada pela oportunidade. Você me deu a oportunidade de fazer meu doutorado mesmo sem me conhecer. Obrigada pela paciência, boa vontade, sapiência e carinho. Obrigada Pela grande ajuda na correção da tese, pela sua disposição condicional e por todos esses anos de trabalho.

Dra. Olga Ibañez pela grande ajuda na correção deste trabalho e, sobretudo pela sua disposição incondicional.

Aos amigos pesquisadores do laboratório de Imunogenética:, Monica Spadafora pela ajuda no analise do FACS, Orlando Garcia Ribeiro, Marcelo de Franco, Waffa Cabrera, Solagne Carbonare, Zé Ricardo, Andrea, Milene de Franco e Solagne Massa por todos esses anos de amizade e convívio.

A minha orientadora de mestrado Lourdes Isaac, por todos os ensinios repassados para mim. Obrigada Lou, aprendi muito com você.

Aline, minha pequena xuxuzinha, obrigada pela nossa amizade, pela grande ajuda nos dias de experimento, você se converteu em muitas ocasiões na minha mão direita e esquerda, na minha conselheira sentimental e espiritual, obrigada por todo amiga.

Priscila-Lara, Cristiano, Mara, Thais e Lilian pelos lindos momentos compartilhados na nossa querida mesa de trabalho, trabalhamos, pensamos e rimos juntos. Obrigada.

A Alessandra e Andressa, obrigada pela amizade, pelos lindos momentos compartilhados tanto no laboratório como fora dele. Alessandra, obrigada por me socorrer todas as vezes que precisei. Andressa, muitas vezes você até deixou de almoçar por ficar comigo nos dias de experimento, a vocês duas a minha eterna gratidão.

Aos amigos do Laboratório de Imunogenética: Marcela, Renata, Layra, Jussara, Tatiane, Mariana e Iana pelos momentos compartilhados, agradeço muito a todos vocês pelos contínuos momentos de alegria, descontração, união, cumplicidade e amizade que passamos juntos.

Aos funcionários do Laboratório de Imunogenética: Sandra pela sua amizade e os conselhos valiosíssimos que sempre deu para mim. A Mara, Neusa, Tânia, Ronaldo e Manu pelo convívio e a grande ajuda na preparação dos materiais.

Não posso negar dentro do meu coração o quanto amo a todos vocês, sem dúvida vocês juntos tornaram esta jornada em uma etapa muito linda da minha vida, os amo.

Aos funcionários do Biotério do Laboratório de Imunogenética: Rosa, Marinalva, Joel, Celso, Luis Hilario, Marinalva, Manuel e Aline, pelo cuidado com os animais sem os quais este trabalho não seria realizado e pelas rodas de samba que compartilhe com vocês.

A todos os professores de todas as disciplinas que cursei tanto no ICB como no Instituto Butantan.

Obrigada a todos os professores do Instituto de Ciências Biomédicas em especial à Coordenadoria da Pós Graduação: à professora Maria Regina D' Imperio Lima e ao professor Gustavo Pessini Amarante Mendes pelo voto de confiança e por todo o auxílio financeiro.

Obrigada a todos os funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas: Amarildo (*in memorian*), Maria Eni, Amanda, Jotelma, Thiago e Otacilio.

A meus amigos da biblioteca do ICB, que praticamente desde que cheguei ao Brasil, sempre me auxiliaram. Não quero mencionar nomes, porque não lembro o nome de todos vocês, mas sem dúvida agradeço sua boa vontade para comigo e a sua amizade, obrigada.

À Mônica pela correção de minha dissertação

Quero agradecer em especial às pessoas de me ajudaram com alguns dos experimentos, abrindo as portas de seus laboratórios, emprestando seus materiais e equipamentos, bem como o próprio tempo em meu auxílio. Muito obrigada a Dúnia Rodriguez e Luciana Leite do Laboratório Biotecnologia do Instituto Butantan pela grande ajuda neste trabalho, não somente cedendo a bactéria, mas também pela grande ajuda nos

ensaios de sobrevivência e na fagocitose. Da mesma forma agradeço à colega de bancada Iana pela ajuda fornecida na técnica do FACS.

A meus amigos peruanos sejam ou não villarrealinos pelos anos de amizade e de sempre torcer um pelo outro. Agradeço a Julio “el tigre” pela amizade, a Juan e Erica, a Paola e Cesar, a Cesty e Eric por nos acolher quando chegamos ao Brasil, a Glenda e Miguel, a Marcos e sobretudo ao Nilton pela amizade e sobretudo pela oportunidade. Não quero esquecer-me de todos os peruanitos nascidos no Brasil como Miguelito, Diogito, Sofia, Juancito y el bebito de Cesty. A meus amigos do CRUSP: a minha querida Vivi, a Miryam, Lili y Jesus pelos momentos de alegria compartilhados. A Raul e Drica pela amizade e sobretudo pela lealdade. A minha querida Zilda.

No puedo negar dentro de mi corazón que todos ustedes se convirtieron en mi familia aquí en el Brasil.

“Para os erros há perdão; para os fracassos, chance; para os amores impossíveis, tempo. De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar a alma. O romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance. Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu”.

Luis Fernando Veríssimo

RESUMO

AGUILAR-RAMIREZ, P. **Avaliação do papel desenvolvido pelo gene *Slc11a1* na ativação de macrófagos durante a indução de respostas inflamatórias.** 2012. 102 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O gene *Slc11a1* é descrito como um dos envolvidos na resistência contra *S. enterica* Typhimurium, *L. donovani* e *M. tuberculosis*. Sublinhagens de camundongos AIRmax e AIRmin homozigotas para os alelos R e S do gene *Slc11a1* (AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}) foram utilizadas neste trabalho para avaliar o efeito dos alelos deste gene na ativação de macrófagos peritoneais (MΦ), induzida pelo tioglicolato (TIO) ou pela infecção pelo *M. bovis* BCG. O TIO induziu baixa ativação com reduzida migração celular, síntese basal de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e citocinas em todas as sublinhagens avaliadas. No entanto, após estímulo com LPS *in vitro* os macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} produziram maiores quantidades de NO, IL-1β, IL-12 e TNF-α. A citocina IL-10 foi secretada preferencialmente pelas células das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Estes resultados mostraram que na inflamação com o TIO, a ativação do MΦ após adição de LPS, foi dependente do fundo genético selecionado nos animais AIRmax, independente do alelo presente no gene *Slc11a1*. Na infecção com BCG, a sublinhagem AIRmax^{RR} foi a única capaz de controlar a proliferação da bactéria, secretando altos níveis de IL-1β, IL-12, TNFα e IL-6 que ativam o macrófago. Por outro lado, as células dos animais AIRmin^{SS} susceptíveis à infecção produziram maiores concentrações de NO, H₂O₂ e IL-10, mostrando que tanto o fundo genético para alta ou baixa resposta inflamatória, quanto os alelos do gene *Slc11a1* interferem na resistência à infecção. Concluímos assim que os MΦ dos animais AIRmax^{RR} são ativados de forma eficiente para matar as bactérias, secretando para isso citocinas que ativam a resposta imune.

Palavras-chave: Macrófagos. Inflamação. Gene *Slc11a1*. *M. bovis* BCG. Tioglicolato.

ABSTRACT

AGUILAR-RAMIREZ, P. **Role of *Slc11a1* gene in macrophage activation during inflammatory response.** 2012. 102 p. Ph. D. thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The *Slc11a1* gene regulates resistance against *S. enterica* Typhimurium, *L. donovani* and *M. tuberculosis*. AIRmax and AIRmin mouse sublines, homozygous for *Slc11a1* R and S alleles (AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} and AIRmin^{SS}) were used in this work to evaluate the effect of this gene in peritoneal macrophage (MΦ) activation induced by thioglycollate (TIO) or *M. bovis* BCG infection. TIO induced weak cellular activation, with reduced migration, basal synthesis of hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) and cytokines in all sublines tested. After *in vitro* LPS stimulation, AIRmax^{RR} and AIRmax^{SS} macrophages produced higher amounts of NO, IL-1β, IL-12 and TNF-α than those of AIRmin sublines. IL-10 was preferably secreted by AIRmin MΦ, independent of *Slc11a1* alleles. These results indicate that inflammation and MΦ activation induced by TIO were dependent on the genetic background for acute inflammatory response, while *Slc11a1* alleles have little effect on this phenotype. In BCG infection only AIRmax^{RR} mice were capable of controlling bacterial proliferation, which was accompanied with high levels of IL-1β, IL-12, TNF and IL-6 produced by activated macrophages. On the other hand, susceptible AIRmin^{SS} mice produced higher amounts of NO, H₂O₂ and IL-10 suggesting that both inflammatory background and *Slc11a1* alleles interfere on resistance to BCG infection. Thus, we conclude that the high inflammatory response associated to *Slc11a1* R alleles (in AIRmax^{RR} mice) are mechanisms for efficient bacterial killing, through production of cytokines by MΦ which activates the immune response.

Keywords: Macrophages. Inflammation. Gene *Slc11a1*. *M. bovis* BCG. Thioglycollate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Heterogeneidade de monócitos/macrófagos e células dendríticas durante a diferenciação <i>in vivo</i>	23
Figura 2 - Interações e sinalizações durante a fagocitose de microrganismos.....	27
Figura 3 - Presença ou ausência dos genes na região RD1 em mycobactérias.....	30
Figura 4 - Organização genômica do gene <i>Nramp</i> em camundongos.....	32
Figura 5 - A proteína Slc11a1 vista a partir do citosol ou fagolisossomo.....	33
Figura 6 - Divergência fenotípica da resposta inflamatória aguda.....	37
Figura 7 - Curva padrão das citocinas recombinantes utilizadas nos diversos ensaios de ELISA.....	49
Figura 8 - Integridade do RNA total dos macrófagos pertencentes aos camundongos AIRmax e AIRmin contendo os alelos de resistência e susceptibilidade do gene <i>Slc11a1</i>	51
Figura 9 - Avaliação do grau de infecção (dose 10^6) através da contagem das Unidades Formadoras de colônia (UFC) no baço.....	56
Figura 10 - Avaliação do grau de infecção (dose 10^4) através da contagem das Unidades Formadoras de colônia (UFC) no baço.....	57
Figura 11 - Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos de animais AIRmax ^{RR} e AIRmin ^{SS}	58
Figura 12 - Migração celular induzida pelo <i>M. bovis</i> BCG e tioglicolato no peritônio de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS}	59
Figura 13 - Análise fenotípica das diversas populações de macrófagos encontradas no peritônio.....	61
Figura 14 - Número absoluto de cada um dos tipos celulares na cavidade peritoneal com fenótipo F480 ^{hi} CD11b ^{hi} CD11c ⁻ e F480 ^{lo} CD11b ^{hi} CD11c ⁻	62
Figura 15 - Liberação de H ₂ O ₂ pelas células peritoneais dos animais tratados com tioglicolato ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	63
Figura 16 - Secreção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} estimulados com tioglicolato ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	65
Figura 17 - Quantificação das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12 (C) secretadas por macrófagos dos camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} estimulados com tioglicolato ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	67

Figura 18 - Quantificação de TNF- α (A) e IL-10 (B) por macrófagos dos camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} tratados com tioglicolato e infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	69
Figura 19 - Expressão relativa dos genes <i>il-1β</i> (A), <i>il-6</i> (B), <i>il-12</i> (C), nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} tratados com tioglicolato e infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	71
Figura 20 - Expressão relativa dos genes <i>tnf-α</i> (A), <i>il-18</i> (B), <i>tgf-β</i> (C) nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} tratados com tioglicolato ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	73
Figura 21 - Expressão relativa dos genes <i>il-10</i> (A), <i>ifn-γ</i> (B) e <i>il-4</i> (C) nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} tratados com tioglicolato ou infectados com <i>M. bovis</i> BCG.....	75
Figura 22 - Expressão relativa dos genes (A) <i>icam</i> e (B) <i>ccr5</i> nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax ^{RR} , AIRmin ^{RR} , AIRmax ^{SS} e AIRmin ^{SS} injetados com <i>M. bovis</i> BCG.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Distribuição dos alelos do gene <i>Slc11a1</i> nas oito linhagens isogênicas que compuseram o F0 da seleção AIR.....	38
Quadro 2 - Sequências de <i>primers</i> utilizados em ensaios de PCR em tempo real.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	aminoácido
AIR	reação inflamatória aguda
AIRmax	linhagem de camundongos selecionados para a máxima resposta inflamatória aguda
AIRmin	linhagem de camundongos selecionados para a mínima resposta inflamatória aguda
BCG	<i>Micobacterium bovis</i> BCG
cDNA	DNA complementar
con-A	conavalina A
GM-CSF	unidade formadora de colônia de granulócito e macrófago
GAPDH	gliceraldeído fosfato deshidrogenase
Ibut-AIRH	AIRmax
Ibut-AIRL	AIRmin
IL-1 β	interleucina 1 beta
IL-4	interleucina 4
IL-6	interleucina 6
IL-10	interleucina 10
IL-12p40	interleucina 12 subunidade 40
IFN- γ	interferon gama
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
LPS	lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MBL	lectina ligado a manose
Proteínas de complemento	C1q, C4b, C3b e iC3b
MHC-II	Complexo principal de histocompatibilidade tipo 2
MIP-1 α	<i>macrophage inflammatory protein-1α</i>
NK	células Natural killer
Nramp	<i>Natural resistance-associated macrophage protein</i>
NO	óxido nítrico
nt	nucleotídeos
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TGF- β	fator de transformação de crescimento beta
PAF	<i>phospholipid platelet-activating factor</i>
PBS	salina tamponada com fosfato
RNA	ácido ribonucléico
Slc11a1	<i>solute carrier family 11a member 1</i>

TIO	tioglicolato
TMB	tetrametilbenzidina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Macrófagos	22
1.2 Fagocitose	25
1.3 <i>Mycobacterium</i> sp.	28
1.3.1 Fagocitose de espécies do gênero <i>Mycobacterium</i>	29
1.3.2 Vacina Bacille Calmette-Guerin – BCG	29
1.4 Gene <i>Slc11a1</i> (solute carrier family 11a member 1)	31
1.4.1 Ativação de macrófagos que contêm o gene <i>Slc11a1^{RR}</i> e <i>Slc11a1^{SS}</i> com espécies do gênero <i>mycobacterium</i> sp.	34
1.5 Camundongos <i>AIRmax</i> e <i>AIRmin</i> e as sublinhagens homozigotas para os alelos <i>Slc11a1^{RR}</i> e <i>Slc11a1^{SS}</i>	36
2 OBJETIVOS	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Animais	44
3.2 Estimulação com Tioglicolato	44
3.3 Infecção com <i>M. bovis</i> BCG	44
3.4 Avaliação do grau de infecção	45
3.5 Células	45
3.6 Citometria de Fluxo	45
3.7 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)	46
3.8 Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	46
3.9 Fagocitose	47
3.10 Determinação da produção de citocinas inflamatórias por ELISA	47
3.11 Extração de RNA total	50
3.12 Síntese de DNA complementar (cDNA)	51
3.13 PCR em tempo real (qPCR)	51
3.14 Análise dos Resultados	53
4 RESULTADOS	54
4.1 Infecção com <i>Mycobacterium bovis</i> BCG	55
4.2 Fagocitose	57
4.3 Resposta Inflamatória	58

4.3.1 Migração celular.....	59
4.3.2 Análise fenotípica das diferentes populações celulares encontradas no peritônio ..	60
4.3.3 Liberação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	62
4.4 <i>Ativação dos macrófagos da cavidade peritoneal</i>	63
4.4.1 Secreção de óxido nítrico (NO)	63
4.4.2 Secreção de citocinas.....	65
4.4.3 Expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em macrófagos peritoneais por PCR em Tempo Real (qPCR)	69
5 <i>DISCUSSÃO</i>	78
6 <i>CONCLUSÕES</i>	92
<i>REFERÊNCIAS</i>	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Macrófagos*

Em vertebrados, os macrófagos têm sua origem nas células precursoras do saco vitelínico migrando para o fígado, baço e medula óssea antes e logo após o nascimento. Nos indivíduos adultos, essas células derivam de uma célula pluripotente mielóide presente na medula óssea, que na presença de GM-CSF modifica-se para pro-monócito. Os pró-monócitos dão origem aos monócitos que ao sair da medula óssea entram na circulação sanguínea por um período de aproximadamente três dias, momento no qual deixam de se chamar monócitos e passam a ser denominados de macrófagos circulantes. Os macrófagos ao migrarem para os diversos tecidos se diferenciam, formando uma população de macrófagos residentes. Macrófagos peritoneais (cavidade peritoneal), células de Kupfer (fígado) e micróglia (sistema nervoso central), células de Langerhans (epidermes) são tipos de macrófagos residentes que se diferenciaram pelos sinais específicos de cada tecido (produtos secretados próprios do tecido, das células vizinhas e da matriz extracelular) (GORDON, 2003), assim como pelo tipo de receptores encontrados na sua superfície (**Figura 1**), com tempo de vida que varia entre dois e quatro meses (NELSON et al., 1990; NEVEU, 1996).

A migração dos leucócitos sanguíneos para os diversos tecidos lesados possibilita o acesso dessas células ao tecido injuriado. Na migração de leucócitos propriamente dita, as células que se encontram no centro da corrente sanguínea saem do fluxo central vascular à periferia do vaso sanguíneo. O rolamento e aderência (espraiamento) dos leucócitos no endotélio vascular são processos que acontecem imediatamente depois. A inserção dos leucócitos entre as junções das células endoteliais são processos que permitem que o leucócito migre do endotélio vascular até o espaço extravascular (LANGER; CHAVAKIS, 2009; LAWRENCE; SPRINGER, 1991).

Figura 1 - Heterogeneidade de monócitos/macrófagos e células dendríticas durante a diferenciação *in vivo*.

Monócitos circulantes que dão origem aos macrófagos residentes e aos macrófagos inflamatórios já apresentam fenótipos distintos, assim como os receptores de macrófagos e células dendríticas que diferem segundo os tecidos em que se encontram. Antígenos entre parêntesis correspondem a células humanas, todos os demais a estudos de células murinas.

FONTE: (TAYLOR et al., 2005).

Khandoga et al. (2009) investigaram a adesão leucocitária e migração intersticial dos leucócitos durante o processo de migração *in vivo*; provando que, as proteínas quimiotáticas (MIP-1 α e PAF) induzem o aumento da aderência dos leucócitos na vênula e a rápida transmigração dos leucócitos ao tecido injuriado. Ao avaliar a morfologia da célula, mostraram que MIP-1 α e PAF induzem nos leucócitos contrações no seu citoesqueleto, formações de lamelipódios e uma conformação final alongada indicando a preparação da célula para a transmigração.

Devido à sua abundância, assim como à sua distribuição pelos diferentes tecidos no organismo, as quimiocinas derivadas dos macrófagos residentes são responsáveis pela migração de neutrófilos ao sítio injuriado (FERREIRA, 1980). A capacidade de ativação dos macrófagos influencia os diversos aspectos da resposta imune tanto na injúria tecidual como na resposta inflamatória (LASKIN; PENDINO, 1995).

Geissmann, Jung e Litman (2003), mediante a transferência adotiva de monócitos sanguíneos marcados com GFP (*Green fluorescent protein*) para camundongos recipientes, diferenciaram diversas populações de leucócitos sanguíneos *in vivo*. Monócitos sanguíneos provenientes dos camundongos (RAG2^{-/-}CX₃CR1^{gfp/+}CD45.2⁺C57BL/6) foram transferidos a camundongos recipientes (CD45.1⁺C57BL/6), 6 horas após a indução da inflamação com tioglicolato. O exudado da cavidade peritoneal, lavado broncoalveolar e sangue periférico foram extraídos e analisados. As duas populações encontradas diferenciaram-se entre si pela funcionabilidade e pelas proteínas presentes nessas células sendo classificadas em: “monócitos inflamatórios” (CX₃CR1^{low}CCR2⁺GR1), uma população celular de vida curta, que expressam CD62L (L-selectina), Ly6C/G (Gr1), α2 e α4 integrinas (VLA2, VLA4), LFA1 e CCR2, sendo altamente responsivos e ativamente recrutados para os tecidos inflamados e os “monócitos residentes” de vida longa (CX₃CR1^{high}CCR2⁻GR1), localizados em diversos tecidos que somente expressam LFA1 e VLA4.

Bou Ghosn et al. (2010), encontraram duas populações de macrófagos localizadas no peritônio dos camundongos C57BL/c denominados LPM - *Large Peritoneal Macrophage* (CD11b^{high}/F480^{high}/I-A⁻/Gr1^{inter}) e SPM - *Small Peritoneal Macrophage* (CD11b^{inter}/F480^{inter}/I-A^{high}/Gr1⁻), sendo que somente as células SPM expressam moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (I-A). Funcionalmente, ambas as células fagocitam ativamente *E. coli*. Na estimulação *in vitro* com LPS, somente as células LPM secretaram grandes quantidades de óxido nítrico (NO), entretanto, na estimulação *in vivo* com LPS, ambas as células produzem NO. Experimentos que avaliaram fenótipos das células peritoneais mostraram que o LPS ou o tioglicolato induziram a diminuição de células LPM e o aumento de células SPM, quando comparados com os animais não estimulados.

A ativação dos macrófagos desencadeia a síntese de citocinas, que por sua vez desencadeiam diversas respostas imunológicas. As citocinas IL-1β e TNF-α induzem no endotélio vascular a expressão das moléculas de adesão VCAM-1 e ICAM-1. A expressão dessas moléculas por sua vez induz o recrutamento dos leucócitos para o foco inflamatório (TOSI, 2005). Os macrófagos ao sintetizarem IL-12, induzem neles mesmos a síntese e liberação de reativos de nitrogênio (STUEHR; MARLETTA, 1985), substâncias reativas de oxigênio (DRATH; KARNOVSKY, 1975), peróxido de hidrogênio (NATHAN; ROOT, 1977) e radicais de hidroxila (WEISS; KING; LOBUGLIO, 1977) no fagolisossomo, assim como a secreção de citocinas, favorecendo uma contínua retroalimentação positiva do sistema imune (SCHINDLER, 2001). A secreção de IL-2 por parte dos macrófagos induz nos

linfócitos Th1 (*T helper 1*) e células NK (*Natural killer*) a secreção de IFN- γ , que a sua vez induz nos macrófagos aumento na expressão do complexo principal de histocompatibilidade de classe II, assim como o aumento das moléculas de membrana B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) que auxiliam no desenvolvimento de funções efectoras próprias do macrófago. A conseqüente apresentação é um processo regulado na imunidade inata que constitui a ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (VILLACRES-ERIKSON, 1995).

Além da migração celular, fagocitose, processamento antigênico e apresentação de antígenos aos linfócitos T, os macrófagos também auxiliam na remoção do *debris* celular e de antígenos nos processos inflamatórios. No remodelamento tecidual sintetizam fibronectina (TSUKAMOTO; HELSEL; WAHL, 1981), e trombospondina (JAFFE; RUGGIERO; FALCONE, 1985) que formam parte da matriz extracelular.

1.2 Fagocitose

A fagocitose é um mecanismo próprio da imunidade inata que induz a ativação da resposta imune adaptativa. As diversas estratégias utilizadas pelas células para a internalização de solutos, partículas, bactérias e/ou células são classificadas segundo o tamanho, a natureza da partícula ingerida e até pelas modificações que ocorrem na membrana da célula que realiza a ingestão. A pinocitose refere-se à ingestão de fluidos e solutos através de invaginações vesiculares na membrana celular. A endocitose mediada pelo receptor difere da pinocitose no tamanho do produto ingerido, havendo ingestão de macromoléculas, vírus e pequenas partículas. Em ambos os processos a ligação de moléculas extracelulares com os receptores na membrana celular denominados de clatrininas, causam depressões na membrana celular que aumentam até a formação de um vacúolo rodeado de clatrina, indicando a não polimerização de actina no citosol (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Ambos os processos diferem da fagocitose pelo tamanho da partícula ingerida (acima de 0,5 μ m) e pela complexidade do processo. As modificações estruturais no citoesqueleto para englobar a partícula e a degradação da mesma com a conseqüente captação de nutrientes pela célula são eventos específicos da fagocitose. Neutrófilos e monócitos/macrófagos são considerados fagócitos profissionais (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Os macrófagos precisam distinguir proteínas próprias de uma variedade de microrganismos potencialmente patogênicos, utilizando para isso diversos receptores fagocíticos (**Figura 2**). Os receptores de reconhecimento padrão (PRR- *Pattern Recognition*

Receptor) reconhecem moléculas específicas encontradas em diversos microrganismos chamadas de PAMP (padrões moleculares associados a patógenos). Ulderhill; Ozinsky (2002), relataram uma série de receptores PRR que participam na fagocitose, entre os quais estão: receptores de complemento CR1 (SCHLESINGER et al., 1990), CR3 (BELLINGER; HORWITZ, 1990) e CR4 (ROSS, 1992) que reconhecem partículas opsonizadas pelas proteínas de complemento (MBL, C1q, C4b, C3b e iC3b). Os receptores SRA (*scavenger receptor A*) e MARCO (*macrophage receptor with collagenous structure*) (PEARSON, 1996), que reconhecem vários componentes da parede bacteriana como o ácido lipoteicóico e o LPS entre outros produtos derivados de bactérias gram positivas e gram negativas. Os receptores de manose chamados de α -manana (DI CARLO; FIORE, 1958) e dectina-1 “DEC” (BROWN; GORDON, 2001) reconhecem nanoproteínas compostas por α -manana e β -glucanos encontradas na superfície de fungos como *S. cerevisiae*, *C. albicans* e zimosan.

Sabe-se que outro tipo de receptores são os que ativam funções efectoras. Os receptores para Fc da IgG denominados de Fc γ RI, Fc γ RII e Fc γ RIII (RAVETCH; BOLLAND, 2001) reconhecem partículas opsonizadas pela fração cristalizável da IgG. A ligação do receptor Fc γ R na célula e a partícula opsonizada por imunoglobulinas IgG induzem fagocitose ativa nos macrófagos humanos. Os receptores derivados do sistema complemento não induzem fagocitose, somente induzem modificações estruturais que resultam numa fraca pseudopodia, precisando de estímulos adicionais aos fagócitos para uma fagocitose ativa (POMMIER, 1983). A cooperação entre os receptores FcR e os receptores de complemento prolongam o tempo de ligação entre a partícula e a célula, favorecendo o remodelamento de actina no citosol.

Figura 2 - Interações e sinalizações durante a fagocitose de microrganismos.

Diferentes receptores reconhecem os microorganismos através da ligação direta e da ligação de opsoninas na superfície do microbio. O acoplamento induz a ativação celular, para este fim varias moléculas são utilizadas. A sinalização durante a fagocitose pode servir para ativar ou inibir ainda mais a fagocitose, dependendo das respostas induzidas pelo micróbio. Muitos microorganismos patogenicos regulam ativamente a resposta dos fagocitos.

FONTE: (UNDERHILL; OZINSKY, 2002)

Depois do reconhecimento da partícula opsonizada, ocorrem modificações no citoesqueleto de actina devido à atuação da fosfatidilinositol 3 kinase [PI3 kinase] que catalisa a fosforilação de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂] para fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P₃]. A inibição mediada pelo receptor FcγRIIB bloqueia a fagocitose de partículas opsonizadas e não opsonizadas, impossibilitando que o macrófago se estenda e complete a fusão da sua membrana no momento de internalização da partícula (ARAKI; JOHNSON; SWANSON, 1996; COX et al., 1999). A presença de PI3 kinase permite a extensão da membrana plasmática, facilitando assim a interiorização da partícula ou microorganismo formando -se o fagossomo (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Dentro da célula, a fusão do endossomo com o lisossomo resulta na formação do fagolisossomo e o tempo que a célula utiliza para a formação desta organela depende da

natureza da partícula ingerida. De Chastellier e Thilo (1997), observaram a formação do fagolisossomo no macrófago ao ingerir partículas inertes como látex. Frehel et al. (1986), analisaram a formação do fagolisossomo nos macrófagos infectados com *M. avium* morta por raio gamma, *M. avium* viva e bactérias não patogênicas como *M. aurum* e *Bacillus subtilis* e demonstraram que na infecção com *M. avium* viva a fusão do fagossomo e lisossomo é inibida. Quando as bactérias não são patogênicas a inibição do fagolisossomo foi parcial sugerindo que algumas bactérias são resistentes a enzimas hidrolíticas encontradas no fagossomo. Concluiu-se que a fusão entre vesículas peroxidase positivas (lisossomos) e fagossomos depende da condição da bactéria e do tempo da infecção.

1.3 *Mycobacterium* sp.

Segundo a classificação taxonômica, as micobactérias pertencem ao filo actinobacteria, classe actinobacteria, ordem actinomycetales, família micobacteriaceae. Possui um único gênero denominado *mycobacterium* com espécies que são classificadas de acordo com a sua patogenicidade em três grupos:

- a) estritamente patogênicas: *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. lepraemurium*;
- b) potencialmente patogênicas: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. xenopi*, *M. haemophilum*, *M. genavense*, *M. simiae*, *M. malmoense*, *M. asiaticum*, *M. shimoidei*, *M. celatum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. peregrinum*, *M. abscessum*, *M. szulgai* e *M. marinum*;
- c) raramente patogênicas: *M. thermoresistibile*, *M. gordonae*, *M. triviale*, *M. gastri*, *M. terrae*, *M. flavescens*, *M. vaccae*, *M. phlei* entre outras.

Apresentam-se como bacilos retos ou levemente curvados. Dependendo da espécie, apresentam-se na forma de coco-bacilo ou filamentosa, por exemplo, as células do *M. xenopi* são muitas vezes filamentosas e as do *M. avium* são frequentemente cocóides. São, de maneira geral, bacilos imóveis, não esporulados, aeróbios ou microaerófilos, sendo obrigatoriamente BAAR (bactéria álcool ácido resistente) (DUCATI; BASSO; SANTOS, 2005).

1.3.1 Fagocitose de espécies do gênero *Mycobacterium*

Muitos microrganismos desenvolvem mecanismos para evadir-se da fagocitose, conseguindo em muitos casos viver e proliferar dentro da célula hospedeira. A patogenia de *M. tuberculosis* é atribuída à sua habilidade a sobreviver dentro dos macrófagos evitando a maturação do fagolisossomo. Hart et al. (1972) observaram mediante microscopia eletrônica, resistência na formação do fagolisossomo quando macrófagos peritoneais estão infectados com *M. microti*. Sturgill-koszycki et al. (1994) mostraram acidificação nos fagolisossomos que continham partículas de zimozam, esferas opsonizadas com moléculas de IgG (*IgG-beads*) e *Leishmania mexicana*, demonstrando que o tempo de infecção favorece a diminuição do pH (4,8-5,5). Se o macrófago internaliza *M. avium* o pH do fagossomo é de 6,3 equilibrando-se com o tempo a 6,5. Mediante microscopia imuno-eletrônica, estes autores reforçaram os achados de HART ao não encontrar a proteína LAMP-1 (proteína de membrana associada ao lisossomo) nos fagossomos de macrófagos infectados com *M. avium*. A membrana das vesículas que continham *IgG-beads* e *L. mexicana* apresentavam grandes quantidades de proteína LAMP assim como prótons oriundos da atividade ATP-ase, indicando a capacidade do fagossomo de mudar o seu pH, nesse caso a se acidificar. Schorey et al. (1997) incubaram macrófagos humanos com *M. bovis* sendo que a ingestão ativa acontecia quando a bactéria era pré-incubada no soro. Ao analisar as proteínas do soro, encontraram que a incubação com C2a e C4 induzia uma ingestão ativa pela formação da C3 convertase da via clássica, que induz a clivagem de a C3 em C3b e C3bi na superfície da bactéria que, ao ligar-se ao CR1 do macrófago, favorecia a internalização da bactéria na célula e com isso a sua ingestão.

Além das estratégias acima mencionadas, espécies do gênero *Micobacterium* podem inibir a fagocitose. O fosfatidilinositol lipoarabinomanana componente da parede celular das micobactérias é distribuído na rede endocítica ao iniciar o englobamento da bactéria, sua presença impede o aumento citosólico do Ca^{+2} .

1.3.2 Vacina Bacille Calmette-Guerin – BCG

Entre as medidas preventivas contra infecções ocasionadas pelas cepas virulentas de *Micobacterium* temos: o diagnóstico precoce dos pacientes com a doença, tratamento desses indivíduos a fim de evitar a evolução da doença (infecção latente) e a vacinação.

As regiões genômicas que codificam antígenos específicos do *M. tuberculosis*, são os alvos para o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, por representarem moléculas expressas que induzem respostas imunes específicas. A vacina BCG deriva de uma cepa do *M. bovis* que sofreu mutações, diminuindo a sua virulência e conservando suas propriedades imunizantes. Entretanto as cepas de BCG mantidas em cultura em diversos países sofreram novas mutações, que induziram variações na imunogenicidade. As regiões específicas de *M. tuberculosis* que não estão presentes em *M. bovis* BCG são conhecidas como regiões de diferenciação - RDs (**Figura 3**). A RD1 codifica dois antígenos utilizados para detecção da tuberculose conhecidos como ESAT-6 e CFP-10 (de 6 kDa e 10kDa respectivamente). Estas proteínas presentes em *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis* são secretadas em grandes quantidades num processo inflamatório.

Figura 3 - Presença ou ausência dos genes na região RD1 em mycobactérias.

A RD1 está presente em (A) *M. tuberculosis*, *M. africanum* e *M. bovis* e algumas micobacterias de vida livre (*M. kansasii*, *M. marinum* e *M. szukgal*) e ausente (B) na vacina *M. bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) e na maioria de mycobacterias de vida livre.

FONTE: (COUTO TEIXEIRA; ABRAMO; MUNK, 2007).

Para determinar a imunogenicidade dessas proteínas, Brodin et al. (2005), induziram mutações em diferentes sítios na proteína ESAT-6, encontrando que tais mutações induzem variações na virulência da bactéria. Mutações no domínio Trp-Xaa-Gly da proteína ESAT-6, inibe a conseqüente formação da proteína CFP-10, assim como a virulência. Mutações nos resíduos de Leu²⁸-Leu²⁹ que formam a estrutura alfa da proteína anulam a virulência e mutações no extremo carboxi terminal da proteína terminal reduzem a virulência. A mutação desses resíduos, assim como a deleção dessas regiões é de importância na formação da vacina BCG.

A resistência ou susceptibilidade frente a uma infecção com espécies virulentas do gênero *Mycobacterium*, estão relacionadas a alguns fatores como: exposição a micobactérias encontradas no meio ambiente; diferenças nutricionais nos indivíduos que já foram vacinados, prevalência de co-infecções e variações genéticas na população alvo relacionada a polimorfismos encontrados no gene *Slc11a1* (BUU; SANCHEZ; SCHURR, 2000).

1.4 Gene *Slc11a1* (solute carrier family 11a member 1)

Acreditava-se que a resistência natural de camundongos contra infecções por *Mycobacterium bovis* - bacilo de Bilié-Calmette-Guérin (GROS; SKAMENE; FORGET, 1981), *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium (LISSNER; SWANSON; O'BRIEN, 1983) e *Leishmania donovani* (BRADLEY et al., 1979) era controlada por um locus de resistência denominado Bcg/Ity/Lsh localizado no cromossomo 1 murino. Schurr et al. (1989) identificaram o gene localizado neste locus que foi denominado *Nramp1* (*Natural Resistance-Associated Macrophage Protein-1*) atualmente conhecido como gene *Slc11a1*.

Govoni et al. (1995) demonstraram que a proteína *Slc11a1* em camundongos é codificada por um gene de 11.5Kb, localizado no cromossomo 1 a 74421Kb, distante 30kb do gene *Vil* (MALO et al., 1994), (**Figura 4**). O gene *Slc11a1*, é formado por 15 éxons com tamanhos que variam entre 68 (éxon VII) e 676 (éxon XV) nucleotídeos e introns com tamanhos que variam entre 100 e 2425 nucleotídeos. A superposição dos introns sobre o cDNA revela que oito dos doze domínios transmembrânicos (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9 e 11) são codificados por um exon, entretanto, os domínios transmembrânicos 2, 5 e 12 derivam de dois éxons adjacentes. Não contém os elementos TATA ou CAAT motivo pelo qual, o gene apresenta múltiplos sítios de iniciação (SMALE, 1994).

A proteína *Slc11a1* murina é uma proteína transmembrânica de natureza hidrofóbica de 548aa (60kDa). Estruturalmente, apresenta 12 domínios transmembrânicos (TM) alternado com alças extra citoplasmáticas glicosiladas, apresentam ao mesmo tempo dois possíveis domínios de glicosilação e cinco sítios de fosforilação (VIDAL et al., 1993) (**Figura 5**). É expressa junto com a proteína LAMP1 (FORBES; GROS, 2001), no endolisossomo tardio e em membranas associadas ao lisossomo em células como monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares durante a fagocitose (GRUENHEID et al., 1997), mas não é expressa no lisossomo inicial (GRUENHEID et al., 1997). A sua expressão é regulada por

lipopolissacarídeo (LPS), IFN- γ (GOVONI et al., 1997), TNF- α e IL-1 β (GOVONI et al., 1995; ZHANG et al., 2000).

Figura 4 - Organização genômica do gene *Nramp* em camundongos.

(A) mapa físico do cromossomo 1 no camundongo (B) estrutura exon-intron do gene *Nramp*, os exons estão indicados por caixas pretas e os introns pelas linhas intermediárias. (C) RNAm do gene *Nramp* e a predição da proteína a ser formada, a linha representa as regiões 3' e 5', as caixas sombreadas numeradas do 1-12 identificam os domínios transmembrânicos, as setas identificam a junção onde se encontravam os introns, a posição dos exons estão numerados do I ao XV.

FONTE: (Modificado de GOVONI et al., 1995).

A proteína Slc11a1 faz parte de uma família de proteínas que são transportadoras de cátions divalentes como: ferro (GOMES; APPELBERG, 1998), magnésio e zinco, sendo este transporte dependente do pH. Realiza o transporte de cátions do fagolisossomo para o citoplasma impedindo que os patógenos intracelulares adquiram os íons necessários para sua sobrevivência (FORBES; GROS, 2001), fato que favorece a atividade bactericida dos macrófagos contra *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella Typhimurium* e *Leishmania donovani* na fase aguda da infecção (VIDAL et al., 1993; VIDAL; GROS; SKAMENE, 1995).

A proteína Slc11a1 está associada à ativação de macrófagos (BARTON; WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995) e a conseqüente fagocitose, favorecendo a inibição do crescimento bacteriano. Promove a fusão do fagolisossomo, produção de intermediários reativos de oxigênio e produção de NO (BARTON; WHITEHEAD; BLACKWELL, 1995),

patógenos acima mencionados, falham no controle de proliferação de outros patógenos oportunistas como *M. lepraemurium* (BROWN; GLYNN; PLANT, 1982); *M. intracellulare* (GOTO; BUSCHMAN; SKAMENE, 1989); *Mycobacterium lepraemurium* e *Mycobacterium avium* (SCHURR et al., 1991); *Toxoplasma gondii* (BLACKWELL et al., 1994); *Candida albicans* (PULITI et al., 1995) e *Leishmania infantum* (LECLERCQ et al., 1996). Esta condição favorece a sobrevivência, replicação, transporte de elétrons, glicólise e síntese de DNA desses organismos, causado pelo acúmulo de ferro no fagolisossomo (FORBES; GROS, 2001; HACKAM et al., 1998).

1.4.1 Ativação de macrófagos que contêm o gene *Slc11a1^{RR}* e *Slc11a1^{SS}* com espécies do gênero *mycobacterium* sp.

Para que o macrófago controle a proliferação de *Mycobacterium bovis* é preciso que esteja completamente ativo. A pré-estimulação com IFN- γ e posterior desafio com a bactéria induzem nos macrófagos alveolares de camundongos C57BL/6 o aumento na síntese e posterior secreção de NO. Se a inoculação da bactéria fosse realizada antes do estímulo com a citocina, o resultado seria o inverso com a conseqüente sobrevida da bactéria, indicando a importância da ativação celular numa infecção bacteriana (HANANO et al., 1995).

Yoshida et al. (1995) demonstraram que o gene *Slc11a1^{RR}* ligado à secreção de NO desempenha um papel crucial tanto na imunidade inata como na adaptativa na infecção sistêmica por *M. bovis* BCG. Oito semanas após segunda imunização com *M. bovis* BCG, o homogeneizado do baço dos camundongos B10 (*Slc11a1^{RR}*) e BALB/c (*Slc11a1^{SS}*) foram analisados. Camundongos B10 não apresentam colônias de BCG, mas quando a síntese de NO é inibida, os camundongos B10 falham na erradicação da bactéria. Células do baço dos camundongos B10 apresentam maior expressão dos genes *inos*, *ifn- γ* e *il-12p40*. Em contrapartida, um aumento na expressão de *il-4* e *il-10* e diminuição na expressão de *ifn- γ* foi encontrada nas células do baço dos camundongos BALB/c. Ao analisar as citocinas secretadas pelos macrófagos e as células T na apresentação antigênica, esses pesquisadores mostraram a alta expressão de *il-12p40* pelos macrófagos B10 em resposta a *M. bovis* BCG assim como aumento na expressão de *inos* e *il-12p40* em resposta a IFN- γ . Entretanto não encontraram diferenças na expressão das citocinas secretadas pelas células T, indicando a importância do macrófago na ativação da resposta imune.

Gomes e Appelberg (1998) estudaram o papel do ferro na infecção *in vivo* com *Mycobacterium avium*. Ao avaliar a cultura de homogeneizado de fígado, baço e pulmão nos camundongos C.D2 (*Slc11a1^{RR}*) e BALB/c (*Slc11a1^{SS}*) tratados com ferro, os autores encontraram que o Fe^{+2} induz a proliferação da bactéria nas duas linhagens, sendo esta resposta mais acentuada nos camundongos que possuem os alelos R do que aqueles portadores do alelo S. Atualmente é conhecida a importância do ferro no papel desenvolvido pela proteína Slc11a1. Sabe-se que quando existe excesso de ferro, o influxo deste íon se dá em ambos os sentidos: do fagolisossoma ao citoplasma e vice versa, permitindo assim a sobrevivência da bactéria.

Quando camundongos C57Bl/6 foram expostos a baixas doses de ferro, Gomes, Boelaert e Appelberg (2001) encontraram uma nítida diminuição de bactérias no homogeneizado das células hepáticas, células do baço e do pulmão. A restrição ao ferro inibe a proliferação da bactéria, sugerindo que a proteína Slc11a1 induz o fluxo do ferro do fagolisossoma ao citoplasma.

A proliferação da bactéria dentro do hospedeiro depende de sua susceptibilidade, assim como do consumo de ferro e da virulência da bactéria. Aldwell, Wedlock e Bunddle (1996) pesquisaram a habilidade da proliferação da cepa virulenta *M. bovis* 83/6235 e da cepa não virulenta *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 na infecção. Pela incubação das culturas de macrófagos alveolares bovinos (BAM) com ambas as cepas por um período de 96 horas, demonstraram que BAM controlam o metabolismo do BCG e são pouco efetivos no controle da proliferação da cepa virulenta. Observaram ainda aumento da expressão de *tnf- α* , *il-1* e *il-6* nos macrófagos quando cultivados com *M. bovis* BCG e não com a cepa virulenta. Anos mais tarde, Aldwell et al. (2001) cultivaram estas duas cepas com macrófagos peritoneais (PECs) pertencentes a camundongos BALB/c (*Slc11a1^{SS}*). Assim como acontece com os macrófagos alveolares, os macrófagos peritoneais controlam a proliferação do *M. bovis* BCG, sendo inertes no controle da proliferação da cepa virulenta. Mas, se a célula é previamente estimulada com IFN- γ , a proliferação da cepa virulenta diminui, indicando que a ativação prévia de macrófago é necessária para o controle da proliferação.

1.5 Camundongos *AIRmax* e *AIRmin* e as sublinhagens homozigotas para os alelos *Slc11a1^{RR}* e *Slc11a1^{SS}*

O Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan produziu camundongos selecionados geneticamente para máxima e mínima resposta inflamatória aguda denominados *AIRmax* e *AIRmin* (IBANEZ et al., 1992), obtidos a partir de uma população inicial de camundongos, oriunda da mistura equilibrada de oito linhagens isogênicas diferentes segundo esquema:

A população de camundongos resultantes dos acasalamentos, denominada F0, apresentava alta heterogeneidade genética sendo que cada indivíduo desta população possuía teoricamente uma recombinação única contendo 12,5% dos genes de cada uma das oito linhagens isogênicas parentais. Os fenótipos utilizados no processo de seleção de alta ou baixa resposta inflamatória aguda foram: quantificação do número de células infiltrantes e concentração de proteínas no exsudato inflamatório local, em resposta à injeção subcutânea de micro esferas de Biogel-P100. Cabe ressaltar que o Biogel é uma substância insolúvel, não imunogênica e não biodegradável (IBANEZ et al., 1992).

Os acasalamentos foram direcionados e repetidos em todas as gerações consecutivas, escolhendo camundongos com alta ou baixa resposta inflamatória, situados em cada um dos extremos da curva de distribuição normal dos fenótipos, para a produção das linhagens *AIRmax* e *AIRmin*, respectivamente (IBANEZ et al., 1992). A máxima separação fenotípica foi atingida ao redor da geração 27, onde camundongos *AIRmax* apresentam um infiltrado celular (de 20 a 25 vezes maior) e um extravasamento protéico (2,5 vezes maior), quando comparados com os camundongos *AIRmin* em resposta ao Biogel (**Figura 6**). Este comportamento foi observado nas gerações subseqüentes, estando o processo atualmente na geração 48.

Figura 6 - Divergência fenotípica da resposta inflamatória aguda.

A divergência fenotípica da resposta inflamatória aguda foi avaliada pela migração celular e extravasamento proteico nas diferentes gerações de acasalamentos seletivo bidirecional das linhagens AIRmax e AIRmin tratadas com biogel.

FONTE: (Modificado de BIOZZI et al., 1998).

Durante o processo seletivo houve aumento progressivo da diferença fenotípica entre essas duas linhagens AIRmax e AIRmin. Os trabalhos de Ibañez et al. (1992) e Biozzi et al. (1998), por análise de genética clássica, estimaram a participação de 7 a 11 loci gênicos responsáveis por essa resposta, fixados em homozigose em cada linhagem por volta da 27ª geração.

Seguindo esse estudo, Ribeiro et al. (2003), estudaram outros fenótipos que diferenciam as duas linhagens como a produção de neutrófilos na medula óssea, a população de neutrófilos no sangue, a concentração de agentes quimiotáticos no exsudato inflamatório e a resistência desses neutrófilos à apoptose espontânea que foi sempre maior na linhagem AIRmax em comparação com a AIRmin.

A diferença de resposta inflamatória observada entre essas duas linhagens selecionadas geneticamente a partir da injeção com biogel se estende a outros agentes como veneno de serpente *Bothrops jararaca* (CARNEIRO et al., 2002), agentes inflamatórios como tioglicolato (ARRUDA, 2008) e infecções bacterianas contra *S. typhimurium* e/ou *L. monocytogenes* (ARAÚJO et al., 1998; BORREGO et al., 2006).

Arruda (2008) caracterizou a atividade dos macrófagos do peritônio dos camundongos AIRmax e AIRmin frente à inoculação com tioglicolato. Quatro dias após a exposição ao tioglicolato, camundongos AIRmax apresentaram maior migração celular quando comparados com AIRmin, sendo esta população formada na sua maioria por macrófagos e linfócitos. Macrófagos de camundongos AIRmax estimulados com tioglicolato

na presença de LPS secretam grandes quantidades de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, citocinas pró - inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-12 e IL-1 β). Os camundongos AIRmin expostos às mesmas condições expressaram baixos níveis das citocinas acima mencionadas e altos níveis de IL-10 e TGF- β .

Ao observar a resposta inflamatória dos camundongos AIRmax e AIRmin frente a uma infecção por *S. typhimurium*, Araújo et al. (1998), encontraram infiltrado celular três vezes maior nos camundongos AIRmax. Ambas as linhagens produziram concentrações similares de anticorpos contra a bactéria. Ao determinar a sobrevivência das linhagens frente a doses letais de *S. entérica* Typhimurium (2×10^7) e/ ou *L. monocytogenes* (2×10^{11}), camundongos AIRmax foram mais resistentes, com uma taxa de sobrevivência de 80% e 40% frente às duas bactérias, no sexto dia da infecção. Em contrapartida, os camundongos AIRmin tiveram uma taxa de mortalidade de 100% nesse mesmo período, para ambos os microrganismos. Ao analisar o polimorfismo do gene *Slc11a1* Araújo et al. (1998), encontraram um desvio de frequência do alelo que confere suscetibilidade do gene *Slc11a1* de 25% na população inicial (F0) para 40% nos camundongos AIRmin e 9% nos AIRmax. Em contrapartida, observaram um desvio de frequência com relação ao alelo que confere resistência desse gene de 75% da população F0 para 91% na população AIRmax e 40% nos AIRmin sugerindo que o gene *Slc11a1*^{RR} esteja associado à diferente susceptibilidade desses animais a *S. entérica* Typhimurium (**Quadro 1 e Tabela 1**).

Quadro 1 - Distribuição dos alelos do gene *Slc11a1* nas oito linhagens isogênicas que compuseram o F0 da seleção AIR.

	A	BALB/c	CBA	C57BL/6	DBA	P	SJL	SWR
<i>Alelo Slc11a1</i>	RR	SS	RR	SS	RR	RR	RR	RR

FONTE: (Modificado de BORREGO, 2006).

Tabela 1 - Distribuição dos alelos do gene *Slc11a1* nos camundongos AIRmax e AIRmin.

animais \ alelos (%)	R/R	R/S	S/S
AIRmax	18 (82%)	4 (18%)	0
AIRmin	8 (42%)	7 (37%)	4 (21%)

FONTE: (Modificado de ARAUJO et al., 1998).

Com esses dados decidiu-se estudar então a participação do gene *Slc11a1* na regulação da resposta inflamatória aguda. Para isso, mediante cruzamentos assistidos por genotipagem diferenciando os alelos R e S do gene *Slc11a1* em cada linhagem, o Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan produziu quatro sublinhagens a partir dos camundongos AIRmax e AIRmin que apresentam alelos de resistência (R) e susceptibilidade (S) do gene *Slc11a1* fixados em homozigose, sendo denominadas: AIRmax *Slc11a1*^{RR} (AIRmax^{RR}), AIRmin *Slc11a1*^{RR} (AIRmin^{RR}), AIRmax *Slc11a1*^{SS} (AIRmax^{SS}) e AIRmin *Slc11a1*^{SS} (AIRmin^{SS}). Os camundongos AIRmax *Slc11a1*^{SS} (AIRmax^{SS}) foram obtidos a partir de acasalamentos entre camundongos AIRmax heterozigotos para o gene *Slc11a1*.

Borrego et al. (2006), estudaram a resposta inflamatória ao Biogel nestas linhagens. A inflamação aguda de animais *Slc11a1*^{RR} foi mais intensa em comparação aos *Slc11a1*^{SS} implicando este gene ou outros genes ligados na regulação da resposta inflamatória. A LD (50) de *S. Typhimurium* foi 800 vezes maior para os AIRmax^{SS} do que para os AIRmin^{SS}, demonstrando que genes que regulam a inflamação modulam os efeitos do gene *Slc11a1*^{SS} de susceptibilidade. Outros estudos vêm sendo realizados nessas sublinhagens, tais como: a resistência e/ou susceptibilidade a artrite induzida por pristane (PIA), Peters et al. (2007) demonstraram maior incidência de artrite nos camundongos AIRmax^{SS} (70,6%), seguido dos camundongos AIRmax^{RR} (20%) e AIRmin^{SS} (15%). A sublinhagem AIRmin^{RR} não apresentou sinais de artrite, sugerindo que o fundo genético AIRmin associado ao alelo *Slc11a1*^{RR} influenciam na resistência a essa patologia.

De Franco et al. (2007), avaliaram a participação do gene *Slc11a1* na regeneração tecidual através de injúrias provocadas nas orelhas dos camundongos (orifícios de 2 mm). Quarenta dias após a perfuração, somente camundongos AIRmax apresentaram completa restauração do tecido perdido. Ao avaliar as suas sublinhagens os autores encontraram que os animais AIRmax^{SS} apresentam maior cicatrização na orelha quando comparados com os

camundongos AIRmax^{RR}, sugerindo que o alelo de suscetibilidade do gene *Slc11a1* favorece o reparo tecidual. Nesse mesmo período não se observou regeneração tecidual nos camundongos AIRmin sugerindo a participação do fundo genético AIRmax associado ao alelo *Slc11a1*^{SS} na regeneração tecidual.

Seguindo com estes estudos Canhamero et al. (2010) investigaram o perfil inflamatório e de expressão gênica nos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} na fase inicial de uma regeneração tissular. Ao analisar a inflamação após perfuração, encontraram nos camundongos AIRmax^{SS} o aumento no edema quando comparado com os animais AIRmax^{RR} e a análise do transcriptoma por *microarrays* mostrou um perfil diferente de expressão gênica em cada sublinhagem, compatível com a posterior diferença observada na cinética de regeneração tissular. O polimorfismo, encontrado no gene *Slc11a1* interfere na ativação dos macrófagos em infecções *in vivo* e *in vitro* contra *S. typhimurium*, *L. monocytogenes* e *M. tuberculosis*.

Neste trabalho, analisamos a interferência da presença dos alelos R e S do gene *Slc11a1* em homozigose, no *background* genético das linhagens AIRmax e AIRmin, na ativação de macrófagos peritoneais induzidos por reação inflamatória ao *M. bovis* BCG em comparação com a induzida por tioglicolato.

2 OBJETIVOS

Avaliar a participação dos genes selecionados para a resposta inflamatória aguda juntamente com o polimorfismo encontrado no gene *Slc11a1* na ativação do macrófago é o objetivo central deste trabalho. Para tanto serão utilizados um modelo inflamatório desencadeado pelo tioglicolato e uma infecção desencadeada pelo *M. bovis* BCG.

Na infecção desencadeada pelo *M. bovis* BCG analisamos:

- a) sobrevivência e proliferação da bactéria em cada uma das sublinhagens após infecção com *M. bovis* BCG;
- b) indução da fagocitose que foi analisada em duas fases: englobamento da *M. bovis* e atividade microbicida do macrófago peritoneal.

Para ambos os processos inflamatórios, foram avaliados os seguintes parâmetros:

- a) o fenótipo das populações da cavidade peritoneal;
- b) a secreção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células peritoneais;
- c) a síntese e secreção do óxido nítrico (NO) pelos macrófagos;
- d) a síntese de citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas pelos macrófagos;
- e) a expressão gênica, através do RNA mensageiro, de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias; moléculas de adesão e quimiocinas expressas nos macrófagos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos de ambos dos sexos de aproximadamente 2 a 4 meses de idade, pesando em média 20 g das sublinhagens derivadas das linhagens selecionadas para máxima (AIRmax) e mínima (AIRmin) resposta inflamatória, que possuem os alelos de resistência (R) ou de susceptibilidade (S) do gene *Slc11a1* fixados em homozigose, denominadas AIRmax^{RR}, AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Os procedimentos em experimentação animal realizados estão de acordo com o regulamento da Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) e do Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (número do protocolo 46 - fls 69 - livro 2). Estes camundongos foram criados e mantidos no biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan (São Paulo Brasil).

A denominação formal, pelo *Institute for Laboratory Animal Research* (ILAR), das linhagens originais que utilizamos é Ibut: AIRH e Ibut: AIRL, entretanto, neste trabalho nós nos referimos a elas como AIRmax e AIRmin, respectivamente.

3.2 Estimulação com Tioglicolato

Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 1 ml de tioglicolato a 3%. Após um período de 48 horas os animais foram mortos por asfixia, em câmara de CO₂ e colhido o exsudado peritoneal com 5 ml de PBS estéril gelado.

3.3 Infecção com *M. bovis* BCG

Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 10⁶ e 10⁴ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *Mycobacterium bovis* BCG vivo diluído em 0,5 ml de PBS. A bactéria foi cedida gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia do Instituto Butantan a cargo da Dra, Luciana C. C. Leite. Após um período de 14 dias os animais foram mortos e o exsudato peritoneal foi retirado, nas condições acima citadas.

3.4 Avaliação do grau de infecção

Os órgãos (baço, fígado e pulmão) foram colhidos, homogeneizados e macerados em 1 mL de PBS estéril. Diferentes diluições e suspensões do macerado (puro, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}), foram semeadas em meio sólido MB7H10 da Difco (suplementado com albumina-dextrose-salina - ADS) e incubadas por três semanas (37 °C e 5% CO₂). Após este período o número de colônias presentes nas placas (CFU) foi multiplicado pelo fator da diluição.

3.5 Células

A suspensão celular obtida da cavidade peritoneal foi centrifugada a 1100 rpm, por 10 minutos, a 4 °C e a concentração celular ressuspensa em meio RPMI 1640 (Sigma, Brazil) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (SBF – Cutilab), HEPES (20 mM), bicarbonato de sódio (11 mM), L-glutamina (2 mM) e 1% de estreptomicina. A viabilidade celular foi determinada mediante coloração com azul de tripan a 0,2%. A suspensão celular ajustada para 1×10^6 /100 µl foi colocada em placa de poliestireno (NUNC) de 96 poços fundo plano. Após 2 horas de incubação as células não aderentes foram retiradas mediante lavagens sucessivas e os macrófagos assim obtidos foram incubados por 48 horas a 37 °C em ambiente de 5% CO₂ na presença ou ausência de LPS (1 µg/ml- *Escherichia coli* serotipo 0111:B4, Sigma- ALdrich).

3.6 Citometria de Fluxo

As células peritoneais provenientes dos camundongos injetados com tioglicolato ou *M. bovis* BCG foram quantificadas e analisadas por citometria de fluxo. Para tanto, alíquotas de 100 µl provenientes das suspensões de 10^7 células totais/ml foram incubadas com *FcBlock* anticorpo - porção Fc CD16/CD32 (FcγIII/II) por 10 minutos a 4 °C. Em seguida as suspensões foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos contra: granulócitos (GR1⁺ e CD11b⁺), linfócitos (CD19⁺/CD3⁺) e macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺/CD11c⁻) marcados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC). Como isótipos controles foram utilizados IgG2b (ISO) de rato. O registro de 50.000 eventos foi realizado para os animais infectados com *M. bovis* BCG e 10000 eventos para os animais tratados com

tioglicolato, utilizando o equipamento FACS calibur para aquisição e o programa Flow.Jo para análise.

3.7 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)

Após 48 horas de incubação foram coletados 50 µl do sobrenadante das culturas dos macrófagos, em seguida adicionou-se 50 µl do reagente de Griess (sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5% e N-1 naftil-etilenediamide 0,1% - Sigma Chemical Co). A absorbância foi determinada utilizando-se filtro de 540 nm em leitor de ELISA automático (Labsystems Multiscan EIA). Os valores de densidade óptica (D.O.) obtidos foram transformados em µM de NO₂/10⁶ células, mediante equação de regressão linear com base numa curva padrão feita com concentrações conhecidas de NaNO₂ (1; 2,5; 5; 10 e 25 µM).

3.8 Quantificação da liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Foi utilizado o método descrito por Pick e Mizel (1981). As células totais obtidas do exsudato peritoneal foram acertadas para 2x10⁶ células/ml em solução vermelho de fenol [NaCl (140 mM); tampão fosfato pH:7 (10 mM); dextrose (5,5 mM); vermelho de fenol (0,56 mM); peroxidase raiz forte tipo II (0,01 mg/ml)] e distribuídas em alíquotas de 100 µl em placa de 96 poços. Assim como as amostras, a curva padrão foi misturada com a solução vermelho de fenol para ser distribuída na placa. Adicionou-se então 10 µl de PMA (20 ng/poço – Phorbolmyristate, Sigma Chemical Co) na metade dos poços e incubamos por 1 hora a 37 °C e 5% CO₂. Para o branco utilizamos somente a solução de vermelho de fenol. Após este período, a reação foi interrompida mediante adição de 10 µl de NaOH 1N. A absorbância foi determinada utilizando-se filtro de 620 nm, em leitor de ELISA automático (Labsystems Multiscan EIA). Os resultados obtidos em densidade óptica (D.O.) foram transformados em µM de H₂O₂/2x10⁵ células, com base na curva padrão feita com concentrações conhecidas de peróxido de hidrogênio (5; 10; 20; 40µM).

3.9 Fagocitose

Os macrófagos peritoneais utilizados para o ensaio de fagocitose, foram obtidos a partir de camundongos AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} estimulados ou não via i.p. com uma solução de 0,5 ml de conA (20 µg/ml) por um período de 48 horas.

A suspensão celular total foi adicionada à placa de cultura (24 poços) e incubada por um período de 24 horas, seguido de lavagens com solução salina. O número de macrófagos por poço foi determinado mediante subtração das células não aderidas (encontrada na solução salina após lavagens) em relação ao número total de células colocadas inicialmente no poço (1×10^6 /1ml). Em seguida, a bactéria foi adicionada ao meio contendo os macrófagos numa relação de 1:10, seguido de incubação por um período de três horas. Após este tempo, o sobrenadante contendo as bactérias não aderidas ou não fagocitadas foi removido. Este sobrenadante em estado puro ou diluído (1:10; 1:100 e 1:1000) foi semeado em placas e após três semanas de incubação, determinou-se o número de bactérias não englobadas pelos macrófagos. O número de bactérias englobadas pelas células foi determinada após a lise da monocamada de macrófagos contendo a bactéria por meio da adição de 200 µl de PBS-tween 80 (0,05%) por 5 minutos, seguido de 800 µl de PBS, o produto assim obtido foi centrifugado 10 minutos a 4000 rpm e o pellet formado resuspendido em solução salina, este produto foi diluído e semeado em placas, determinando-se assim o número de bactérias englobadas.

A capacidade do macrófago de matar a bactéria é determinada através do mesmo procedimento citado na etapa de englobamento, diferindo apenas na etapa de incubação dos macrófagos com a bactéria sendo agora 24 horas após o englobamento. Assim como no caso anterior, as placas formadas foram incubadas a 37 °C em um ambiente de 5% CO₂ e após três semanas de incubação o número de colônias presentes nas placas (CFU) foi determinado e multiplicado pelo fator da diluição.

3.10 Determinação da produção de citocinas inflamatórias por ELISA

Macrófagos do peritônio foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência de LPS. O sobrenadante assim obtido foi armazenado a -20 °C e utilizado para os diferentes ensaios de ELISA. Os kits utilizados foram “BD OptEIATM Set Mouse” da BD Biosciences para IL-1β, IL-6, IL-12p40, TNF-α, IL-18, IFN-γ, IL-10 e IL-4.

Para o ensaio de ELISA placas de 96 poços (NUNC – Maxisorp) foram sensibilizadas *overnight* a 4 °C com anticorpos de captura específicos para cada citocina avaliada. Anti-IL-1 β , anti IL-18, anti IL-4, anti IFN- γ e anti-IL-6 foram diluídos (1:250) em tampão carbonato – pH=9,5 (NaHCO₃ 0,1M e Na₂CO₃ 0,1M); anti-TNF- α , anti-IL-10 e anti-IL-12p40 foram diluídos na mesma concentração em tampão fosfato pH=6,5 (Na₂HPO₄ 0,1M e NaH₂PO₄ 0,1M). Após este período, as placas foram lavadas com PBS-Tween20 “PBS-T” [Tween 20 (0,05%)] e bloqueadas por 2 horas a temperatura ambiente com PBS-SBF 20% (soro bovino fetal).

Após sucessivas lavagens com PBS-T, tanto as amostras de sobrenadante como as proteínas recombinantes foram aplicadas. As amostras foram diluídas segundo o tratamento recebido: sobrenadante celular dos camundongos controles foi utilizado em estado puro; sobrenadante dos macrófagos controles incubados com LPS e dos macrófagos provenientes de camundongos injetados TIO ou BCG foram diluídas (1:2) e por último, sobrenadante dos macrófagos pertencentes aos camundongos infectados com BCG incubados com LPS foram diluídos 1:4. Além do sobrenadante, as citocinas recombinantes de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-18, IL-4 e IL-12p40 fornecidas pela “BD Biosciences”, foram diluídas em razão 1:2 em PBS-SBF10%. Após duas horas de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas com PBS-T.

Para TNF- α , IFN- γ , IL-10 ou IL-6 foram preparados uma solução denominada - *Working Detector* (específico do kit BD), na qual o anticorpo de captura em questão foi misturado à avidina-HRP (*avidin-horseradish peroxidase conjugate*) peroxidase numa solução final de 1:250 para cada um dos reagentes em PBS-SBF 10%, a mistura formada foi incubada na placa a temperatura ambiente por um período de 1 hora. Os anticorpos de detecção para IL-4 e IL-12p40 foram diluídas (1:500 e 1:1000, respectivamente) em avidina-HRP (1:250) e incubados nas mesmas condições acima citadas. No caso de IL-1 β e IL-18 não houve adição da solução *Working Detector*, em vez disso, os anticorpos de detecção para IL-1 β e IL-18 foram diluídos em PBS-SBF 10% (1:500 e 1:250 respectivamente) e incubados na placa por um período de 1 hora.

Figura 7 - Curva padrão das citocinas recombinantes utilizadas nos diversos ensaios de ELISA.

Os limites de sensibilidade do método para cada uma das citocinas foram: IL-1 β (9,77pg/ml), TNF- α (34,18 pg/ml), IL-6 (15,26 pg/ml), IL-12 (15,63 pg/ml), IL-18 (15,60 pg/ml), IL-10 (29,3 pg/ml) e IL-4 (15,63 pg/ml).

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Após lavagens sucessivas, adicionou-se a avidina-peroxidase (1:250), seguido por mais meia hora de incubação. Terminado esse processo, as placas foram lavadas e finalmente incubadas com uma mistura de Tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio (1:1) por um período de incubação de 30 minutos. A reação foi interrompida com a solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 2N) e a absorbância foi determinada em leitor de ELISA automático (*Labsystem Multiskan MS*) com os filtros de 450 nm e de 570 nm (utilizado como correção).

Os resultados obtidos foram transformados em pg/ml, mediante a equação de regressão linear baseada na curva padrão feita com concentrações seriadas das citocinas recombinantes avaliadas.

3.11 Extração de RNA total

Para a extração do RNA total dos macrófagos peritoneais utilizamos o kit de extração da GE Healthcare “*Ilustra – RNAspin Mini RNA isolation*”. Segundo as especificações do fabricante, adicionamos nas células a mistura de 350 µl de Tampão RA1 e 3,5 µl β-mercaptoetanol, seguido de homogeneizado no vortex (lise celular). O produto assim obtido foi filtrado no *RNAspin filter* a 1 minuto por 11.000 g (separação do material gênico das proteínas). A solução obtida foi transferida a um novo tubo coletor de 1,5 ml e precipitado mediante adição de 350 µl de etanol (70%), passando no vórtex por 2 a 5 segundos. O solução resultante foi transferida ao *RNAspin Mini column* e centrifugada por 30 segundos a 8000 g. O filtrado foi descartado e o material gênico contido na coluna foi dessalinizado mediante a adição de 350 µl de MDB (*Membrane Desalting Buffer*) seguido de centrifugação (11.000 g por 1 minuto) para secar a membrana. Neste momento a coluna que contém DNA e RNA foi incubada a temperatura ambiente por 15min com *Dnase I reconstituted*, finalmente a coluna contendo RNA total foi lavada 3X com solução tampão fornecida pelo fabricante e eluída com H_2O - RNase *free*.

A integridade do RNA total assim como a confirmação da concentração medida previamente no aparelho nanodrop (*General Electric - GE*), foram constatadas após eletroforese em gel de agarose preparado a 1% em TBE 1X pH=8 (ácido bórico a 100mM, Tris a 100 mM e 0,4% de EDTA a 2mM) contendo 0,01% de bromofenol (**Figura 8**). A corrida eletroforética ocorreu a 60 volts por 1h para a visualização das bandas de RNA.

Figura 8 - Integridade do RNA total dos macrófagos pertencentes aos camundongos AIRmax e AIRmin contendo os alelos de resistência e susceptibilidade do gene *Slc11a1*.

1-8 camundongos controles, 9-16 camundongos tratados com tioglicolato. 1, 9 AIRmax^{RR} macho; 2, 10 AIRmax^{RR} fêmea; 3, 11 AIRmin^{RR} macho; 4, 12 AIRmin^{RR} fêmea; 5, 13 AIRmax^{SS} macho; 6, 14 AIRmax^{SS} fêmea; 7, 15 AIRmin^{SS} macho; 8, 16 AIRmin^{SS} fêmea.

Fonte: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

3.12 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para a obtenção do cDNA utilizou-se o *Kit Superscript III* da Invitrogen. A mistura de 10 µL de RNA total a 100 ng/µl; 1 µL de oligo dT (50 µM); 1 µL de dNTP (10 µM) e 2 µL de água, foi homogeneizada e aquecida por 5 minutos a 65 °C. Após isso, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 1 minuto e em seguida foi adicionada a mistura: 1 µL da enzima *Superscript III - Reverse Transcriptase*, 4 µL de tampão 5x concentrado (específico para a enzima) e 1 µL de DTT (100µM). Os tubos foram submetidos à temperatura de 50 °C por 50 minutos seguida de 70 °C por 15 minutos.

3.13 PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de cDNA foram analisadas e quantificadas por PCR em tempo real utilizando o kit *Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG* da Invitrogen. As misturas de 2,0 µl dos produtos de cDNA, 12,5 µl da enzima *Platinum SYBR Green*, 1 µL de *primers* específicos (**Tabela 2**) a uma concentração de 5 mM e 8,5 µl de água RNase *free*, foram incubadas em aparelho Chromo 4 (MJ research) e submetidas às seguintes condições: incubação por 2 min. a 50 °C, ativação da enzima (*hot start*) por 5 min a 95 °C, amplificação de 40 ciclos por meio de etapas sucessivas de desnaturação (20 s a 90 °C) e anelamento (35 segundos a 60 °C). A aquisição da fluorescência incorporada à sequência de dupla fita amplificada em cada ciclo foi realizada na etapa final pelo aparelho Chromo 4. Após a amplificação, o produto da reação foi submetido à dissociação (*Melting*), elevando-se a

temperatura de 55 °C a 90 °C. Os dados foram adquiridos e analisados pelo programa *Opticon Monitor Analysis Software 2.03*.

Como controle positivo e para normalizar as variações na quantidade de RNA nas amostras utilizamos *primers* específicos do gene *GAPDH* (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) por ser uma enzima expressa constitutivamente em macrófagos. Para verificar possíveis contaminações no momento do preparo das amostras, separamos um mix contendo todos os reagentes sem a inclusão do cDNA (controle negativo).

A cada amostra foi atribuído um valor de Ct (*Cycle Threshold*) referente ao início da fase logarítmica (log) de amplificação. No método de *Threshold* Comparativo (GIULIETTI et al., 2001; LIVAK et al., 2001) formulas aritméticas são utilizadas para calcular níveis de expressão relativos com um calibrador. A quantidade do gene alvo, normalizado para um endógeno (gene constitutivo) e relativa ao calibrador é dada pela formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ na qual: $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{amostra}) - \Delta Ct(\text{calibrador})$, e o ΔCt é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene constitutivo. Assim, a equação representa a expressão normalizada do gene alvo, em uma amostra cuja quantidade é desconhecida, relativa à expressão normalizada do calibrador.

Quadro 2 - Sequências de *primers* utilizados em ensaios de PCR em tempo real.

Nome de <i>primer</i>	Sentido 5'---3' (<i>forward</i>)	Sentido 3'---5' (<i>reverse</i>)	Tm Utilizado
qRT <i>il-1β</i>	TTGACGGACCCCAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTGA	62°C
qRT <i>il-6</i>	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTATGG	62°C
qRT <i>il-12p40</i>	CAGTACACCTGCCACAAAGGA	GTGTGACCTTCTCTGCAGACA	62°C
qRT <i>tnf-α</i>	TTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC	62°C
qRT <i>il-18</i>	TTACAGGAGAGGGTAGACATT TTACTATCC	CAGCATCAGGACAAAGCCGC CTCAA	62°C
qRT <i>tgf-β1</i>	ACCGCAACAACGCCATCTAT	GTAACGCCAGGAATTGTTGC	62°C
qRT <i>il-10</i>	TCAAACAAAGGACCAGCTGGA CAACATACTG	CTGTCTAGGTCCTGGAGTCCA GCAGACTCAA	62°C
qRT <i>ifn-γ</i>	GCTCTGAGACAATGAACGCT	AAAGAGATAATCTGGCTCTG C	62°C
qRT <i>il-4</i>	TCGGCATTGTTGAACGAGGTC	GAAAAGCCCGAAAGAGTCTC	62°C
qRT <i>icam</i>	CACGCTACCTCTGCTCCTG	AAGGCTTCTCTGGGATGGAT	62°C
qRT <i>cd62e</i>	TGGAAAGGTCCAGAAGCACT	GGACACCACAAATCCAGTC	62°C
qRT <i>ccr5</i>	CCAGAGGAGGTGAGACATC	GCAGGGTGCTGACATACCA	62°C
qRT <i>gapdh</i>	AGACGGCCGCATCTTCTTGTG C	TACGGCCAAATCCGTTACAC CG	62°C

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

3.14 Análise dos Resultados

As diferenças entre as médias nos experimentos acima citados foram determinadas pela análise de variâncias (ANOVA), com correção pelo teste Bonferroni, sendo estabelecido como nível mínimo de significância $p < 0,05$.

4.1 Infecção com *Mycobacterium bovis* BCG

Camundongos que possuem o alelo de resistência no gene *Slc11a1* são capazes de controlar infecções bacterianas causadas por *M. bovis* BCG, *L. donovani* e *S. Typhimurium*. Estudos anteriores de nosso modelo demonstraram que nas linhagens AIRmax e AIRmin, aquelas portadoras do alelo *Slc11a1*^{RR} foram mais resistentes à infecção do que as linhagens portadoras do alelo *Slc11a1*^{SS} (BORREGO et al., 2006).

Para analisar como a expressão diferencial dos alelos de resistência e suscetibilidade do gene *Slc11a1* presentes nos camundongos AIRmax e AIRmin ajudam no controle da infecção por *M. bovis* BCG, realizamos a padronização da dose e do tempo de infecção. Para isso camundongos das linhagens AIRmax e AIRmin foram inoculados com as doses de 10^4 e 10^6 bactérias e avaliados após 7 e 14 dias.

Ao analisar a migração celular na cavidade do peritônio e a produção de óxido nítrico pelos macrófagos peritoneais, observamos um maior influxo celular nos animais que receberam a dose de 1×10^6 com o tempo de infecção de 14 dias, motivo pelo qual utilizamos esse intervalo de tempo na infecção (dados não mostrados).

Determinados a dose e o tempo de infecção, avaliamos a capacidade de cada sublinhagem em controlar a proliferação das bactérias no baço após um período de 14 dias, analisando assim o grau de infecção mediante a contagem das bactérias no baço dos animais infectados. Os resultados apresentados na **Figura 9** revelam não haver diferenças significativas entre as sublinhagens no número de bactérias recuperadas no baço. Com esta alta dose da bactéria, nem os camundongos selecionados para a máxima resposta inflamatória, nem a fixação do alelo de resistência *Slc11a1*^{RR} nos animais, interferiu no controle da proliferação bacteriana. Decidimos então diminuir a carga de bactérias para 1×10^4 *M. bovis* BCG por camundongo.

Figura 9 - Avaliação do grau de infecção (dose 10^6) através da contagem das Unidades Formadoras de colônia (UFC) no baço.

Os camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} foram infectados com 1×10^6 de *M. bovis* BCG pela via i.p. e avaliados após 14 dias. A figura representa a média de 8 camundongos. FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Nesta condição, o baço dos camundongos AIRmax^{RR} contém poucas colônias da bactéria, fato que indica a capacidade desta sublinhagem em controlar a sua proliferação. Os camundongos AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram menor capacidade na erradicação de *M. bovis* BCG, o baço destes camundongos contém o dobro de colônias da bactéria quando comparados com o baço dos camundongos AIRmax^{RR}. Entretanto, os camundongos AIRmin^{SS} são menos eficazes no controle da proliferação do BCG, o baço destes animais continha sete vezes mais bactérias quando comparado com os camundongos AIRmax^{RR} (**Figura 10**).

Para avaliar se as diferenças encontradas nos números de bactérias devem-se ao controle da proliferação ou à migração das mesmas para outros órgãos, cultivamos também o homogeneizado do pulmão e do fígado dos camundongos infectados. A análise dos órgãos após a incubação mostra que a presença do alelo de susceptibilidade relaciona-se com maior número de bactérias no fígado e nos pulmões das sublinhagens AIRmin^{SS} e AIRmax^{SS} comparado com as sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR}. Destaque-se que os pulmões e o fígado da sublinhagem AIRmax^{RR} não apresentaram colônias de BCG, indicando a sua eficiência no controle da disseminação do *M. bovis* BCG.

Figura 10 - Avaliação do grau de infecção (dose 10^4) através da contagem das Unidades Formadoras de colônia (UFC) no baço.

Os camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} foram infectadas com 1×10^4 de *M. bovis* BCG pela via i.p. e avaliados após um período de 14 dias. A figura representa a média de 26 animais. # $p < 0,05$ representam as diferenças significativas inter-sublinhagens.
 FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.2 Fagocitose

Para avaliação da fagocitose de bactérias *in vitro*, os macrófagos peritoneais das sublinhagens de resposta extrema AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS} (controle ou tratado com Con-A) foram colocados em cultura e desafiados com a bactéria por um período de 3 e 24 horas.

A **Figura 11A** indica que macrófagos provenientes dos camundongos AIRmax^{RR} apresentaram maior capacidade para englobar a bactéria do que os camundongos AIRmin^{SS}, independentemente da estimulação *in vivo* com Con-A. Para ambos os casos, dos três indivíduos avaliados somente um não conseguiu englobar as bactérias. Por outro lado, a análise dos macrófagos dos camundongos AIRmin^{SS} mostra que as células provenientes dos animais controles apresentam dificuldade em englobar a bactéria, fagocitando assim, menores quantidades de bactéria. O tratamento prévio dos animais com Con-A capacitou suas células a englobar as bactérias com mais eficiência, promovendo a fagocitose em níveis semelhantes aos encontrados nos animais AIRmax^{RR}.

Incubamos as culturas por mais 24 horas para avaliar a digestão ou morte das bactérias (capacidade bactericida). Após este período, os macrófagos dos animais controles da sublinhagem AIRmin^{SS} continham mais bactérias que os macrófagos dos camundongos

AIRmax^{RR} controles (**Figura 11B**). Quando os camundongos foram estimulados com Con-A esta diferença foi mantida, as células dos animais AIRmin^{SS} possuíam cerca de quatro vezes mais bactérias no seu interior, indicando que os macrófagos dos animais AIRmin^{SS} não somente fagocitaram menor quantidade de bactérias como falharam na digestão e morte do *M. bovis* BCG. Provavelmente os macrófagos da sublinhagem AIRmin^{SS} apresentam problemas na digestão da bactéria, podendo ainda ter ocorrido a proliferação da mesma dentro da célula hospedeira.

Por outro lado, os macrófagos dos animais AIRmax^{RR} fagocitaram muitas bactérias e após 24 horas elas já estavam eliminadas ou mortas. Esses resultados indicam que a fixação do alelo de resistência do gene *Slc11a1* nos animais AIRmax pode estar contribuindo para o controle desta infecção, o inverso sendo observado nos animais AIRmin que possuem o alelo de susceptibilidade deste gene.

Figura 11 - Avaliação da atividade fagocítica de macrófagos de animais AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}.

Os macrófagos peritoneais foram cultivados com *M. bovis* BCG em uma relação de 1:10. Após 3 (A) e 24 (B) horas de incubação, as células foram lisadas e o produto obtido foi plaqueado em meio de cultura para crescimento da bactéria. As colônias de BCG foram contabilizadas e multiplicadas pelo fator de diluição.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.3 Resposta Inflamatória

Com o objetivo de estudar o efeito do polimorfismo do gene *Slc11a1* na inflamação, analisamos comparativamente nas 4 sublinhagens vários parâmetros da reação inflamatória local e sistêmica, induzida por uma infecção pelo BCG (cuja patogenia é influenciada pelas variantes do gene) e por um agente flogístico como o tioglicolato, onde deveria predominar o potencial de alta e baixa resposta inflamatória selecionado nas linhagens AIRmax e AIRmin.

4.3.1 Migração celular

A injeção de tioglicolato 3% induziu o aumento de cerca de 1,5 vezes do número de células totais recrutadas para o peritônio às 96 h após o tratamento em todas as sublinhagens. O número de células totais presente na sublinhagem AIRmax^{SS} após estímulo com tioglicolato é estatisticamente maior quando comparado ao número de células presentes na cavidade peritoneal das sublinhagens controles derivadas dos animais AIRmin.

A injeção intra peritoneal de *M. bovis* BCG, induziu um aumento na migração de células à cavidade peritoneal aos 14 dias, em todas as sublinhagens (acima de 23×10^6 células/ml). A **Figura 12** mostra um maior influxo de células nos camundongos AIRmax^{SS} quando comparados com as outras sublinhagens tanto nos indivíduos tratados como nos controles.

Observamos que a infecção com a bactéria induziu maior influxo celular do que a injeção com tioglicolato em todas as sublinhagens.

Figura 12 - Migração celular induzida pelo *M. bovis* BCG e tioglicolato no peritônio de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}.

O exsudato peritoneal foi recolhido em 5 ml de PBS. A suspensão celular foi ajustada em 1ml de meio RPMI. Cada valor representa a média de 3 experimentos, cada experimento correspondente a um pool de células peritoneais provenientes de dois camundongos machos ou dois camundongos fêmeas. * $p < 0,05$ representam as diferenças significativas inter-tratamentos e \$ $p < 0,05$ representam as diferenças significativas entre-sublinhagens.
 FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.3.2 Análise fenotípica das diferentes populações celulares encontradas no peritônio

Para determinar as diferentes populações celulares encontradas no peritônio dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} após tratamento *in vivo* com tioglicolato e infecção com *M. bovis* BCG realizamos ensaios de citometria de fluxo. As células do peritônio foram marcadas com anticorpos específicos contra moléculas de superfície para granulócitos (GR1⁺, CD11b⁺), linfócitos (CD19⁺, CD3⁺) e macrófagos (F4-80⁺/CD11b⁺/CD11c⁻). Após incubação com os anticorpos marcados com FITC ou com PE foi feita a aquisição em citômetro de fluxo FACS Canto II. Os dados obtidos foram analisados no programa FlowJo.

Avaliando os resultados, encontramos em todas as sublinhagens, que a cavidade do peritônio destes animais abriga populações celulares de fenótipos diversos. Por um lado, encontramos elevadas concentrações das populações F480⁺/CD11b⁺/CD11c⁻ e B220⁺/CD19⁺ e por outro, baixos níveis das populações CD3⁺ e CD11b⁺/GR1⁺ indicativos de macrófagos, linfócitos B, linfócitos T e granulócitos respectivamente. Ao analisar as células B220⁺/CD19⁺, CD3⁺ e CD11b⁺/GR1⁺ não observamos diferenças entre as sublinhagens (dados não mostrados).

Na análise das populações de macrófagos marcadas com F4/80, CD11b e CD11c encontramos três grupos principais: F4/80^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻, F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻ e F4/80^{lo}CD11b⁺CD11c⁻ (**Figura 13**), estas populações são comuns no peritônio de todas as sublinhagens e estão presentes ou não dependendo do estímulo dado ao camundongo. Além das populações mostradas, encontramos nos indivíduos das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} infectados com BCG uma pequena população de células F4/80⁻CD11b^{hi}CD11c⁻.

Os dados mostrados na **Figura 14** representam os valores absolutos calculados a partir das porcentagens verificadas nos citogramas e plotados individualmente para cada grupo celular. Observamos que somente os indivíduos controles apresentam uma população de células F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻ característica de macrófagos residentes. No entanto, quando estes animais foram tratados com tioglicolato ou infectados com BCG a população F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻ desaparece. Ao mesmo tempo, pode-se observar nas sublinhagens que receberam tioglicolato ou BCG um aumento da população F4/80^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻ que não está presente nos indivíduos controles, sugerimos que estas duas populações podem ser as mesmas descritas por Bou Ghosn et al. (2010): as LPM (*Large Peritoneal Macrophage*) que

possuem a marcação $CD11b^{high}/F480^{high}/I-A^{-}/Gr1^{inter}$ e as SPM (*Small Peritoneal Macrophage*) com marcação $CD11b^{inter}/F480^{inter}/I-A^{high}/Gr1^{-}$.

Figura 13 - Análise fenotípica das diversas populações de macrófagos encontradas no peritônio.

Camundongos $AIRmax^{RR}$, $AIRmin^{RR}$, $AIRmax^{SS}$ e $AIRmin^{SS}$ foram tratadas com tioglicolato ou infectadas com *M. bovis* BCG. As células foram coletadas e marcadas com anticorpos específicos para F4/80, CD11b e CD11c para posterior leitura no FACS. A figura representa um experimento com um $n = 3$ camundongos. Os experimentos foram repetidos duas vezes, mostrando o mesmo perfil de resultado.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Em ambos os tratamentos podemos observar que os camundongos das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} apresentam um número maior de células F4/80^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻ que as encontradas no peritônio dos animais da sublinhagem AIRmax, sendo estatisticamente maior nos animais AIRmin^{RR} em relação aos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Figura 14 - Número absoluto de cada um dos tipos celulares na cavidade peritoneal com fenótipo F480^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻ e F480^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻.

Após marcação, as células totais dos animais AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} controles e tratados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG foram analisadas no FACS cantoII. Os valores representam a média de três camundongos. # p<0,05 representa diferença significativa inter-sublinhagens.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.3.3 Liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

As células respondem a uma variedade de estímulos via produção de peróxido de hidrogênio. Para analisar a síntese e consequente liberação de H₂O₂, células obtidas da cavidade peritoneal dos camundongos controles, estimulados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG foram cultivadas na presença ou ausência de PMA.

O tioglicolato induziu a produção de peróxido de hidrogênio em todas as sublinhagens. Se as células são incubadas com PMA que promove a secreção desse agente oxidante, este perfil de comportamento é reproduzido em níveis significantes (**Figura 15**). Nas células dos animais controles, não foi observada a secreção de peróxido de hidrogênio, mesmo na presença de PMA. Por outro lado, na infecção com BCG, a liberação de peróxido

de hidrogênio foi observada principalmente nas células dos camundongos AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Quando estas células foram cultivadas na presença de PMA, o perfil de comportamento é reproduzido em proporções elevadas e significantes estatisticamente. As células provenientes de camundongos AIRmin infectados com BCG liberaram mais H₂O₂ que as células das outras sublinhagens (**Figura 15**). Como não houve diferenças entre as sublinhagens portadoras dos alelos *Slc11a1*^{RR} e *Slc11a1*^{SS}, nós sugerimos que a secreção de H₂O₂ numa infecção sistêmica com BCG é um evento influenciado pela seleção genética AIR e não pela presença dos alelos RR ou SS do gene *Slc11a1*.

Figura 15 - Liberação de H₂O₂ pelas células peritoneais dos animais tratados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

Células peritoneais obtidas dos animais AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} foram incubadas em solução de vermelho de fenol na presença de PMA (1 μg/ml). A absorbância foi determinada a 620nm. A figura representa a média de 3 experimentos por gênero, onde cada experimento corresponde a um pool de células. *p<0,05 representam as diferenças significativas inter-tratamento. \$p<0,05 representam as diferenças significativas entre-sublinhagens.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.4 Ativação dos macrófagos da cavidade peritoneal

4.4.1 Secreção de óxido nítrico (NO)

Macrófagos do peritônio dos camundongos infectados com BCG, tratados com tioglicolato e controles, foram cultivados na presença ou ausência de LPS por um período de 48 horas, após este período, avaliamos a presença de NO nos sobrenadantes.

A **Figura 16** mostra que o tioglicolato induziu uma pequena secreção de NO nos macrófagos dos animais AIRmax independente dos alelos do gene *Slc11a1*. Após a estimulação com LPS a diferença entre AIRmax e AIRmin permanece, mas relacionando o polimorfismo do gene *Slc11a1* com a secreção de NO, encontramos que a presença do alelo R está associada à maior liberação de NO. Os macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR} secretaram maiores concentrações de NO (20 µM), seguidos pelas células dos animais AIRmin^{RR} (11,88 µM) e AIRmax^{SS} (4,83 µM).

Na infecção com *M. bovis* BCG, notou-se um perfil de liberação de NO diferente em cada sublinhagem. Altas concentrações de NO foram produzidas por macrófagos provenientes dos camundongos AIRmin^{SS} seguido pelas células dos animais AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmax^{RR}, uma segunda estimulação com LPS acentuou este comportamento. As células dos animais AIRmin^{SS} infectados com BCG secretaram níveis maiores de NO estatisticamente significantes em relação as outras sublinhagens. Nos macrófagos provenientes dos animais controles não foi detectado óxido nítrico no sobrenadante e o estímulo com LPS acentuou este comportamento em todas as sublinhagens.

Se compararmos este perfil com o mostrado na **Figura 10**, encontramos que camundongos AIRmax^{RR} que são mais eficazes na erradicação da bactéria numa infecção sistêmica secretaram menor quantidade de NO (**Figura 16**), podemos sugerir que estes animais eliminam o BCG do organismo limitando a secreção de NO pelos macrófagos peritoneais. O comportamento inverso aparece nos camundongos AIRmin^{SS}, que apresentam-se mais estimulados, provavelmente pela presença de maior número de bactérias vivas no seu interior.

Figura 16 - Secreção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} estimulados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

Os macrófagos foram incubados por 48 horas, na presença ou ausência de LPS (1 μg/ml). Após este período, o sobrenadante foi misturado ao reagente de Griess. A absorbância foi determinada a 540nm. A figura representa a média de três experimentos por gênero. * p<0,05 representa a diferença significativa inter-tratamentos (grupo controle, grupo controle/LPS, grupo TIO e grupo BCG – AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}) e # p<0,05 representa a diferença significativa entre-sublinhagens. FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.4.2 Secreção de citocinas

As citocinas presentes no sobrenadante das culturas dos macrófagos do peritônio foram determinadas pela técnica de ELISA.

O tioglicolato induziu a secreção de IL-1β em baixas concentrações apenas nos macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Um segundo estímulo com LPS em conjunção com a ativação prévia do tioglicolato, induziu nesses mesmos animais a secreção de elevadas concentrações de IL-1β (**Figura 17A**). As sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} após os dois estímulos apresentaram concentrações de IL-1β parecidas com aquelas observadas nos animais controles incubados com LPS.

A infecção com BCG nos camundongos, induziu um aumento na produção de IL-1β apenas nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR}, as outras sublinhagens não produziram esta citocina. Nessas células, uma segunda estimulação com LPS induziu a síntese de IL-1β nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Nos macrófagos provenientes dos animais controles, baixos níveis de IL-1β foram encontrados na presença de LPS (**Figura 17A**).

A **Figura 17B** mostra que independente do tratamento, a IL-6 foi secretada por macrófagos de todas as sublinhagens aqui estudadas. A produção de IL-6 foi estatisticamente maior quando os macrófagos foram estimulados com LPS (aproximadamente 6 vezes a mais em relação a seu controle).

Nas células dos camundongos tratados com tioglicolato que foram estimulados com LPS observamos o mesmo fenômeno, os macrófagos de todas as sublinhagens secretaram níveis elevados dessa citocina (aproximadamente 13 vezes em relação aos macrófagos de camundongos que somente foram injetados com tioglicolato). Portanto, o LPS induziu o aumento da síntese de IL-6 sem distinção entre as sublinhagens. Na infecção com *M. bovis* BCG, os macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} (**Figura 17B**) sintetizaram concentrações estatisticamente elevadas de IL-6 em relação as outras sublinhagens. Nesta condição, também as células dos animais AIRmax^{SS} secretaram IL-6. Após a estimulação com LPS este perfil de comportamento mudou, assim como na estimulação com tioglicolato, todas as sublinhagens secretaram IL-6 em proporções elevadas, não sendo observadas diferenças significativas entre elas. Nos macrófagos dos animais controles, a IL-6 foi secretada em todas as sublinhagens na presença de LPS não sendo encontradas diferenças significativas entre as sublinhagens.

O tioglicolato induziu um pequeno aumento na secreção de IL-12 nos macrófagos de todas as sublinhagens. Porém, um segundo estímulo com LPS, induziu a secreção de elevadas concentrações de IL-12 somente nos macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} (**Figura 17C**), as diferenças de secreção, mesmo sendo pequenas foram evidentes também no grupo controle estimulado pelo LPS. Assim, podemos notar que a estimulação com tioglicolato, induziu um o perfil de síntese de IL-12 similar ao encontrado na secreção de IL-1 β (**Figura 17A**).

Figura 17 - Quantificação das citocinas IL-1 β (A), IL-6 (B), IL-12 (C) secretadas por macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} estimulados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

Os macrófagos peritoneais foram incubados por 48 horas na presença ou não de LPS (1 μ g/ml). Após este período, os sobrenadantes foram coletados e as citocinas quantificadas pela técnica de ELISA. Cada figura representa a média de 3 experimentos. * p<0,05 representa diferença significativa inter-tratamentos. #p<0,05 representam diferença significativa inter-sublinhagens.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

A infecção com *M. bovis* BCG (**Figura 17C**) estimulou apenas as células da sublinhagem AIRmax^{RR} a sintetizar IL-12 em altas concentrações. Após o estímulo com LPS, a citocina continuou sendo secretada pelos macrófagos dos animais AIRmax^{RR}, aparecendo agora níveis de produção nas sublinhagens AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Os macrófagos dos animais controles secretaram baixos níveis de IL-12.

Baixos níveis de TNF- α foram detectados nos macrófagos de todas as sublinhagens tratadas ou não com tioglicolato (**Figura 18A**). Quando os macrófagos dos animais tratados com tioglicolato foram cultivados na presença do LPS, somente observamos altas secreções de TNF- α (acima de 3175,7 pg/ml) nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR}.

Na infecção por *M. bovis* BCG encontramos o mesmo perfil, unicamente os macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR} secretaram altas concentrações de TNF- α (**Figura 18A**) em relação as outras sublinhagens, nas quais a produção desta citocina não foi observada. Quando as células dos animais previamente infectados foram incubadas com LPS, a produção elevada de TNF- α pôde ser observada em todas as sublinhagens, não havendo diferenças significativas entre elas.

A análise da produção de IL-10 (**Figura 18B**) nos camundongos tratados com tioglicolato, mostrou que esta citocina foi secretada em maior concentração pelos animais das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} na presença de LPS. O tioglicolato induziu a produção de IL-10 (aproximadamente 3 vezes a mais em relação aos macrófagos dos animais controles) de forma semelhante em todas sublinhagens.

Quando os animais foram infectados com *M. bovis* BCG, os camundongos derivados da linhagem AIRmin produziram maiores concentrações de IL-10 (**Figura 18B**), quando comparados com as sublinhagens derivadas dos camundongos AIRmax. O LPS induziu um aumento estatisticamente maior para a síntese de IL-10, nas células dos animais da sublinhagem AIRmin^{SS} em relação as outras sublinhagens.

Nos animais controles a IL-10 foi encontrada em pequenas quantidades no sobrenadante celular de todas as sublinhagens. A adição do LPS aumentou a produção desta citocina, sendo observada maior secreção de IL-10 nas células dos animais AIRmin^{RR}. Diferentemente das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , onde a maior secreção ocorria nas células provenientes da linhagem AIRmax, a IL-10 foi secretada principalmente pela linhagem AIRmin.

A síntese de IL-18 e IL-4 também foi avaliada, mas apresentou-se em concentrações abaixo do limite de detecção pela técnica de ELISA (dados não mostrados).

Figura 18 - Quantificação de TNF- α (A) e IL-10 (B) por macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} tratados com tioglicolato e infectados com *M. bovis* BCG.

Macrófagos peritoneais foram incubados por 48 horas na presença ou ausência de LPS (1 μ g/ml). Após este período, os sobrenadantes foram coletados e as citocinas quantificadas pela técnica de ELISA. A figura representa a média de 3 experimentos por gênero. * $p < 0,05$ representam a diferença significativa inter-tratamentos e # $p < 0,05$ representam a diferença significativa inter-sublinhagens. FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

4.4.3 Expressão de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão em macrófagos peritoneais por PCR em Tempo Real (qPCR)

Nos próximos experimentos a ativação de macrófagos foi avaliada, por meio de expressão gênica de citocinas relacionadas à resposta imune inata, resposta imune adaptativa, quimiocinas e moléculas de adesão. Estes ensaios foram realizados utilizando-se a técnica de PCR em tempo real a partir do mRNA extraído da cultura das células pertencentes aos

camundongos tratados *in vivo* com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG e incubados *in vitro* com LPS.

Como controle endógeno, utilizamos *primers* específicos do gene constitutivo GAPDH. Como calibrador escolhemos a expressão dos genes alvos do animal controle AIRmin^{SS} macho, que foi utilizado em todas as situações. Assim os gráficos aqui mostrados representam a expressão normalizada do gene alvo em uma amostra de cDNA, cuja expressão é desconhecida e relativa à expressão normalizada do calibrador.

Na **Figura 19A**, podemos observar um aumento na expressão de *il-1β* nos macrófagos da sublinhagem AIRmax^{RR} seguido pelos macrófagos da sublinhagem AIRmax^{SS} quando foram tratados com tioglicolato e estimulados *in vitro* com LPS.

A infecção com BCG induz nessas mesmas sublinhagens (AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}) a expressão do gene *il-1β* em relação às sublinhagens provenientes dos animais AIRmin. Mas, quando os macrófagos foram expostos ao LPS, este perfil mudou. Em sentido decrescente, a **Figura 19A** mostra maior expressão de *il-1β* nos macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR}, seguido dos macrófagos dos animais AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Nos camundongos controles mostramos a baixa expressão de *il-1β*, com indução de um pequeno aumento da expressão deste gene quando as células são cultivadas com LPS.

Na **Figura 19B**, podemos observar que os macrófagos dos animais tratados com tioglicolato precisam da estimulação com LPS para induzir um aumento na expressão de *il-6*, nesse caso a sublinhagem AIRmax^{RR} mostrou ser mais eficiente, apresentando um aumento de expressão gênica de aproximadamente 3 vezes em relação ao calibrador. Por outro lado, na infecção com *M. bovis* BCG somente os macrófagos dos animais AIRmax apresentaram um aumento na expressão de *il-6*; o segundo estímulo com LPS induziu o aumento da expressão dessa citocina em todas as sublinhagens, porém os animais AIRmax tanto os que possuem o alelo R como o alelo S apresentaram um aumento de expressão estatisticamente significativo em relação aos animais da sublinhagens originadas da linhagem AIRmin.

Figura 19 - Expressão relativa dos genes *il-1 β* (A), *il-6* (B), *il-12* (C), nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} tratados com tioglicolato e infectados com *M. bovis* BCG.

A expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. A figura representa a média de dois camundongos por cada sublinhagem. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa inter-tratamentos, # $p < 0,05$ representa a diferença significativa inter-sublinhagens. As linhas pontilhadas representam o limite de expressão gênica da amostra utilizada como calibrador.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Nos animais controles, uma baixa expressão de *il-6* foi encontrada nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, a presença do LPS nas células dos animais controles induziu pequeno aumento da expressão de *il-6* nas outras sublinhagens (AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}).

Na **Figura 19C** mostramos que o tioglicolato induziu a expressão do gene da *il-12* em todas as sublinhagens, a presença do LPS aumentou a expressão deste gene principalmente nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR}. Na infecção com BCG, os macrófagos dos camundongos da seleção AIRmax tanto R como S também expressaram níveis aumentados do gene da *il-12* (**Figura 19C**). No entanto, após a estimulação com LPS a expressão desta citocina diminuiu nas células da sublinhagem AIRmax e aumentou consideravelmente nos macrófagos da sublinhagem AIRmin^{SS}. Nos animais controles a expressão do gene da *il-12* somente foi observada na sublinhagens AIRmax^{RR}, o LPS inibiu a expressão em todas as amostras avaliadas.

Em relação ao gene do *tnf-α* podemos notar que o tioglicolato induz a expressão deste gene somente nas células dos animais AIRmax^{RR} independentemente da estimulação com LPS (**Figura 20A**). A infecção com BCG juntamente com a estimulação com LPS induziram aumento na expressão do gene do *tnf-α*, especialmente nas células dos animais AIRmax^{RR}. Nos animais controles não houve expressão desta citocina.

Na expressão das citocinas inflamatórias pudemos observar um padrão de resposta ao estímulo com tioglicolato. Macrófagos dos animais AIRmax^{RR} apresentaram maiores níveis de *il-12* e *tnf-α*. Quando um segundo estímulo foi administrado (incubação com LPS), a expressão de *il-1β*, *il-6*, *il-12* e *tnf-α* aumentaram nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR} seguido pelas células dos animais AIRmax^{SS}. Assim podemos sugerir que a seleção genética para alta resposta inflamatória que resultou nos animais AIRmax favoreceu a expressão dessas citocinas.

A **Figura 20B**, mostra um aumento na expressão do gene da *il-18* nos macrófagos dos camundongos da sublinhagem AIRmin^{RR} tanto dos animais controles como nos que foram tratados com tioglicolato. Nos animais infectados com *M. bovis* BCG observamos um aumento significativo na expressão do gene da *il-18* nos macrófagos de ambas as sublinhagens AIRmin tanto as que possuíam os alelos R como os S. Para todos os tratamentos, a segunda estimulação com LPS não interferiu na expressão de *il-18*.

Figura 20 - Expressão relativa dos genes *tnf- α* (A), *il-18* (B), *tgf- β* (C) nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} tratados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

A expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. A figura representa a média de dois camundongos por cada sublinhagem. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa inter-tratamentos. As linhas pontilhadas representam o limite de expressão gênica da amostra utilizada como calibrador. FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

A **Figura 20C** mostra que nos camundongos tratados com tioglicolato ou infectados com BCG, o aumento da expressão do gene do *tgf-β* ocorreu nos macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, a segunda estimulação com LPS não alterou a transcrição desse gene permanecendo nos níveis semelhante aos controles.

Na **Figura 21A** mostramos que nem o tratamento com o tioglicolato nem a infecção com o BCG induziram a expressão do gene da *il-10*. Para todos os casos, a expressão da citocina somente foi observada nas células derivadas da linhagem AIRmax após um segundo estímulo com LPS. Nos animais tratados com a bactéria, assim como nos animais controle, o LPS induziu um aumento significativo da expressão gênica da *il-10* nas células das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Macrófagos provenientes dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} tratados com tioglicolato que foram cultivados com LPS expressaram baixos níveis do gene de *ifn-γ*. Na infecção com *M. bovis* BCG essas mesmas células expressaram níveis mais altos desta citocina, porém, a estimulação com LPS induziu uma forte expressão de *ifn-γ* nos macrófagos dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e uma menor expressão nas células dos animais AIRmin^{SS} (**Figura 21B**).

A análise da expressão do gene da *il-4*, apresentou-se aumentada somente nos macrófagos dos camundongos AIRmin^{SS} controles que foram estimulados com LPS, nas demais sublinhagens não ocorreu a expressão do gene da *il-4*, independente do tratamento recebido (**Figura 21C**).

Figura 21 - Expressão relativa dos genes *il-10* (A), *ifn-γ* (B) e *il-4* (C) nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} tratados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

A expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. A figura representa a média de dois camundongos por cada sublinhagem. * $p < 0,05$ representa a diferença significativa inter-tratamento. FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Na **Figura 22A** mostramos que nos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} que foram estimulados com tioglicolato existe uma maior expressão do gene *icam* quando comparamos com a sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}, este fato corrobora em parte os resultados de migração celular onde os animais da sublinhagem AIRmax^{SS} apresentaram um número maior de células na cavidade peritoneal após o estímulo. O BCG induz expressão do gene *icam* na sublinhagem AIRmax^{RR} e na presença de LPS a expressão é aumentada em todas as sublinhagens, principalmente nos animais AIRmin^{SS}.

Não houve expressão do gene *cdc62e* em nenhuma das sublinhagens independente da estimulação recebida pelos animais (dados não mostrados). O gene *ccr5* encontra-se no limite de detecção nos animais de todas as sublinhagens que foram estimulados com tioglicolato. A transcrição ativa do gene de *ccr5* foi somente detectada nos macrófagos dos animais AIRmin^{SS} (**Figura 22B**) após a infecção com BCG independente da presença do LPS.

Figura 22 - Expressão relativa dos genes (A) *icam* e (B) *ccr5* nos macrófagos peritoneais de camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} tratados com tioglicolato ou infectados com *M. bovis* BCG.

A expressão gênica foi determinada pela técnica de qPCR. A figura representa a média de dois camundongos por cada sublinhagem. Para *ccr5* * $p < 0,05$ representam a diferença significativa inter-tratamento.

FONTE: (AGUILAR-RAMIREZ, 2012).

Nos experimentos acima mostrados, encontramos que a inoculação de tioglicolato nos camundongos induz nas suas células a uma primeira estimulação, porém é necessária a presença de LPS para uma estimulação final dos macrófagos. Tendo em vista que a produção de óxido nítrico, síntese das citocinas IL-1 β , IL-12, TNF- α e aumento da expressão dos genes de *il-1 β* , *il-6*, *il-12*, *tnf- α* , *ifn- γ* são fenótipos de ativação encontrados principalmente nos camundongos AIRmax^{RR} seguidos pelos camundongos AIRmax^{SS}, podemos sugerir que o tioglicolato conjuntamente com o LPS foram capazes de induzir maior ativação nas células dos camundongos com fundo genético selecionado para máxima resposta inflamatória (AIRmax).

Na infecção com *M. bovis* BCG avaliamos como a fixação alélica do gene *Slc11a1* interfere na resposta inflamatória nos camundongos AIRmax e AIRmin. Sugerimos que a seleção genética para a produção da linhagem AIRmax assim como a presença do alelo R fixado do gene *Slc11a1* provêm o macrófago de uma completa ativação, avaliada pelo controle do crescimento de colônias de BCG no baço dos camundongos infectados, assim como na secreção de citocinas inflamatórias. Quando analisamos a secreção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio encontramos o aumento na síntese destes mediadores somente nos camundongos derivados da linhagem AIRmin, em especial na sublinhagem AIRmin^{SS} devido à maior sobrevivência da bactéria nestes indivíduos. Por outro lado, nos animais AIRmax^{RR} que controlam a proliferação das bactérias, não haveria estímulo suficiente para a liberação de NO e H₂O₂.

5 DISCUSSÃO

A resistência inata a infecções causadas por bactérias como *M. bovis*, *S. entérica* Typhimurium e *L. donovani* é controlada pelo gene *Slc11a1* situado no cromossomo 1 murino. Neste trabalho estudamos o papel desenvolvido pelos alelos de resistência ou susceptibilidade do gene *Slc11a1* fixados nos camundongos selecionados geneticamente para a máxima ou mínima resposta inflamatória, em algumas funções atribuídas a macrófagos, durante uma infecção sistêmica causada por *M. bovis* BCG ou na inflamação desencadeada pelo tioglicolato.

Sabe-se que em diversas infecções sistêmicas causadas por diferentes cepas de *mycobacterium sp.*, a proliferação da bactéria depende do grau de virulência desta e da resistência do hospedeiro. Dunn et al. (1995) postularam que a sobrevivência e posterior proliferação da bactéria dependiam exclusivamente da sua virulência. Para isso inocularam endovenosamente 10^5 UFC de bactérias virulentas (*M. tuberculosis*) ou bactérias não virulentas (*M. bovis* BCG) em camundongos híbridos B6D2F1 entre uma linhagem resistente e uma susceptível. Ao analisarem os órgãos dos camundongos ao longo da infecção, encontraram diminuição no número de bactérias recuperadas no homogeneizado do fígado a partir do 40º dia após infecção. Ao analisarem o pulmão observaram que a infecção não era resolvida quando os camundongos eram infectados com a cepa virulenta o que levava à morte dos camundongos, entretanto, se o camundongo fosse infectado com uma cepa não virulenta, o número de bactérias recuperadas era significativamente menor.

Seguindo estes estudos, Mazola et al. (2002) mostraram que numa infecção causada com *M. bovis* BCG, a sobrevivência e proliferação da bactéria depende, além do tipo da bactéria, do polimorfismo do gene *Slc11a1* no hospedeiro murino. Camundongos DBA/2 e BALB/c que contem o gene *Slc11a1^{RR}* ou *Slc11a1^{SS}*, respectivamente, foram injetados no cérebro com *M. bovis* BCG. Ao analisarem a cultura do homogeneizado do cérebro, encontraram que camundongos BALB/c apresentavam 10 vezes mais colônias da bactéria do que os camundongos DBA/2. No entanto, no baço a diferença foi mais evidente, o baço dos camundongos BALB/c apresentaram 100 vezes mais colônias que o baço de camundongos DBA/2, indicando que a sobrevivência da bactéria no animal dependia do genótipo *Slc11a1*.

Em nosso trabalho mostramos que todas as sublinhagens estudadas onde os alelos R e S do gene *Slc11a1* foram fixados em homozigose, controlam igualmente a proliferação da bactéria quando injetada na dose maior (10^6) na cavidade do peritônio. Porém, na infecção com dose menor (10^4) de *M. bovis* BCG as sublinhagens dos camundongos que contem o alelo de resistência (*Slc11a1^{RR}*) conseguiram controlar melhor a proliferação da bactéria,

inibindo a sua sobrevivência e conseqüente proliferação no baço. Nos camundongos com genótipo *Slc11a1*^{SS} observamos o inverso, o controle da proliferação das bactérias foi menos eficiente, situação que foi reforçada pela constituição genética das linhagens em decorrência do processo de seleção a que foram submetidos esses animais. No aspecto geral, os camundongos selecionados para máxima resposta inflamatória são mais resistentes que os camundongos selecionados para mínima resposta, o baço dos camundongos AIRmax^{RR} contém sete vezes menos colônias de BCG que o baço dos camundongos AIRmin^{SS}. As diferenças podem ser devidas ao sinergismo de duas condições, ou seja, a seleção dos camundongos AIRmax para desenvolver uma alta resposta inflamatória e a posterior fixação do alelo *Slc11a1*^{RR}, favoreceu a capacidade destes animais para reagirem a infecções causadas por bactérias intracelulares, sendo capazes de inibir o metabolismo da bactéria, resultando na erradicação da mesma. Por outro lado, nos camundongos AIRmin selecionados para baixa resposta inflamatória, a presença do alelo SS do gene *Slc11a1* reforça a situação de suscetibilidade, criando um ambiente favorável para a sobrevivência e replicação da bactéria. Os camundongos AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram uma resposta intermediária, ambas sublinhagens conseguem reagir contra a bactéria, mas com uma eficiência menor quando comparados com os camundongos AIRmax^{RR}. Nos camundongos AIRmin^{RR} a carência da resposta inflamatória é compensada pela presença do gene *Slc11a1*^{RR} e nos camundongos AIRmax^{SS} a ausência deste gene diminui o efeito do potencial de máxima resposta inflamatória na resolução da infecção.

Esses resultados corroboram os dados mostrados no trabalho de Borrego (2006) que ao avaliar a sobrevivência dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} numa infecção causada por *S. typhimurium* encontraram um comportamento semelhante. Camundongos AIRmax^{RR} são mais resistentes à infecção causada pela bactéria do que os camundongos AIRmin^{SS}. Assim como em nossos dados, os camundongos AIRmin^{RR} e AIRmax^{SS} apresentaram um comportamento equivalente entre si e intermediário entre as sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}.

A diminuição da viabilidade do macrófago numa infecção com espécies patogênicas como *M. tuberculosis* é um reflexo da habilidade da bactéria em replicar-se dentro da célula, escapando dos mecanismos microbicidas da célula hospedeira resultando na destruição do macrófago.

A capacidade dos camundongos AIRmax^{RR} em controlar a proliferação das colônias BCG na infecção, foi confirmada também nos ensaios de fagocitose. Colônias de *M. bovis* BCG vivo foram cultivadas com os macrófagos das sublinhagens que apresentavam fenótipos

extremos (AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}). Três e vinte quatro horas após incubação, encontramos que os macrófagos da sublinhagem AIRmax^{RR} fagocitaram e eliminaram maior número de bactérias, do que as células da sublinhagem AIRmin^{SS} as quais, além de fagocitarem menor número de bactérias, falharam na digestão das mesmas.

Em maior ou em menor grau, as cadeias de RNA ou DNA, proteínas, vírus, bactérias entre outros, desencadeiam o recrutamento de células ao foco inflamatório. Spitalny (1981) demonstrou o papel do tioglicolato na indução da migração celular. Ao avaliar a migração celular nos camundongos AIRmax e AIRmin, trabalhos de nosso laboratório mostraram que a inoculação do tioglicolato aumenta o influxo celular na cavidade do peritônio, sendo a migração celular maior nos camundongos AIRmax (ARRUDA, 2007).

Tanto a injeção com o tioglicolato, como a injeção com a bactéria *M. bovis* BCG (viva) na cavidade peritoneal dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} induzem a migração celular. Notamos que a bactéria induz maior influxo celular, provavelmente por induzir uma infecção e estimulação do sistema imune. O tioglicolato por sua vez, também induziu um recrutamento celular significativo. Em ambos os estímulos encontramos maior influxo celular na sublinhagem AIRmax^{SS} e menor nas sublinhagens derivadas dos camundongos AIRmin.

A cavidade peritoneal abriga uma variedade de células especializadas, entre as quais estão os macrófagos. Essas células representam uma população altamente heterogênea, com diferenças morfológicas, fenotípicas e funcionais. Gordon e Taylor (2005) comprovaram que a heterogeneidade é devida à expressão diferencial de diversas proteínas presentes na célula. Taylor et al. (2003), ao analisarem os receptores presentes nos MΦ inativos, nos MΦ residentes no peritônio, nos MΦ alveolares residentes no pulmão, nos MΦ do baço e nos MΦ ativados pelo tioglicolato, encontraram uma maior expressão de F4/80 nos MΦ residentes no peritônio, seguido pelos MΦ ativados pelo tioglicolato e em igual proporção com os MΦ do baço. Da mesma forma, foi observada que a expressão de CD11b nos MΦ residentes da cavidade peritoneal é mais alta, seguida dos mΦ estimulados pelo tioglicolato e muito baixa nos MΦ esplênicos, mostrando que a heterogeneidade dos macrófagos é fisiológica e não somente determinada pelos fatores ambientais (TAYLOR et al., 2003).

Utilizando esses receptores, Bou Ghosn et al. (2010) identificaram em camundongos BALB/c duas populações de macrófagos residentes da cavidade peritoneal, denominada de células LPM (CD11b^{hi}F4/80^{hi}I-A⁻) e células SPM (CD11b^{lo}F4/80^{lo}I-A^{hi}). Quando o camundongo encontra-se num estado basal essas células representam 90% e 10% do total de

macrófagos peritoneais respectivamente. Na inflamação desencadeada pelo estímulo *in vivo* com tioglicolato ou LPS, acontece a queda das células LPM e o aumento de SPM (10% e 90% respectivamente). Ao avaliar as diferentes populações de macrófagos nos camundongos AIRmax e AIRmin, Arruda (2007) encontrou nos animais controles duas populações celulares: a população GR1⁺/CD11b^{hi} e a população GR1⁺/CD11b^{low}. Assim como no trabalho de Bou Ghosn, quando os camundongos foram estimulados com tioglicolato, ocorreu a diminuição da população GR1⁺/CD11b^{hi} e o aumento das células GR1⁺/CD11b^{low}.

Nas quatro sublinhagens avaliadas em nosso trabalho, encontramos três populações que se diferenciam pela intensidade da marcação em CD11b e F4/80 e pela carência do marcador CD11c, sendo: F4/80^{lo}CD11b⁺CD11c⁻, F4/80^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻ e F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻. Camundongos em estado basal apresentam as populações F4/80^{lo}CD11b⁺CD11c⁻ e F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻, na inflamação seja por tioglicolato ou pela infecção com BCG esta última população desaparece, enquanto surge uma terceira população F4/80^{lo}CD11b⁺CD11c⁻. Estas classificações são semelhantes às populações celulares SMP e LMP descritas por Bou Ghosn et al. (2010).

Na inflamação, dependendo da estimulação, os macrófagos e todas as células fagocíticas respondem a uma variedade de estímulos de membrana via produção das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, entre as que se encontram o anion superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o óxido nítrico (NO). Esses metabolitos atuam na defesa do organismo como sinalizadores celulares (TRINCHIERI et al., 1997).

A produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos é consequência da ativação da célula, porém a sua produção é dependente de fatores genéticos no organismo e do tipo do agente que induz a inflamação. Quando analisaram a secreção de H₂O₂ pelas células dos camundongos AIRmax e AIRmin, Carneiro et al. (2002) encontraram maior secreção de H₂O₂ nas células provenientes dos camundongos AIRmax estimuladas *in vivo* por 24 horas com veneno da cobra *Bothrops jararaca*. Na estimulação com tioglicolato, Arruda (2008) mostrou que a maior secreção de peróxido de hidrogênio ocorria nas primeiras 24 horas de estimulação nas células dos animais AIRmax, diminuindo após este período, quando não há mais diferenças com os AIRmin.

Nossos resultados comprovam que na inflamação com tioglicolato, células dos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS} secretam peróxido de

hidrogênio em igual proporção após 96 h de estímulo não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as sublinhagens.

Por outro lado, na infecção por BCG, a secreção de peróxido de hidrogênio é dependente de fatores genéticos selecionados nas linhagens. Estudando uma infecção causada pelo BCG, Denis et al. (1988) observaram que na primeira semana de infecção, camundongos Bcg^r secretaram altas quantidades de H₂O₂ que se manteve, diferentemente da linhagem Bcg^s que apresentou uma produção tardia deste metabólito, acontecendo após a segunda semana.

Em nosso modelo de infecção com BCG, a secreção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais recuperados aos 14 dias de infecção, foi um evento influenciado somente pela seleção genética e não pela fixação dos alelos do gene *Slc11a1*. Células do peritônio dos camundongos AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} liberam mais H₂O₂ que as células dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} e a incubação *in vitro* com PMA aumentou esta resposta. Como não foram observadas diferenças entre as sublinhagens portadoras dos alelos *Slc11a1*^{RR} e *Slc11a1*^{SS}, sugerimos que este não é um evento influenciado pelo polimorfismo deste gene.

Ao analisar a secreção de NO, Barrera et al. (1994), mostraram que a mesma é influenciada pelo genótipo *Slc11a1*. Cultura de macrófagos derivados da medula óssea provenientes de camundongos B10ABcg^R (*Slc11a1*^{RR}) quando estimulados com IFN- γ apresentavam maior secreção de NO que as células dos camundongos B10.A (*Slc11a1*^{SS}) que foram submetidas ao mesmo tratamento.

Ao analisar a secreção de NO nos macrófagos dos camundongos AIRmax e AIRmin tratados com tioglicolato, Arruda (2008) demonstrou que se as células fossem incubadas com LPS ou IFN- γ , o aumento da secreção de NO acontecia especialmente nos macrófagos de animais AIRmax, mas se as células fossem incubadas com ambos os estímulos (LPS e IFN- γ) as duas linhagens secretavam níveis similares de NO.

Nosso trabalho vai de encontro com estes resultados, pois em camundongos tratados com tioglicolato foi necessária uma segunda estimulação com LPS para induzir a secreção de NO. Quando comparamos a secreção de NO em todas as sublinhagens, notamos que os macrófagos provenientes dos camundongos AIRmax^{RR} secretaram grandes quantidades de NO, seguidos pelos macrófagos dos animais AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}. Estes resultados nos permitem concluir que quando os camundongos são estimulados com tioglicolato, os macrófagos dos camundongos AIRmax estão mais capacitados que as células dos camundongos AIRmin em secretar NO, observamos também, que as sublinhagens que possuem o alelo R do gene de *Slc11a1* são mais eficientes que as portadoras do gene

Slc11a1^{SS} na secreção deste mesmo metabolito. Portanto, ocorre um sinergismo entre a seleção genética para alta capacidade inflamatória e a presença dos alelos R do gene *Slc11a1*.

O efeito contrário foi observado quando os animais foram infectados com *M. bovis* BCG. Os macrófagos provenientes de camundongos AIRmin^{SS} secretaram maiores concentrações de NO, seguido dos macrófagos dos animais AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmax^{RR}. Como foi mostrado na **Figura 10**, animais AIRmax^{RR} conseguem controlar o crescimento da bactéria, conseqüentemente os seus macrófagos não secretam altas concentrações de NO. Nos camundongos AIRmin^{SS}, a proliferação constante de BCG induziria uma forte e contínua ativação dos macrófagos que secretam altas quantidades de NO. Se compararmos a secreção de NO com a secreção de peróxido de hidrogênio, observamos um sinergismo dado pela seleção genética da resposta inflamatória. Células dos camundongos AIRmin^{SS} secretam mais NO e H₂O₂ que as células dos camundongos AIRmax^{RR}.

Este fato também foi corroborado por Nascimento et al. (2002), mostrando que numa infecção de *P. brasiliensis*, os macrófagos dos camundongos susceptíveis (B10.A) apresentam altas concentrações de NO, enquanto que, nos macrófagos dos camundongos resistentes (A/Sn) a produção de NO encontra-se diminuída. Outro fato importante foi da produção de TNF- α , estes autores mostraram que quando aumenta a secreção de NO diminui a síntese de TNF- α e vice-versa.

Nossos resultados foram similares aos publicados por Nascimento et al. (2002) pois na infecção com *M. bovis* BCG os macrófagos dos animais AIRmax^{RR} secretaram altas concentrações de TNF- α , e baixa secreção de NO. Por outro lado, quando avaliamos a secreção de NO nos macrófagos de camundongos AIRmin^{SS}, encontramos elevadas secreções desta molécula, não encontrando sinais de síntese de produção de TNF- α . O NO regula negativamente a produção de TNF- α pelos macrófagos (NASCIMENTO et al., 2002), assim a baixa secreção de NO conjuntamente com as altas secreções de TNF- α observada nas células de animais AIRmax^{RR} induziriam ativação do macrófago, culminando numa ação microbicida mais eficiente.

Nos macrófagos dos camundongos tratados com tioglicolato, não encontramos esse antagonismo e sim o sinergismo entre a síntese de NO e a secreção de TNF- α . Somente o tioglicolato não induziu a secreção de NO e de TNF- α , em ambos os casos foi necessário um segundo estímulo dessas células com LPS, o que resultou no aumento da produção de TNF- α e alta secreção de NO exclusivamente nas células dos camundongos AIRmax^{RR}.

As citocinas TNF- α e IFN- γ desempenham um papel essencial na ativação dos macrófagos, capacitando essas células para secretar altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez aumentam a capacidade microbicida e tumoricida do macrófago assim como das outras células circundantes (MOSSER; EDWARDS, 2008).

Tsao et al. (1999) avaliaram a síntese de citocinas em pacientes com tuberculose. Altas concentrações de TNF- α , IL-1 β e IL-6 foram encontradas no lavado bronco-alveolar e no soro desses pacientes, quando comparados com indivíduos saudáveis (controles).

Chernousova et al. (2007) avaliaram a secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-6 em macrófagos peritoneais de camundongos C57Bl/6 infectados com *M. bovis* BCG ou com a cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv. A infecção com *M. tuberculosis* H37Rv induz nos macrófagos, elevada secreção de IFN- γ . Na infecção com BCG, encontraram por sua vez a secreção de elevadas concentrações de TNF- α e IL-6, quando comparados com os macrófagos que foram estimulados com *M. tuberculosis* H37Rv.

Ao avaliar a secreção de citocinas inflamatórias nos camundongos AIRmax e AIRmin inoculados com o veneno da cobra *Bothrops jararaca*. Carneiro et al. (2002), mostraram que 48 horas após indução da inflamação, macrófagos dos camundongos AIRmax secretaram maiores concentrações de TNF- α e IFN- γ que macrófagos dos AIRmin, enquanto que a IL-6 foi secretada em quantidades similares por ambas as linhagens. Anos mais tarde, quando injetaram o veneno na pata desses camundongos, Carneiro et al. (2008), encontraram maiores concentrações de IL-1 β no material extraído das patas inflamadas dos camundongos AIRmax.

Na inflamação ocasionada pelo tioglicolato, Arruda (2008) mostrou que era necessário um segundo estímulo com LPS para estimular o macrófago, observando o aumento na síntese de IL-1 β , TNF- α e IL-12 nos macrófagos dos camundongos AIRmax. Assim como nos casos anteriores, a IL-6 foi secretada em concentrações similares em ambas as linhagens.

Quando avaliaram a indução da artrite por pristane nas sublinhagens AIRmax e AIRmin fixadas com diferentes alelos do gene *Slc11a1*, Peters et al. (2007) encontraram que tanto camundongos AIRmax^{RR} como AIRmax^{SS}, que são sensíveis à indução de artrite, secretaram altas concentrações de IL-6, IL-12, IL-4 e IFN- γ .

Avaliando a secreção de citocinas inflamatórias nos macrófagos do peritônio nos camundongos AIRmax^{RR}, AIRmin^{RR}, AIRmax^{SS} e AIRmin^{SS}, na inflamação desencadeada pelo tioglicolato, obtivemos resultados semelhantes àqueles descritos no trabalho de Arruda (2008), onde o tioglicolato não induziu a secreção de IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , sendo necessário uma segunda estimulação com LPS para observar a síntese dessas citocinas.

O LPS desencadeou aumento na secreção de IL-1 β e IL-12 nos macrófagos peritoneais de animais AIRmax^{RR} seguido por AIRmax^{SS}, confirmando os dados de Carneiro et al. (2008), onde a seleção que os camundongos sofreram para máxima resposta inflamatória interferiu na indução da síntese de IL-1 β . Já a fixação dos alelos *Slc11a1*^{RR} ou *Slc11a1*^{SS} promove um aumento ou diminuição, respectivamente, da síntese desta citocina. Da mesma forma que nos trabalhos anteriores, nossos resultados também mostraram que a síntese de IL-6 ocorreu em níveis semelhantes em todas as sublinhagens, indicando que a síntese de IL-6 não parece ser influenciada pela seleção genética nem pela fixação diferencial dos alelos do gene *Slc11a1*. Ao avaliar a síntese de TNF- α , encontramos que na estimulação com LPS, as células pertencentes aos animais AIRmax^{RR} são as únicas que produzem a citocina.

Ao analisar a síntese de IL-1 β , IL-12 e TNF- α nos macrófagos das sublinhagens infectadas com *M. bovis* BCG, encontramos que a infecção com a bactéria foi suficiente para desencadear ativação celular com a conseqüente secreção de citocinas nos camundongos AIRmax^{RR}, mas foi necessária a segunda estimulação com LPS para induzir a estimulação das outras sublinhagens. Sugerimos que a alta secreção destas citocinas nos camundongos AIRmax^{RR}, esteja relacionada ao controle da proliferação do BCG nos animais infectados promovendo uma retroalimentação positiva de ativação das células competentes. A ativação celular estaria relacionada à seleção genética que sofreram esses animais conjuntamente com a fixação do alelo de resistência do gene *Slc11a1*.

O BCG induziu a síntese de IL-6 somente nos macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}. Cabe ressaltar ainda que os camundongos AIRmax^{RR} produzem maiores quantidades de IL-6 que os camundongos AIRmax com o alelo *Slc11a1*^{SS}. Entretanto, a segunda estimulação com LPS induziu nos macrófagos dos camundongos infectados com *M. bovis* BCG um aumento na síntese de IL-6 e TNF- α , em todas as sublinhagens. No entanto, o LPS induziu a síntese de IL-1 β e IL-12 em maior concentração nos macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}.

Diferentemente das citocinas inflamatórias: IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α , que são secretadas preferencialmente pelas células provenientes da linhagem AIRmax, a IL-10 foi secretada principalmente pelos macrófagos da linhagem AIRmin. O tioglicolato induziu uma pequena secreção de IL-10 em todas as sublinhagens e a estimulação com LPS induziu aumento na síntese de IL-10 especialmente nos animais das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS}. Quando os animais foram infectados com *M. bovis* BCG, os camundongos derivados da linhagem AIRmin produziram maiores concentrações de IL-10 e na presença do

LPS o aumento desta citocina foi estatisticamente maior somente nas células dos animais AIRmin^{SS}. Provavelmente, por ser uma citocina anti-inflamatória, os camundongos AIRmin estão direcionados a secretar a IL-10 independente do tipo de inflamação desencadeada nesses camundongos. Na linhagem AIRmax a secreção da citocina IL-10 seria um mecanismo de regulação da alta capacidade inflamatória inerente a esta linhagem.

Mosser e Edwards (2008) descreveram um modelo onde a plasticidade dos macrófagos varia segundo o estímulo fornecido no momento da ativação. Assim os macrófagos ativados por uma via clássica, estimulados por LPS produzem altos níveis de IL-12 e baixos níveis de IL-10; os macrófagos descritos como reguladores são ativados pela presença de imunocomplexos e antagonistas de receptores do tipo TLR produzindo baixos níveis de IL-12 e altos níveis de IL-10; e por fim os macrófagos encontrados em processos de cicatrização que são ativados pela IL-4, produzem altos níveis de IL-12 e IL-10.

Quando comparamos as populações descritas por Mosser e Edwards (2008) com os macrófagos peritoneais das nossas sublinhagens, podemos correlacionar os macrófagos das sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} com os macrófagos ativados pela via clássica, pois eles foram capazes de secretar altos níveis de IL-12 e baixas concentrações de IL10, o oposto foi observado nos macrófagos das sublinhagens AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS} o que nos permitiria classificá-los como macrófagos reguladores.

Xing, Zganiacz e Santosuosso (2000) num modelo de infecção pulmonar nos camundongos C57BL/6 (*Slc11a1*^{SS}) com *M. bovis* BCG, observaram que o estímulo causado pela infecção e a estimulação posterior com IFN- γ induzem nos macrófagos alveolares a síntese de IL-12 e TNF α . Ao mesmo tempo, o estímulo pela infecção conjuntamente com a estimulação pelo IL-12 induzem a secreção de IFN- γ havendo assim um sinergismo na secreção de IL-12, IFN- γ e TNF- α na infecção com BCG. Nos camundongos derivados da linhagem AIRmax esse sinergismo foi observado, uma vez que, ao induzir a ativação dos macrófagos pelo BCG, observamos um aumento na secreção e na expressão dessas mesmas citocinas (IL-12, TNF- α e IFN- γ) o que não foi demonstrado na inflamação com o tioglicolato.

Quando observamos a ativação dos macrófagos com base na sua habilidade de produzir diversos tipos de resposta devemos mencionar as populações de macrófagos M1 e M2. Bastos et al. (2000) sabendo que os macrófagos dos camundongos C57Bl/6 (IL-12p40⁺) diferenciam-se em macrófagos M1 na estimulação com LPS, mostrou que os macrófagos dos camundongos IL-12p40KO se diferenciam em macrófagos do tipo M2 nessas mesmas

condições. Macrófagos M1 produzem altas concentrações de NO em resposta ao LPS e ao IFN- γ , falham na síntese de TGF- β 1 mesmo na presença de IFN- γ e apresentam altas taxas microbicidas ao inibir a proliferação do parasita *T. cruzi* (amastigota) num ensaio de fagocitose. Os macrófagos M2 por sua vez, falham na síntese de NO, apresentam altas concentrações de TGF- β 1 e não controlam a proliferação do parasita, indicando a importância da IL-12 na polarização dos macrófagos M1 e M2.

Quando comparamos com nossos resultados, encontramos que na inflamação com tioglicolato as células dos animais AIRmax^{RR} liberam altas concentrações de NO na presença de LPS, assim como altas concentrações de IL-12 e TNF- α demonstrando a polarização em macrófagos M1. No caso contrário, as células dos animais AIRmin^{SS} secretam baixas concentrações de NO na presença ou ausência de LPS e falham na síntese de IL-12 e TNF- α . Poderíamos indicar a polarização destes macrófagos a M2, salvo que estas células expressam baixos níveis de *tgf- β* . Como a expressão dos genes foi avaliada 48 horas após incubação, não sabemos se no início as células expressaram e secretaram altos níveis de *tgf- β* , podendo assim ser consideradas como macrófagos M2. Na infecção poderíamos considerar células M1, os macrófagos dos animais AIRmax^{RR} por serem os únicos que sintetizam IL-12 e TNF- α , salvo as baixas concentrações de NO encontradas. Entretanto, a baixa concentração de NO pode ser devida ao pequeno número de bactérias viáveis remanescentes nestes macrófagos.

A resposta imune contra vírus, bactérias, ou parasitas resulta numa complexa interação de células imuno-efetoras e citocinas. É sabido o papel central da IL-12 na defesa contra microrganismos intracelulares por estimular no hospedeiro a síntese de IFN- γ pelos próprios macrófagos e pelos linfócitos T e células *natural killer* (NK) (TRINCHIERI et al., 1997), a IL-12 também induz ativação de células TCD8 e NK. Na presença de bactérias do gênero *mycobacterium*, a secreção de IL-12 induz a produção de IFN- γ , TNF- α , NO e a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) nos macrófagos, ativando estas células a iniciar a sua função microbicida (GROHMANN et al., 2001; XING; ZGANIACZ; SANTOSUOSSO, 2000).

Nossos resultados mostram que em todas as sublinhagens a estimulação do tioglicolato foi suficiente para induzir a expressão de *il-12* e *tgf- β* . A expressão dos genes de *il-1 β* , *il-6*, *ifn- γ* e *il-10* somente foi observada quando as células foram previamente estimuladas com LPS. Para todos os casos, esta expressão foi dependente da constituição genética dos camundongos AIRmax em conjunção com a fixação do alelo de resistência do gene *Slc11a1*.

Quando avaliaram a expressão gênica das diversas citocinas inflamatórias frente a uma infecção ocasionada pelo *M. bovis* BCG em camundongos *Slc11a1^{RR}* (DBA/2) e *Slc11a1^{SS}* (Balb/c), Mazolla et al. (2002) encontraram a partir do dia 14 após infecção um aumento na expressão de *il-1 β* , *ifn- γ* , *tnf- α* e *il-12* que coincide com a diminuição do gene da *il-6* nos camundongos resistentes DBA/2. Nos camundongos portadores do alelo *Slc11a1^{SS}* os autores encontraram baixa expressão dessas citocinas.

Nossos resultados mostram que a infecção com BCG foi suficiente para induzir a expressão gênica de algumas citocinas, mas diferentemente dos resultados descritos por Mazolla et al. (2002), a expressão não foi restrita aos camundongos que contem o alelo *Slc11a1^{RR}* e sim aos camundongos selecionados para máxima resposta inflamatória AIRmax. A expressão de *il-1 β* , *il-6*, *il-12* e *tgf- β* foi observada nas células dos camundongos AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS}, as sublinhagens provenientes da linhagem AIRmin apresentaram menor expressão relativa dos genes da *il-12* e *tgf- β* , assim como não expressaram os genes de *il-1 β* , *il-6* e *tnf- α* .

Sabe-se que produtos bacterianos como o LPS induzem nos macrófagos a expressão incontrolada de uma variedade de citocinas inflamatórias por parte dos leucócitos. Hume et al. (2002) mostraram uma lista de genes envolvidos na ativação dos macrófagos, entre as quais destacamos *tnf- α* , *il-1*, *il-12*, *il-6*, *il-10*, *il-15*, *ifn- β* e *ifn- γ* .

Em termos gerais, a segunda estimulação com LPS nos macrófagos dos camundongos das 4 sublinhagens infectados com BCG induziu um aumento de expressão de algumas citocinas (*il-1 β* , *il-6* e *tnf- α*) e a diminuição de outras (*tgf- β* e *il-12* com exceção de AIRmin^{SS}). Quando avaliamos a expressão gênica comparando cada uma das sublinhagens encontramos um padrão de resposta variado. Seguindo o padrão de alta e baixa resposta inflamatória (AIRmax e AIRmin) a expressão de *il-1 β* e *ifn- γ* foi favorecida pelo alelo *Slc11a1^{RR}*, enquanto a expressão de *il-6* não foi influenciada por este polimorfismo. Há expressão menor dos genes da *il-18* e *il-4* nos animais AIRmax em relação aos AIRmin, enquanto que o gene do *tnf- α* é expresso em níveis mais altos pela sublinhagem AIRmax^{RR}. Em vista destas oscilações, concluímos que foram mais esclarecedores os resultados que obtivemos com macrófagos apenas estimulados *in vivo* com o BCG, tanto na expressão dos transcritos como na secreção das citocinas, que evidenciaram um provável predomínio de macrófagos M1 ou M2 nas sublinhagens AIRmax^{RR} e AIRmin^{SS}, respectivamente.

No presente trabalho foi mostrada interferência do gene *Slc11a1* na ativação celular frente a uma inflamação com tioglicolato e infecção com *M. bovis* BCG. Na infecção

encontramos um efeito aditivo na síntese e secreção da citocinas IL-1, TNF- α , IL-12 e IL-6 nos macrófagos provenientes de animais com fundo genético AIRmax que expressam o alelo R do gene *Slc11a1*, a alta síntese de citocinas está relacionada com o controle da multiplicação da bactéria no baço, influenciando a diminuição na síntese de NO, uma vez que a quantidade de bactéria foi controlada.

Ao avaliar a atuação do gene *Slc11a1* na inflamação com tioglicolato, encontramos que o fundo genético AIRmax foi mais importante que a presença dos diferentes alelos do gene *Slc11a1* na secreção de citocinas. Porém na síntese de NO a influência do alelo *Slc11a1*^{RR} foi mais importante que a seleção genética para resposta inflamatória, já que macrófagos dos animais AIRmax^{RR} e AIRmin^{RR} produziram maiores quantidades NO quando comparados com os camundongos das sublinhagens portadoras do gene *Slc11a1*^{SS}.

Trabalhos recentes de nosso laboratório utilizando ensaios de ligação de marcadores genéticos com fenótipos e empregando técnica de rastreamento genômico em larga escala com SNPs, definiu uma região do genoma com ligação altamente significante com a reatividade inflamatória. O fenótipo que apresentou esta alta significância foi a produção de IL-1 β pela estimulação do inflamossomo em ensaio *in vitro*, por associação com SNPs localizados no cromossomo 7 no locus *Irm1* (GALVAN et al., 2011; VORRARO et al., 2010). Como o macrófago está envolvido na ativação do inflamossomo e na produção de IL-1 β , este estudo é importante para elucidar os mecanismos que diferenciam as linhagens, em especial os relacionados à atividade destas células.

Sabendo-se que os alelos R e S do gene *Slc11a1* interagem com os loci reguladores de alta e baixa inflamação aguda, modulando vários fenótipos, como influxo de neutrófilos e exsudato proteico após inflamação com biogel (BORREGO et al., 2006), sensibilidade a artrite induzida por pristane (PETERS et al., 2007), regeneração de tecido (CANHAMERO et al., 2011; DE FRANCO et al., 2007) e os níveis de citocinas envolvidos nos diversos processos inflamatórios, realizamos neste estudo avaliação da atividade de macrófagos presentes no foco inflamatório nos animais selecionados para diferente capacidade inflamatória que possuem os alelos de resistência ou susceptibilidade do gene *Slc11a1*. As diferenças entre as linhagens aqui relatadas poderão agora ser correlacionados com regiões cromossômicas, uma vez que os genes candidatos envolvidos na regulação da AIR estão sendo mapeados nestas duas linhagens.

Nosso modelo experimental simula populações naturais e poderá contribuir no estudo da resistência e suscetibilidade de algumas pessoas frente a infecções bacterianas. Definir a

influência do polimorfismo do gene *Slc11a1* na ativação de macrófagos pode auxiliar na elucidação de mecanismos do sistema imune que atuam contra agentes patológicos como os pertencentes à família *Mycobacterium*.

6 CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos resultados demonstram que:

- a) a sublinhagem AIRmax^{RR} controla com maior eficiência a proliferação da bactéria tanto na infecção (*in vivo*) como na fagocitose (*in vitro*), diferentemente da sublinhagem AIRmin^{SS} que além não controlar a proliferação do BCG, não fagocita a bactéria *in vitro*. Concluimos que o alelo R do gene *Slc11a1* está atuando no controle da infecção e o alelo S na suscetibilidade ao BCG;
- b) a migração celular para a cavidade peritoneal é mais intensa na infecção com o *M. bovis* BCG que na inflamação com o tioglicolato. Assim mesmo, em ambos os estímulos é encontrada uma população celular que expressa os marcadores F4/80^{lo}CD11b^{hi}CD11c⁻ que difere da população encontrada nos camundongos controles que expressa F4/80^{hi}CD11b^{hi}CD11c⁻;
- c) na inflamação, a secreção de peróxido de hidrogênio e de NO não são eventos influenciados pela seleção genética AIR nem pelos alelos R ou S do gene *Slc11a1*. Na infecção com BCG, o aumento na secreção de H₂O₂ e na secreção de NO é devida ao maior número de bactérias presentes na infecção, neste caso maior nos animais AIRmin;
- d) a inflamação desencadeada pelo tioglicolato necessita de um segundo estímulo dado pelo LPS para induzir a ativação celular. Quando este segundo estímulo é fornecido, os macrófagos derivados da linhagem AIRmax são os únicos a secretar as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α ;
- e) a infecção por si só induz apenas os macrófagos da sublinhagem AIRmax^{RR} a secretarem as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-12 e TNF- α . O estímulo com LPS induz a secreção dessas citocinas nas outras sublinhagens (AIRmax^{SS}, AIRmin^{RR} e AIRmin^{SS});
- f) a expressão gênica de *il-1 β* , *il-6*, *tgf- β* e *ifn- γ* é mais intensa nos macrófagos dos animais AIRmax^{RR} e AIRmax^{SS} estimulados com BCG que nos tratados com tioglicolato.

REFERÊNCIAS¹

- ADEREM, A.; UNDERHILL, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 593-623, 1999.
- ALDWELL, F. E.; WEDLOCK, D. N.; SLOBBE, L. J.; GRIFFIN, J. F. T.; BUDDLE, B. M.; BUCHAN, G. S. In vitro control of *Mycobacterium bovis* by macrophages. **Tuberculosis (Edinb)**, v. 81, n. 1-2, p. 115-123, 2001.
- ALDWELL, F. E.; WEDLOCK, D. N.; BUDDLE, B. M. Bacterial metabolism, cytokine mRNA transcription and viability of bovine alveolar macrophages infected with *Mycobacterium bovis* BCG or virulent *M bovis*. **Immunology and Cell Biology**, v. 74, p. 45-51, 1996.
- ARAKI, N.; JOHNSON, M. T.; SWANSON, J. A. A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. **J. Cell Biol.**, v. 135, p. 1249-1260, 1996.
- ARAÚJO, L. M. M.; RIBEIRO, O. G.; SIQUEIRA, M.; STAROBINAS, N.; MASSA, S.; CABRERA, W. H.; MOUTON, D.; SEMAN, M.; IBÁÑEZ, O. M. Innate resistance to infection by intracellular bacterial pathogens differs in mice selected for maximal or minimal acute inflammatory response. **Eur. J. Immunol.**, v. 28, p. 2913-2920, 1998.
- ARRUDA, A. G. F. **Estudo comparativo da ativação de macrófagos de linhagens de camundongos geneticamente selecionados para a reatividade inflamatória aguda**. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- BARRERA, L. F.; KRAMNIK, I.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Nitrite production by macrophages derived from BCG-resistant and susceptible congenic mouse strains in response to IFN- γ and infection with BCG. **Immunology**, v. 82, p. 457-464, 1994.
- BARTON, C. H.; WHITEHEAD, S. H.; BLACKWELL, J. M. Nramp1 transfection transfers Ity/Lsh/Bcg-related pleiotropic effects on macrophage activation: influence on oxidative burst and nitric oxide pathways. **Mol. Med.**, v. 1, p. 267-279, 1995.
- BASTOS, K. R.; ALVAREZ, J. M.; MARINHO, C. R.; RIZZO, L. V.; IMPERIO, M. R. Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. **J. of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 271-278, 2002.
- BELLINGER, K. C.; HORWITZ, M. A. Complement component C3 fixes selectively to the major outer membrane protein (MOMP) of *Legionella pneumophila* and mediates phagocytosis of liposome-MOMP complexes by human monocytes. **J. Exp. Med.**, v. 172, p. 1201-1210, 1990.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BIOZZI, G.; RIBEIRO, O. G.; SARAN, A.; ARAÚJO, M. L.; MARIA, D. A.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. K.; SANT'ANNA, O. A.; MASSA, S.; COVELLI, V.; MOUTON, D.; NEVEU, T.; SIQUEIRA, M.; IBAÑEZ, O. M. Effect of genetic modification of acute inflammatory responsiveness on tumorigenesis in the mouse. **Carcinogenesis**, v. 19, p. 337-346, 1998.

BLACKWELL, J. M.; GOSWAMI, T.; EVANS, C. A. W.; SIBTHORPE, D.; PAPO, N.; WHITE, J. K.; SEARLE, S.; MILLER, N. E.; PEACOCK, C. S.; MOHAMMED, H.; IBRAHIM, M. SLC11A1 (formerly NRAM1) and disease resistance. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 12, p. 773-784, 2001.

BLACKWELL, J. M.; ROBERTS, C. W.; ROACH, T. I. A.; ALEXANDER, J. Influence of macrophage resistance gene Lsh/Ity/Bcg (candidate Nram1) on *Toxoplasma gondii* infection in mice. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 97, p. 107-112, 1994.

BORREGO, A.; PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; STAROBINAS, N.; SEMAN, M.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Genetic determinants of acute inflammation regulate *Salmonella* infection and modulate *Slc11a1* gene (formerly Nram1) effects in selected mouse lines. **Microbes. Infect.**, v. 8, p. 2766-2771, 2006.

BOU GHOSN, E. E.; CASSADO, A. A.; GOVONI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, K. R.; ALMEIDA, S. R.; HERZENBERG, L. A.; HERZENBERG, L. A. Two physically, functionally, and developmentally distinct peritoneal macrophage subsets. **PNAS**, v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

BRADLEY D. J.; TAYLOR B. A.; BLACKWELL J. M.; EVANS E. P.; FREEMAN J. Regulation of *Leishmania* population within the host. III. Mapping of the locus controlling susceptibility to visceral leishmaniasis in the mouse. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 37, n. 1, p. 7-14, 1979.

BRODIN, P.; DE LONGE, M.; MAJLESSI, L.; LECLERC, C.; NILGES, M.; COLE, S. Functional analysis of early secreted antigenic Target-6, the dominant T-cell antigen of *Mycobacterium tuberculosis*, reveals key residues involved in secretion, complex formation, virulence, and immunogenicity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 40, p. 33953-33959, 2005.

BROWN, I. N.; GLYNN, A. A.; PLANT, J. Inbred mouse strain resistance to *Mycobacterium lepraemurium* follows the Ity/Lsh pattern. **Immunology**, v. 47, p. 149-156, 1982.

BROWN, G. D.; GORDON, S. Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. **Nature**, v. 413, p. 36-37, 2001.

BUU, N.; SANCHEZ, F.; SCHURR, E. The *Bcg* Host-Resistance gene. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 3, p. S81-85, 2000.

CANHAMERO, T.; REINES, B.; PETERS, L. C.; BORREGO, A.; DOS SANTOS CARNEIRO, P.; ALBUQUERQUE, L. L.; CABRERA, W. H.; RIBEIRO, O. G.; JENSEN, J. R.; STAROBINAS, N.; IBAÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. Distinct early inflammatory events during ear tissue regeneration in mice selected for high inflammation bearing *Slc11a1* R and S alleles. **Inflammation**, v. 34, n. 5, p. 303-313, 2010.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; DE FRANCO, M.; IBÁÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Bothrops jararaca venom (BjV) induces differential leukocyte accumulation in mice genetically selected for acute inflammatory reaction: the role of host genetic background on expression of adhesion molecules and release of endogenous mediators. **Toxicon**, v. 52, n. 5, p. 619-627, 2008.

CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; CABRERA, W. H.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBÁÑEZ, O. M.; STAROBINAS, N. Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. **Toxicon**, v. 40, p. 1571-1579, 2002

CHERNOUSOVA, L. N.; SMIRNOVA, T. G.; AFANASIEVA, E. G.; KARPOV, V. L.; TIMOFEEV, A. V. Ex Vivo Production of Interferon- γ , Tumor Necrosis Factor- α , and Interleukin-6 by Mouse Macrophages during Infection with *M. bovis* and *M. tuberculosis* H37Rv. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine, Microbiology and Immunology**, v. 144, n. 5, p. 709-712, 2007.

COUTO TEIXEIRA, H.; ABRAMO, C.; MUNK, M. E. Diagnóstico imunológico da tuberculose: problemas e estratégias para o sucesso. **J. Bras. Pneumol.**, v. 33, n. 3, p. 323-334, 2007.

COX, D.; TSENG, C. C.; BJEKIC, G.; GREENBERG, S. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 1240-1247, 1999.

DE CHASTELLIER, C.; THILO, L. Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 74, n. 1, p. 49-62, 1997.

DE FRANCO, M.; CARNERO, P. S.; PETERS, L. C.; VORRARO, F.; BORREGO, A.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; CABRERA, W. K.; IBÁÑEZ, O. M. *Slc11a1* (Nramp1) alleles interact with acute inflammation loci to modulate wound-healing traits in mice. **Mamm. Genome**, v. 4, p. 263-269, 2007.

DENIS, M.; FORGET, A.; PELLETIER, M.; SKAMENE, E. Pleiotropic effects of the Bcg gene: III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 73, p. 370-375, 1988.

DI CARLO, F. J.; FIORE, J. V. On the composition of zymosan. **Science**, v. 127, p. 756-757, 1958.

DRATH, D. B.; KARNOVSKY, M. L. Superoxide production by phagocytic leukocytes. **J. Exp. Med.**, v. 141, n. 1, p. 257-262, 1975.

DUCATI, R. G.; BASSO, L. A.; SANTOS, D. S. Micobactérias. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Livro de microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 409-447.

DUNN, P.; NORTH, R. J. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* Strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 9, p. 3428-3437, 1995.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's alarm cells? **Agents Actions**, v. 10, n. 3, p. 229-230, 1980.

FORBES, J. R.; GROS, P. Divalent-metal transport by Nramp1 proteins at the interface of host-pathogen interactions. **Trends Microbiol.**, v. 9, p. 397-403, 2001.

FREHEL, C.; DE CHASTELLIER, C.; LANG, T.; RASTOGI, N. Evidence for inhibition of fusion of lysosomal and prelysosomal compartments with phagosomes in macrophages infected with pathogenic *Mycobacterium avium*. **Infect. Immun.**, v. 52, n. 1, p. 252-262, 1986.

GALVAN, A.; VORRARO, F.; CABRERA, W.; RIBEIRO, O. G.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; DOS SANTOS CARNEIRO, P.; DE FRANCO, M.; GAO, X.; IBÁÑEZ, O. M.; DRAGANI, T. A. Association study by genetic clustering detects multiple inflammatory response loci in non-inbred mice. **Genes Immun.**, v. 12, n. 5, p. 390-394, 2011.

GEISSMANN, F.; JUNG, S.; LITTMAN, D. R. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. **Immunity**, v. 19, p. 71-82, 2003.

GIULIETTI, A.; OVERBERG, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 386-401, 2001.

GOMES, M. S.; APPELBERG, R. Evidence for a link between iron metabolism and *Nramp 1* gene function in innate resistance against *Mycobacterium avium*. **Immunology**, v. 95, p. 165-168, 1998.

GOMES, M. S.; BOELAERT, J. R.; APPELBERG, R. Role of iron in experimental *Mycobacterium avium* infection. **J. Clin. Virology**, v. 20, p. 117-122, 2001.

GORDON, S.; TAYLOR, P. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.

GOTO, Y.; BUSCHMAN, E.; SKAMENE, E. Regulation of host resistance to *Mycobacterium intracellulare* *in vivo* and *in vitro* by the *Bcg* gene. **Immunogenetics**, v. 30, p. 218-221, 1989.

GOVONI, G.; GAUTHIER, S.; BILLIA, F.; ISCOVE, N. N.; GROS, P. Cell-specific and inducible *Nramp1* gene expression in mouse macrophages *in vitro* and *in vivo*. **J. Leukoc. Biol.**, v. 62, p. 277, 1997.

GOVONI, G.; VIDAL, S.; CELLIER, M.; LEPAGE, P.; MALO, D.; GROS, P. Genomic structure, promoter sequence, and induction of expression of the mouse *Nramp1* gene in macrophages. **Genomics**, v. 27, n. 1, p. 9-19, 1995.

GROHMANN, U.; BELLADONNA, M. L.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; FALLARINO, F.; ORABONA, C.; FIORETTI, M. C.; PUCCETTI, P. Positive regulatory role of IL-1 β in macrophages and modulation by IFN- γ . **J. Immunol.**, v. 167, p. 221-227, 2001.

GROS, P.; SKAMENE, E.; FORGET, A. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. **J. Immunol.**, v. 127, p. 2417-2421, 1981.

GRUENHEID, S.; PINNER, E.; DESJARDINS, M.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular pathogens: The Nramp1 protein recruited to the membrane of the phagosome. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 717-730, 1997.

HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 2, p. 351-364, 1998.

HANANO, R.; KAUFMANN, S. H. E. Nitric oxide production and mycobacterial growth inhibition by murine alveolar macrophages: the sequence of rIFN- γ stimulation and *Mycobacterium bovis* BCG infection determines macrophage activation. **Immunology Letters**, v. 45, p. 23-27, 1995.

HART, D.; ARMSTRONG, J. A.; BROWN, C. A.; DRAPER, P. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. **Infection and Immunity**, v. 5, n. 5, p. 803-807, 1972.

HUME, D. A.; ROSS, I. L.; HIMES, S. R.; SASMONO, R. T.; WELLS, C. A.; RAVASI, T. The mononuclear phagocyte system revisited. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 72, p. 621-627, 2002.

IBAÑEZ, O. M.; STIFFEL, C.; RIBEIRO, O. G.; CABRERA, W. K.; MASSA, S.; DE FRANCO, M.; SANT'ANNA, O. A.; DECREUSEFOND, C.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Genetics of nonspecific immunity: I. bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 10, p. 2555-2563, 1992.

JAFFE, E. A.; RUGGIERO, J. T.; FALCONE, D. J. Monocytes and Macrophages Synthesize and Secrete Thrombospondin. **Blood**, v. 65, p. 79-84, 1985.

KHANDOGA, A. G.; KHANDOGA, A.; REICHEL, C. A.; BIHARI, P.; REHBERG, M.; KROMBACH, F. *In vivo* imaging and quantitative analysis of leukocyte directional migration and polarization in inflamed tissue. **PloS One**, v. 4, n. 3, p. e4693, 2009.

KITA, E.; EMOTO, M.; OKU, D.; NISHIKAWA, F.; HAMURO, A.; KAMIKAIDOU, N.; KASHIBA, S. Interferon gamma and membrane-associated interleukin 1 to the resistance to murine typhoid of Ityr mice. **J. Leukoc. Biol.**, v. 51, n. 3, p. 244-250, 1992.

LANGER, H. F.; CHAVAKIS, T. Leukocyte-endothelial interactions in inflammation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 7, p. 1211-1220, 2009.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 35, p. 655-677, 1995.

LAWRENCE, M. B.; SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**, v. 65, p. 859-873, 1991.

- LECLERCQ, V.; LEBASTARD, M.; BELKAID, Y.; LOUIS, J.; MILON, G. The outcome of the parasitic process initiated by *Leishmania infantum* in laboratory mice. a tissue-dependent pattern controlled by the Lsh and MHC loci. **J. Immunol.**, v. 157, p. 4537-4545, 1996.
- LISSNER, C. R.; SWANSON, R. N.; O'BRIEN, A. D. Genetic control of the innate resistance of mice to *Salmonella* Typhimurium: expression of the Ity gene in peritoneal and splenic macrophages isolated in vitro. **J. Immunol.**, v. 131, p. 3006-3013, 1983.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- MALO, D.; VOGAN, K.; VIDAL, S.; HU, H.; CELLIER, M.; SCHURR, E.; FUKS, A.; BUMSTEAD, N.; MORGAN, K.; GROS, P. Haplotype mapping and sequence analysis of the mouse *Nramp* gene predicts susceptibility to infection with intracellular parasites. **Genomics.**, v. 23, p. 51-61, 1994.
- MAZZOLLA, R.; PULITI, M.; BARLUZZI, R.; NEGLIA, R.; BISTONI, F.; BARBOLINI, G.; BLASI, E. Differential microbial clearance and immunoresponse of Balb/c (Nramp1 susceptible) and DBA2 (Nramp1 resistant) mice intracerebrally infected with *Mycobacterium bovis* BCG (BCG). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 149-158, 2002.
- MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.
- NASCIMENTO, F. R. F.; CALICH, V. L. G.; RODRÍGUEZ, D.; RUSSO, M. Dual Role for Nitric Oxide in Paracoccidioidomycosis: Essential for resistance, but overproduction associated with susceptibility. **The Journal of Immunology**, v. 168, p. 4593-4600, 2002.
- NATHAN, C. F.; ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: dependence on sequential activation and triggering. **J. Exp. Med.**, v. 146, p. 1648-1662, 1977.
- NELSON, D. J.; JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes derived macrophages. **J. Membr. Biol.**, v. 117, p. 29-44, 1990.
- NEVEU, P. J. The mononuclear phagocyte system. **Bull. Inst. Pasteur**, v. 84, p. 24-66, 1986.
- PEARSON, A. M. Scavenger receptors in innate immunity. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, n. 1, p. 20-28 1996.
- PETERS, L. C.; JENSEN, J. R.; BORREGO, A.; CABRERA, W. K.; BAKER, N.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO, O. G.; IBÁÑEZ, O. M.; DE FRANCO, M. *Slc11a1* (formerly Nramp1) gene modulate both acute inflammatory reactions and pristane-induced arthritis in mice. **Genes and Immunity**, v. 8, p. 51-56, 2007.
- POMMIER, C. G.; INADA, S.; FRIES, L. F.; TAKAHASHI, T.; FRANK, M. M.; BROWN, E. J. Plasma fibronectin enhances phagocytosis of opsonized particles by human peripheral blood monocytes. **J. Exp. Med.** v. 157, p. 1844-54, 1983.

PULITI, M.; RADZIOCH, D.; MAZZOLLA, R.; BARLUZZI, R.; BISTONI, F.; BLASI, E. Influence of the Bcg locus on macrophage response to the dimorphic fungus *Candida albicans*. **Infect. Immun.**, v. 63, p. 4170-4173, 1995.

RAVETCH, J. V.; BOLLAND, S. IgG Fc receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 19, p. 275-290, 2001.

RIBEIRO, O. G.; DURVANEI, A. M.; ADRIOUCH, S.; PECHBERTY, S.; CABRERA, W. K.; MORISSET, J.; IBAÑEZ, O. M.; SEMAN, M. Convergent alteration of granulopoiesis, chemotactic activity, and neutrophil apoptosis during mouse selection for high acute inflammatory response. **J. Leukoc. Biol.**, v. 74, n. 4, p. 497-506, 2003.

ROSS, G. D.; REED, W.; DALZELL, J. G.; BECKER, S. E.; HOGG, N. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. **J. Leuk. Biol.**, v. 51, p. 109-117, 1992.

SCHINDLER, H.; LUTZ, M. B.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18 activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. **J. Immunology**, v. 166, p. 3075-3082, 2001.

SCHLESINGER, L. S.; BELLINGER-KAWAHARA, C. G.; PAYNE, N. R.; HORWITZ, M. A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. **J. Immunol.**, v. 144, n. 7, p. 2771-2780, 1990.

SCHOREY, J. S.; CARROLL, M. C.; BROWN, E. J. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. **Science**, v. 277, p. 1091-1093, 1997.

SCHURR, E.; MALO, D.; RADZIOCH, D.; BUSCHMAN, E.; MORGAN, K.; GROS, P.; SKAMENE, E. Genetic control of innate resistance to mycobacterial infections. **Immunol. Today**, v. 12, n. 3, p. A42-A45, 1991.

SCHURR, E.; SKAMENE, E.; FORGET, A.; GROS, P. Linkage analysis of the Bcg gene on mouse chromosome 1. Identification of a tightly linked marker. **J. Immunol.**, v. 142, n. 15, p. 4507-4513, 1989.

SMALE, S. T. Core promoter architecture for eukaryotic protein-coding genes. In: CONAWAY, R. C.; CONAWAY, J. W. **Transcription: mechanisms and regulation**. New York: Raven Press, 1994. p. 63-81.

SPITALNY, G. L. Dissociation of bactericidal activity from other functions of activated macrophages in exudates induced by thioglycolate medium. **Infect. Immun.**, v. 34, n. 1, p. 274-284, 1981.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 82, p. 7738-7742, 1985.

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

TAYLOR, P.; MARTINEZ-POMARES, L.; STACEY, M.; LIN, H-H.; BROWN, G. D.; GORDON, S. Macrophage Receptors and Immune Recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 901-944, 2005.

TAYLOR, P.; BROWN, G.; GELDHOF, A.; MARTINEZ-POMARES, L.; GORDON, S. Pattern recognition receptors and differentiation antigens define murine myeloid cell heterogeneity *ex vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, n. 8, p. 2090-2097, 2003.

TOSI, M. F. Innate immune response to infection. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 116, p. 241-249, 2005.

TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Curr. Opin. Immunol.**, v. 9, p. 17-23, 1997.

TSAO, T. C. Y.; HONG, J.; HUANG, C.; YANG, P.; LIAO, S. K.; CHANG, K. S. S. Increased TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels in the bronchoalveolar lavage fluid with the upregulation of their mRNA in macrophages lavaged from patients with active pulmonary tuberculosis. **Tubercle and Lung Disease**, v. 79, n. 5, p. 279-285, 1999.

TSUKAMOTO, Y.; HELSEL, W. E.; WAHL, S. M. Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts. **J. Immunol.**, v. 127, p. 673-678, 1981.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 20, p. 825-852, 2002.

VIDAL, S. M.; GROS, P.; SKAMENE, E. Natural resistance to infection with intracellular parasites: molecular genetics identifies Nramp-1 as the Bcg/Ity/Lsh locus. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 58, p. 382-390, 1995.

VIDAL, S. M.; MALO, D.; VOGAN, K.; SKAMENE, E.; GROS, P. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. **Cell**, v. 73, n. 3, p. 469-485, 1993.

VILLACRES-ERIKSSON, M. Antigen presentation by naive macrophages, dendritic cells and B cells to primed T lymphocytes and their cytokine production following exposure to immunostimulating complexes. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 102, p. 46-52, 1995.

VORRARO, F.; GALVAN, A.; CABRERA, W. K.; DOS SANTOS CARNEIRO, P.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M.; STAROBINAS, N.; JENSEN, J. R.; SEMAN, M.; DRAGANI, T. A.; IBÁÑEZ, O. M. Genetic Control of IL-1² production and inflammatory response by the mouse Irm1 locus. **J. Immunol.**, v. 185, n. 3, p. 1616-1621, 2010.

WEISS, S. J.; KING, G. W.; LOBUGLIO, A. F. Evidence for Hydroxyl Radical Generation by Human Monocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 60, p. 370-373, 1977.

WOJCCIECHOWSKI, W.; DESANCTIS, J.; SKAMENE, E.; RADZIOCH, D. Attenuation of MHC class II expression in macrophages infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin involves class II transactivator and depends on the *Nramp1* gene. **J. Immunol.**, v. 163, p. 2688-2696, 1999.

XING, Z.; ZGANIACZ, A.; SANTOSUOSSO, M. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. **J. Leukoc. Biol.**, v. 68, p. 897-902, 2000.

YOSHIDA, A.; KOIDE, Y.; UCHIJIMA, M.; O. YOSHIDA, T. Dissection of strain Difference in Acquired protective immunity against *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin Bacillus (BCG). Macrophages regulate the susceptibility through cytokine network and the induction of nitric oxide synthetase. **The Journal of Immunology**, v. 155, p. 2057-2066, 1995.

ZHANG, G.; WU, H.; ROSS, C. R.; MINTON, J. E.; BLECHA, F. Cloning of Porcine NRAMP1 and Its Induction by Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-1b: Role of CD14 and Mitogen-Activated Protein Kinases. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 3, p. 1086-1093, 2000.