



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

O papel do receptor do tipo Toll 6 na resposta imune contra a infecção pela bactéria *Mycobacterium avium*

Fábio Antônio Vitarelli Marinho

Belo Horizonte, MG
Abril de 2013

Fábio Antônio Vitarelli Marinho

**O papel do receptor do tipo
Toll 6 na resposta imune
contra a infecção pela
bactéria *Mycobacterium
avium***

**Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em
Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito para a obtenção do título de Doutor em
Imunologia**

Área de Concentração: Imunologia

**Orientador: Prof. Sergio Costa Oliveira
Universidade Federal de Minas Gerais**

**Belo Horizonte
2013**

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Rita e Herivelto,
pilares onde me sustento
e exemplos aos quais recorro*

Agradecimentos

No desenvolvimento deste trabalho muitas foram as dificuldades. No entanto, maior foi o número de amigos que dividiram comigo os percalços do caminho. A todos estes, o meu mais sincero agradecimento.

Agradeço inicialmente a Deus por todos os momentos de minha vida;

Ao Prof. Sergio Costa Oliveira pela orientação, confiança e oportunidades proporcionadas durante todo o tempo de nossa convivência;

À Rafaella Rocha de Paula pelo auxílio, suporte e companheirismo tão presentes durante o desenvolvimento deste trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas (LIDianos), principalmente Leonardo de Almeida (Léo) e Marco Túlio Gomes (Túlio-san), e aos ex-LIDianos pelo auxílio nos experimentos e por proporcionar momentos únicos e inesquecíveis no ambiente de trabalho;

À Sandra Fernandes pela amizade, conselhos e grande ajuda no laboratório;

À Dr. Natália Carvalho (Nat) e à Dr. Fernanda de Oliveira (Fê V) pela amizade e por me introduzirem nesse “mundo micobacteriano”;

Ao Prof. Marcelo Caliarí, Prof. Aristóboło Mendes, Prof. João Marques e Prof. André Báfica pelas valiosas sugestões e colaborações na realização deste trabalho;

Aos membros da banca, por terem aceitado o convite;

Aos professores, funcionários e técnicos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, e ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela excelente formação profissional que me possibilitaram;

Aos meus pais, Herivelto e Rita, meus irmãos, Luan, Lucas e Luana, aos meus parentes e aos meus amigos pelo apoio incondicional em todos os momentos dessa caminhada;

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigado!

*“Se fui capaz de ver ao longe,
foi por estar de pé no ombro de gigantes.”*
Isaac Newton

Resumo

A resposta imune inata corresponde à primeira linha de defesa contra as infecções, onde os receptores do tipo Toll (TLRs) são importantes no reconhecimento de patógenos. A ativação de TLRs leva à produção de citocinas e outros mecanismos necessários ao controle eficiente de infecções. O *Mycobacterium avium* é um importante patógeno oportunista que infecta principalmente indivíduos imunocomprometidos. No presente trabalho foi avaliada a participação do receptor TLR6 no reconhecimento e controle da infecção pelo *M. avium*. O ensaio de luciferase e transfecção de TLRs em células HEK 293 mostrou o TLR6 age sinergicamente com o TLR2 no reconhecimento do *M. avium* e na ativação de NF- κ B. Corroborando com esse dado, a infecção por *M. avium* leva ao aumento da expressão de TLR6 e TLR2 em macrófagos (BMMs) e células dendríticas (BMDCs) murinos derivados da medula óssea. Além disso, a deficiência em TLR6 reduz a produção de TNF- α , IL-12 e IL-6 em BMDCs e aumenta a susceptibilidade de BMMs à infecção pelo patógeno. A investigação das vias de sinalização intracelular revelou que a fosforilação de JNK, ERK1/2 e p38 é dependente deste receptor em ambos os tipos celulares estimuladas com *M. avium*. É interessante ressaltar que neste sistema MyD88, TLR6 e TLR2 influenciam significativamente a ativação de NF- κ B em células dendríticas, apesar de serem apenas parcialmente relevantes em macrófagos. As análises *in vivo* demonstraram que camundongos deficientes para TLR6 infectados pelo patógeno apresentam maior carga bacteriana no baço, fígado e pulmões do que os animais selvagens, indicando que este receptor é necessário ao controle eficiente desta infecção. No entanto, o TLR6 não está envolvido na produção de IFN- γ ou TNF- α por esplenócitos. De fato, o nível dessas citocinas estava alterado apenas em camundongos MyD88 KO. Além disso, a análise por citometria de fluxo revelou que apenas a deficiência em MyD88 reduziu a porcentagem de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺

produtores de IFN- γ no baço. O nível dessa citocina medido diretamente no tecido pulmonar estava significativamente reduzido em animais TLR6 ou TLR2 KO comparados aos camundongos selvagens. Por outro lado, a área dos granulomas observados no fígado estava reduzida somente em camundongos MyD88 KO. Ademais, o bloqueio de TLR6 em células da linhagem monocítica humana THP-1 estimuladas por *M. avium* reduziu a produção de TNF- α e a ativação de MAPKs, indicando que os dados observados em camundongos podem ser extrapolados para seres humanos.

Abstract

The innate immune response corresponds to the first line defense against infections, with the Toll-like receptors (TLRs) being important to pathogen recognition. The activation of TLRs leads to the production of cytokines and other immune mechanisms necessary to the efficient control of infections. The *Mycobacterium avium* is an important opportunistic pathogen that infects principally immunocompromised individuals. In the present study we evaluated the participation of TLR6 in the recognition and control of *M. avium* infection. The luciferase assay in HEK 293 cells showed that TLR6 acts synergistically with TLR2 and they are important for *M. avium* recognition. Supporting this result, *M. avium* infection leads to a higher expression of TLR6 and TLR2 in mice bone marrow derived macrophages (BMMs) and dendritic cells (BMDCs). Moreover, TLR6-deficiency reduces the production of TNF- α , IL-12 and IL-6 in BMDCs and increases the susceptibility of BMMs to infection. Analysis of the intracellular signaling pathways revealed that phosphorylation of JNK, ERK1/2 and p38 is dependent on TLR6 in both cell types stimulated with *M. avium*. Additionally, MyD88, TLR6 and TLR2 influence the activation of NF- κ B in dendritic cells, although these receptors are only partially relevant in macrophages. The *in vivo* analysis demonstrated that TLR6-deficient mice infected with *M. avium* showed a higher bacterial burden in spleen, liver and lungs compared to wild type animals, indicating that this receptor is necessary for the efficient control of this infection. However, TLR6 is not involved in the production of IFN- γ or TNF- α by splenocytes. The level of these cytokines was altered only in MyD88 KO mice. In parallel with this finding, the flow cytometry analysis demonstrated that only in MyD88-deficient mice the percentage of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes producing IFN- γ in spleen was reduced. In contrast, IFN- γ level was significantly lower in TLR6 or TLR2 KO mouse lungs, when compared to

wild type animals. Nevertheless, the liver granuloma area was found to be reduced only in MyD88 KO mice. Finally, blocking of TLR6 in THP-1 human monocytic cell line infected with *M. avium* reduced the production of TNF- α and activation of MAPKs, indicating that the mouse findings observed here be extrapolated to humans.

Lista de figuras

Figura 01: Funções dos Macrófagos e Células Dendríticas.	25
Figura 02: Sinalização celular mediada pelos receptores do tipo Toll quando ativados pelos PAMPs	28
Figura 03: Receptores do tipo NOD.	30
Figura 04: Representação estrutural dos RLRs e da molécula adaptadora IPS-1.	32
Figura 05: Morfologia de colônias do complexo <i>Mycobacterium avium</i>	34
Figura 06: Efeito sinérgico entre TLR2 e TLR6 após estímulo com <i>M. avium</i>	61
Figura 07: Animais TLR2/6 KO apresentam background C57BL/6.....	62
Figura 08: Tipagem dos animais TLR2/6 KO.	63
Figura 09: Infecção por <i>M. avium</i> induz a expressão de TLR2 e TLR6.	65
Figura 10: Produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos em resposta ao <i>M. avium</i>	67
Figura 11: TLR6 é necessário para a produção eficiente de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas em resposta ao <i>M. avium</i>	68
Figura 12: Aumento da carga bacteriana devido à deficiência em TLR6 em macrófagos infectados com <i>M. avium</i>	69
Figura 13: Cinética de ativação de MAPKs após estímulo por <i>M. avium</i>	71
Figura 14: Ativação de MAPKs e NF- κ B após infecção por <i>M. avium</i> depende de TLR2/6.	73
Figura 15: Inibição de MAPKs influencia a produção de citocinas em BMMs após estímulo por <i>M. avium</i>	75
Figura 16: Inibição de MAPKs influencia a produção de citocinas em BMDCs após estímulo por <i>M. avium</i>	76
Figura 17: Inibição de NF- κ B influencia a produção de citocinas em BMMs e BMDCs após estímulo por <i>M. avium</i>	77
Figura 18: Papel do receptor TLR6 no crescimento bacteriano <i>in vivo</i>	79
Figura 19: Produção de citocinas pró-inflamatórias 30 dias pós-infecção.....	81
Figura 20: Produção de citocinas pró-inflamatórias 100 dias pós-infecção.....	82
Figura 21: TLR6 não altera a porcentagem de células T CD4 ⁺ ou CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ	83
Figura 22: Produção de IFN- γ e TNF- α no tecido pulmonar de animais infectados pelo <i>M. avium</i>	85
Figura 23: Área dos granulomas hepáticos.	86

Figura 24: Granulomas hepáticos de animais infectados pelo <i>M. avium</i>	87
Figura 25: Expressão de CD14 em células THP-1 estimuladas com PMA.....	88
Figura 26: Efeito do bloqueio de TLR6 em células THP-1 estimuladas com <i>M. avium</i> .	89

Lista de Tabelas

Tabela 01: Sequência de <i>primers</i> utilizados para tipagem dos animais TLR2/6 KO.....	46
Tabela 02: Sequência de <i>primers</i> utilizados no PCR em tempo real.....	56

Lista de abreviaturas

µg – Micrograma

µl – Microlitro

µm – micrômetro

ADC – albumina-dextrose-catalase

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida

APC – Célula apresentadora de antígenos

BMDC – célula dendrítica derivada de medula óssea

BMM – macrófago derivado de medula óssea

BSA – albumina bovina sérica

CARD – domínio de recrutamento e ativação de caspase

CD – grupo de diferenciação

cDNA – DNA complementar

CFU – unidade formadora de colônia

CLRs – *C-lectin receptors*

ConA – concanavalina A

CR – receptor do complemento

DC – Célula dendrítica

DC-SIGN – *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing nonintegrin*

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucléico

ELISA – ensaio de absorção imunoenzimático

ERK – *extracellular signal-regulated protein kinase*

FBS – soro fetal bovino

FITC – isotiocianato de fluoresceína

GM-CSF – Fator Estimulador de Colônia Granulócito Macrófago

HBSS – *Hank's balanced salt solution*

HE – hematoxilina-eosina

HIV – vírus da imunodeficiência humana

IFN – interferon

IL – Interleucina (vários tipos: 1, 6, 12, etc.)

IL-1R – receptor de IL-1

IRAK – cinase associada ao receptor de IL-1

IRF – fator regulador de interferon

JNK – *c-Jun NH2-terminal kinase*

KO – *knockout*

LAM – lipoarabinomanam

LAMP-1 – proteína 1 de membrana associada ao lisossomo

LCCM – *L929 cell conditioned medium*

Log – logaritmo

LPS – Lipopolissacarídeo

LRRs – repetições ricas em leucina

M – Molar

MAC – complexo *Mycobacterium avium*

MAL/TIRAP – *MyD88 adapter like*

Malp-2 – lipopeptídeo de 2kDa ativador de macrófagos; ativador de TLR2/6

MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno

MARCO – *macrophage receptor with collagenous structure*

M-CSF – fator estimulador de colônias de monócitos

MDP – muramil dipeptídeo

mg – Miligrama

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL – Mililitro

mL – mililitro

mM – Milimolar

MOI – multiplicidade de infecção

MyD88 – fator de diferenciação mielóide 88

NF-κB – fator nuclear kappa B

ng – nanograma

NK – matadora natural

NLRs – *NOD-like receptor*

nm – nanômetros

nM – nanomolar

NOD – *nucleotide-binding oligomerization domain*

NRAMP1 – *natural resistance associated macrophage protein 1*

OADC – ácido-albumina-dextrose-catalase

Pam3CSK4 – N-palmitoil-3-Cisteína-Serina-(Lisina)₄; ativador de TLR2/1

PAMP – padrão molecular associado a patógeno

pb – pares de bases

PBS – Tampão salina fosfato (phosphate-buffered saline)

PCR – reação em cadeia da polimerase

PE – ficoeritrina

pg – picograma

pH – potencial hidrogeniônico

pmoles - Picomole

PRRs – receptores que reconhecem padrões

RLRs – *retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*

RNA – ácido ribonucléico

rpm – Rotações por minuto

SmOp – lisa opaca

SmT – lisa transparente

SRs – *scavenger receptors*

TDM – trealose 6-6'-dimicolato

Th1 - Células T auxiliares do tipo 1

Th2 – Células T auxiliares do tipo 2

TIR – domínio dos receptores tipo Toll-IL-1R

TLR – receptor do tipo Toll

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – *tumor necrosis factor-associated factor 6*

TRAM – *TRIF-related adaptor molecule*

TRIF – *TIR domain-containing adaptor inducing interferon- β*

Sumário

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	SISTEMA IMUNE	20
1.2	MACRÓFAGOS E CÉLULAS DENDRÍTICAS	22
1.3	RECEPTORES DA IMUNIDADE INATA.....	25
1.3.1	<i>Receptores do tipo Toll (TLRs)</i>	25
1.3.2	<i>Receptores do tipo NOD (NLRs)</i>	29
1.3.3	<i>Receptores semelhantes a RIG-I (RLRs)</i>	30
1.4	O GÊNERO <i>MYCOBACTERIUM</i>	32
1.5	RESPOSTA IMUNE CONTRA <i>M. AVIUM</i>	35
1.5.1	<i>Resposta imune inata ao M. avium</i>	35
1.5.2	<i>Resposta imune adaptativa ao M. avium</i>	38
2	JUSTIFICATIVA.....	41
3	OBJETIVOS.....	44
4	METODOLOGIA.....	46
4.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	46
4.2	BACTÉRIA E CONDIÇÕES DE CULTIVO	47
4.3	ENSAIO DE LUCIFERASE.....	47
4.4	INFECÇÃO <i>IN VIVO</i> E ANÁLISE DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA	49
4.4.1	<i>Determinação da carga bacteriana nos órgãos dos animais infectados</i>	49
4.4.2	<i>Cultura e estimulação de esplenócitos</i>	49
4.5	ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	50
4.6	ANÁLISE DE CITOCINAS NOS PULMÕES	51
4.7	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA.....	51
4.8	GERAÇÃO DE MACRÓFAGOS (BMM) E CÉLULAS DENDRÍTICAS (BMDC) DERIVADOS DA MEDULA ÓSSEA.....	52
4.9	INFECÇÃO <i>IN VITRO</i> E ANÁLISE DE CITOCINAS.....	53
4.10	CULTURA DE CÉLULAS THP-1 E BLOQUEIO DE TLRs.....	54
4.11	PCR EM TEMPO REAL.....	55
4.12	ENSAIO DE WESTERN BLOT.....	57
4.13	ENSAIO DE INIBIÇÃO DE MAPKs E NF- κ B	58
4.14	DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA	58
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5	RESULTADOS.....	60
5.1	TLR6 AGE SINERGICAMENTE COM TLR2 NO RECONHECIMENTO DO <i>M. AVIUM</i> EM CÉLULAS HEK 293.....	60
5.2	OBTENÇÃO E ANÁLISE DOS ANIMAIS TLR2/6 KO	61
5.3	AVALIAÇÃO DO PAPEL DE TLR6 EM BMMs E BMDCs DURANTE A INFECÇÃO POR <i>M. AVIUM</i>	64
5.3.1	<i>Infecção por M. avium induz a expressão de TLR2 e TLR6 em BMMs e BMDCs</i> 64	
5.3.2	<i>Ausência de TLR6 altera a produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas mas não afeta a produção por macrófagos</i>	65
5.3.3	<i>BMM TLR6 KO são mais susceptíveis à infecção por M. avium</i>	69
5.3.4	<i>TLR6 é importante para ativação de MAPKs em BMMs e BMDCs</i>	70
5.3.5	<i>BMMs e BMDCs apresentam requerimentos diferentes para a produção de citocinas após infecção pelo M. avium</i>	74
5.4	AVALIAÇÃO DO PAPEL DE TLR6 NA INFECÇÃO POR <i>M. AVIUM IN VIVO</i>	77
5.4.1	<i>Animais deficientes para TLR6 são mais susceptíveis à infecção por M. avium</i> ..	78

5.4.2	<i>A ausência de TLR6 não altera a produção de citocinas pró-inflamatórias em esplenócitos de camundongos infectados pelo M. avium</i>	80
5.4.3	<i>TLR6 não influencia a produção de IFN-γ por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ na infecção por M. avium</i>	82
5.4.4	<i>A deficiência em TLR6 e TLR2 reduz a produção de IFN-γ nos pulmões de camundongos infectados pelo M. avium</i>	84
5.4.5	<i>Deficiência para TLR6 não afeta área de granulomas no fígado de animais infectados pelo M. avium</i>	85
5.5	O RECEPTOR TLR6 É IMPORTANTE PARA A ATIVAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE CONTRA O <i>M. AVIUM</i> EM CÉLULAS HUMANAS	87
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÃO	102
8	BIBLIOGRAFIA	104
9	ANEXOS	112
9.1	ANEXO I: OUTROS ARTIGOS PUBLICADOS OU SUBMETIDOS DURANTE O DOUTORADO	112
9.2	ANEXO II: ARTIGO PUBLICADO REFERENTE À TESE	113

1. Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Imune

O sistema imune corresponde a um complexo integrado das defesas do hospedeiro no qual numerosas células e moléculas funcionam em cooperação a fim de manter a homeostase do organismo. Sua função fisiológica é proteger o indivíduo de infecções e eliminar substâncias estranhas ao corpo. No entanto, os mecanismos utilizados para tais funções podem ser, por si só, capazes de causar dano tecidual e levar a uma patologia em algumas situações, como, por exemplo, em doenças auto-imunes [1].

Didaticamente dividimos o sistema imune em imunidade inata e imunidade adquirida, uma vez que a interação entre os dois tipos de resposta imune é necessária para a eliminação eficiente de um determinado patógeno e retomada da homeostase do organismo. A resposta inata aos microrganismos estimula e influencia a natureza das respostas adquiridas. Por outro lado, a resposta imune adquirida utiliza mecanismos efetores da imunidade inata para eliminá-los [1].

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as infecções, agindo como uma sentinela para o sistema imune. Seus mecanismos existem antes do encontro com microorganismos e são prontamente ativados após o reconhecimento de patógenos microbianos, previamente ao desenvolvimento das respostas imunes adquiridas. A imunidade inata é também, filogeneticamente, o mecanismo de defesa mais antigo contra microorganismos e está presente em todos os organismos multicelulares, incluindo plantas e insetos [1].

As células do sistema imune inato expressam receptores que reconhecem padrões moleculares de determinados patógenos (PRRs, do inglês *pattern-recognition receptors*). Essas moléculas são consideradas componentes essenciais para a

sobrevivência de um dado microorganismo e são conhecidas como Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Atualmente, várias classes de PRRs foram identificadas, dentre eles os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll like receptors*), receptores RLRs (do inglês *retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors*) e receptores NLRs (do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor*). Esses receptores se ligam a PAMPs em diversos compartimentos celulares e desencadeiam a ativação da célula, a liberação de citocinas inflamatórias e outros mecanismos de defesa do organismo [2-5].

Um dos primeiros receptores envolvidos na resposta imune inata são os TLRs, por representarem uma família de sensores de superfície celular. Já os RLRs e NLRs são receptores citoplasmáticos que detectam vários ligantes no ambiente intracelular e induzem uma resposta imune. Dessa forma, uma variedade de mediadores pró-inflamatórios é gerada para combater infecções enquanto simultaneamente ativa o sistema imune adaptativo [6-7].

As principais células efetoras da imunidade inata são os fagócitos mononucleares (macrófagos e células dendríticas), os neutrófilos e as células *natural killer* (NK). Os neutrófilos mediam as fases iniciais das respostas inflamatórias. Essas células são altamente eficientes em engolfar partículas e são dotadas com poderosas moléculas antimicrobianas como peptídeos catiônicos e proteases, além de ser capaz de secretar espécies reativas de oxigênio e nitrogênio [8]. Já as células dendríticas (DCs) são células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais, críticas na ligação entre a imunidade inata e adaptativa. Após sua ativação, as DCs produzem citocinas pró-inflamatórias e aumentam a atividade apresentadora de antígenos, coordenando as reações inflamatórias e a imunidade adaptativa [9]. Os macrófagos têm várias qualidades que os permitem funcionar como sentinelas na primeira linha de defesa

contra infecções. Essas células são aptas a reconhecer rapidamente, internalizar e degradar patógenos, o que contém a infecção tempo suficiente para iniciar uma resposta imune adaptativa. Tal característica permite aos macrófagos atuar tanto como células efectoras quanto como APCs [10]. As células NK são uma linhagem de linfócitos derivada da medula óssea que, ao contrário dos linfócitos T e B, não sofrem rearranjo nos genes dos receptores de antígeno a fim de detectar seus alvos celulares [11]. Elas são ativadas através do equilíbrio entre os sinais ativadores ou inibidores transmitidos pelas células alvo através de diversos receptores e dessa forma possuem um papel importante na defesa contra células infectadas por vírus ou células tumorais [12]. As células NK destroem os alvos celulares através da exocitose de grânulos citotóxicos e constituem uma importante fonte de interferon gamma (IFN- γ), o qual pode ativar os macrófagos para destruir micróbios ingeridos [1, 12].

1.2 Macrófagos e Células Dendríticas

Os macrófagos e as células dendríticas são importantes componentes da imunidade inata que serão abordados com mais detalhe por ser o foco desse trabalho. Ambas as células são originadas a partir de progenitores hemopoiéticos ou via monócitos circulantes. Estas células migram do sangue para os tecidos sob condições inflamatórias, onde a plasticidade dos monócitos permitirá que estas células respondam ao ambiente de citocinas e fatores de crescimento ali presentes com a diferenciação em uma variedade de macrófagos e DCs [13].

Os macrófagos são fagócitos residentes constitutivamente nos órgãos linfóides e não-linfóides, onde desempenham papel tanto na homeostase tecidual quanto na resposta imune a agentes infecciosos. Tipos diferentes de macrófagos são encontrados em diversos tecidos, como as células de Kupffer no fígado, os osteoclastos no tecido

ósseo, macrófagos alveolares nos pulmões, etc. Estas células podem apresentar os fenótipos M1 ou M2, dependendo dos sinais de ativação recebidos e da resposta imune que produzem. Os macrófagos M1 (também chamada de ativação clássica) são diferenciados por IFN- γ e produtos microbianos, como LPS. Estas células são caracterizadas pela expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (principalmente IL-12, fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e IL-1 β) e alta produção de intermediários de oxigênio e nitrogênio. Além disso, são associadas à indução da resposta do tipo Th1 e são células efetoras potentes contra microorganismos e células tumorais [14-15]. Por outro lado, os macrófagos M2 (também chamada ativação alternativa) são diferenciados pela presença de IL-4 e IL-13, embora outras citocinas como IL-10 e IL-5 possam amplificar esta indução indiretamente. Estas células são caracterizadas por uma atividade fagocítica eficiente, expressão de receptores *scavenger*, receptores de manose e de galactose, e produção de ornitina e poliaminas. Além disso, estão envolvidas na contenção de parasitas, remodelamento tecidual, indução e regulação de respostas Th2 e apresentam funções imunoreguladoras [14-15].

Os macrófagos desempenham funções tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Estímulos de dano tecidual ou infecções levam estas células a expressar uma variedade de PRRs que são importantes para ativação da resposta imune inicial [14]. Os macrófagos ativados erradicam o microorganismo ou célula tumoral, entre outros, utilizando mecanismos como a produção de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio. Além disso, funcionam como APCs e atuam no estabelecimento do microambiente necessário à indução da resposta imune adaptativa. Na fase de resolução da inflamação, os macrófagos passam a atuar na limpeza de detritos celulares, angiogênese, remodelamento e reparo tecidual. Deve-se esclarecer que o remodelamento e reparo ocorrem dinamicamente durante inflamação [15].

As células dendríticas são células especializadas em processamento e apresentação de antígenos, possuindo alta atividade fagocítica e grande capacidade de produção de citocinas. Estas células representam as mais potentes APCs no sistema imune e têm papel chave na regulação e modulação da imunidade, com a habilidade de induzir tanto respostas imunes primárias contra os patógenos invasores quanto a tolerância imunológica [16].

Os precursores das células dendríticas estão presentes na maioria dos tecidos periféricos como células imaturas com grande capacidade fagocítica, residindo principalmente nos locais de interface com o ambiente. As DCs imaturas reconhecem diretamente os patógenos através de uma grande diversidade de receptores PRRs, como TLRs, receptores de manose, lectinas tipo-C, entre outros, o que leva ao início da resposta inflamatória [17]. Após a ativação, estas células passam por mudanças fenotípicas e funcionais que estão intimamente ligadas à sua migração do tecido periférico para o órgão linfóide. As mudanças observadas durante a maturação incluem reorganização do citoesqueleto, perda de estruturas de adesão e aquisição de grande mobilidade celular, além de expressar altos níveis de MHC classe II e moléculas co-estimuladoras como CD86 e CD40. As células dendríticas se tornam completamente maduras durante a interação com as células T, orquestrando a resposta imune a ser estabelecida [18].

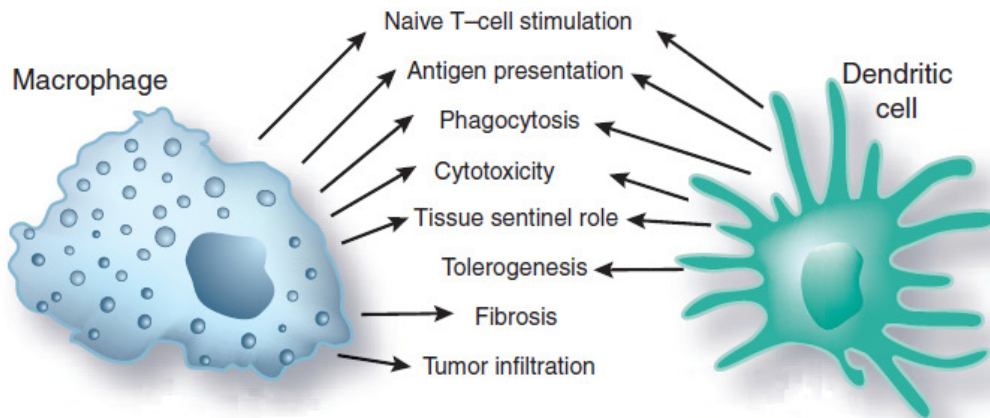


Figura 01: Funções dos Macrófagos e Células Dendríticas. Reproduzido com modificações a partir de [19].

1.3 Receptores da Imunidade Inata

1.3.1 Receptores do tipo Toll (TLRs)

Os receptores Toll foram originalmente identificados em *Drosophila* como um receptor essencial para o estabelecimento do padrão dorso-ventral de embriões em desenvolvimento [20]. Em seguida foi demonstrado que moscas mutantes para o gene *toll* eram altamente susceptíveis à infecção por fungos, demonstrando que essa proteína estava envolvida no desencadeamento da resposta imune [21]. Subseqüentemente, homólogos em mamíferos foram identificados e estudos iniciais indicaram que o produto desses genes podia promover a expressão de genes codificantes para citocinas inflamatórias, sugerindo um importante papel dos receptores do tipo Toll nas respostas imunes inatas [22].

Atualmente, 12 membros da família dos TLRs foram identificados (onde humanos) e como). Os TLRs são glicoproteínas de membrana do tipo I e têm em sua estrutura dois domínios principais. O domínio extracelular N-terminal apresenta repetições ricas em leucina (LRRs, do inglês *Leucine-Rich Repeats*) enquanto o

domínio intracelular C-terminal é conhecido como domínio TIR (do inglês *Toll/IL-1 receptor*), que apresenta homologia com o domínio do receptor da citocina interleucina (IL)-1. A análise da estrutura cristalográfica de TLRs complexados com seus ligantes mostrou que essas moléculas formam heterodímeros, como TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 ou TLR4-MD2, ou homodímeros, como TLR3-TLR3, após associação com seus respectivos agonistas/antagonistas, formando estruturas semelhantes a ferraduras (em forma de “m”) [23]. Quanto à localização, os TLRs podem ser encontrados na superfície celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6) ou em vesículas intracelulares, como endossomos ou retículo endoplasmático (TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9) [6].

O reconhecimento pelos TLRs leva ao recrutamento de vários adaptadores que contêm o domínio TIR como MyD88, Mal/TIRAP, TRIF e TRAM. Este recrutamento dispara uma cascata de sinalização que culmina na ativação de fatores de transcrição como NF- κ B, AP-1 e IRFs. Estes fatores, por sua vez, induzem a transcrição de citocinas inflamatórias, interferons do tipo I e quimiocinas [2-3].

Os receptores do tipo Toll são notoriamente importantes no reconhecimento de patógenos bacterianos. O TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS), um potente ativador da resposta imune, presente na parede celular das bactérias Gram-negativas. Já o peptidoglicano das bactérias Gram-positivas e o lipoarabinomannan (LAM) de micobactéria são reconhecidos por TLR2, bem como diacil ou triacil-lipopeptídeos bacterianos, que são reconhecidos pelos dímeros TLR2/6 ou TLR2/1, respectivamente. Outra molécula derivada de patógenos bacterianos, a flagelina de bactérias flageladas, é reconhecida pelo TLR5. Já o DNA genômico rico em CpG não-metilado é reconhecido por TLR9 [6]. O reconhecimento desses vários componentes bacterianos por TLRs específicos induz a produção de citocinas inflamatórias para o estabelecimento de uma resposta imune robusta contra esses patógenos.

O receptor do tipo Toll 6 faz parte da subfamília de TLRs que ainda possui TLR1, TLR2 e TLR10 [24], os quais, presumivelmente, divergiram de um gene ancestral comum [25]. Esse receptor é um dos responsáveis pelo amplo espectro de especificidade do TLR2, receptor cerne dessa subfamília [26]. Recentemente foi identificada a formação do heterodímero TLR4-TLR6, capaz de reconhecer ligantes endógenos e promover inflamação estéril, como observado na arteriosclerose e na doença de Alzheimer [27]. Ainda assim poucos trabalhos são direcionados ao estudo do TLR6, apesar dos indícios de que este receptor possui papel importante no reconhecimento de determinados patógenos e no direcionamento da resposta imune [28-30]. Com relação ao gênero *Mycobacterium*, estudos iniciais sugeriram que TLR6 não teria papel no controle das infecções por bactérias desse grupo [31-32]. No entanto, resultados recentes mostram que esse receptor é importante no estabelecimento da patogênese em infecções por *Mycobacterium leprae* além de se mostrar um possível biomarcador para o prognóstico de micobacterioses [33-35]. Além disso, estudos em humanos demonstraram que polimorfismos em TLR6 estavam associados com baixa produção de IL-6 e sinalização por NF- κ B, e um maior risco de tuberculose em certas populações [36-37].

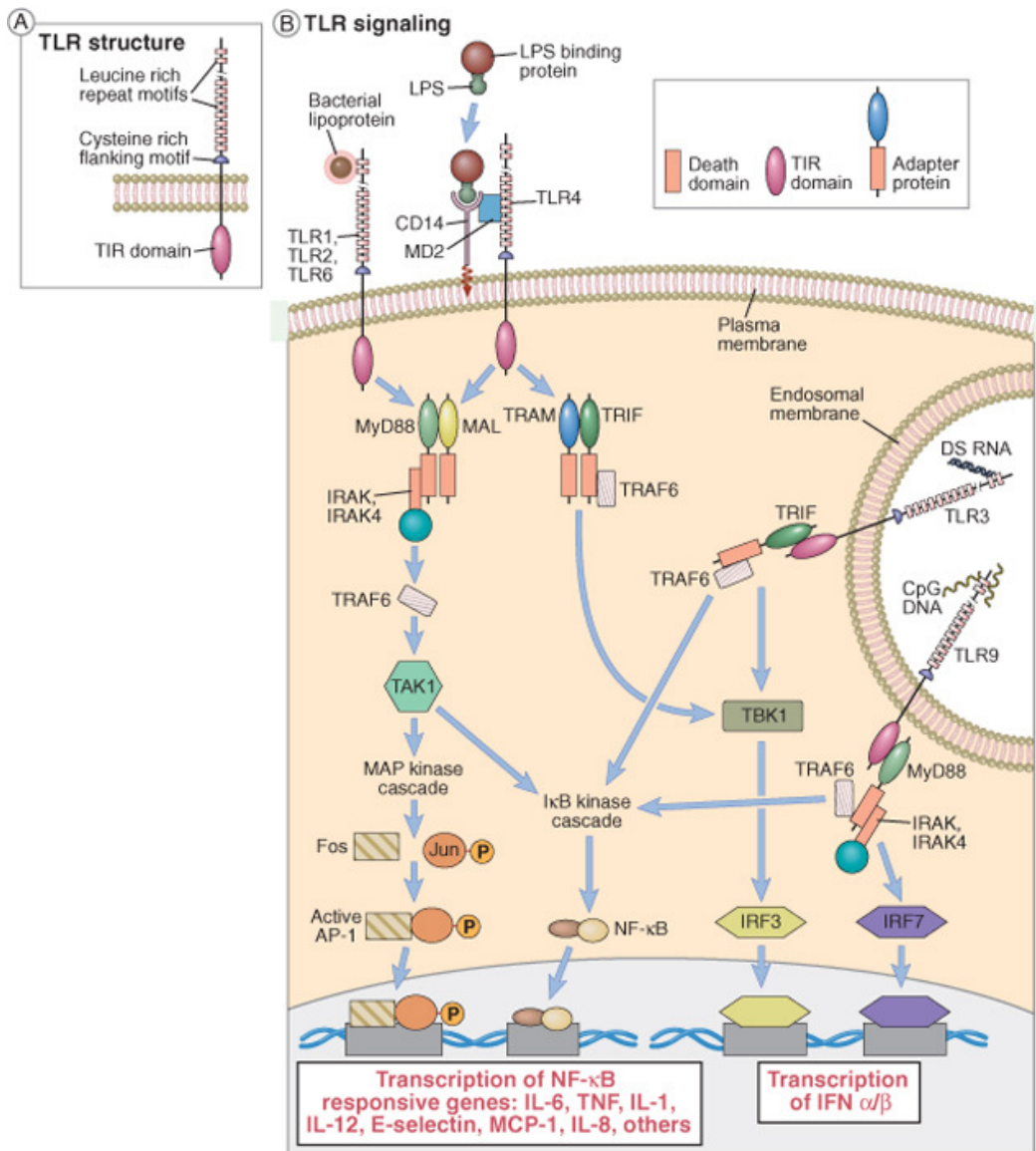


Figura 02: Sinalização celular mediada pelos receptores do tipo Toll quando ativados pelos PAMPs [1].

1.3.2 Receptores do tipo NOD (NLRs)

Os receptores NLR compreendem uma família de proteínas solúveis que auxiliam na vigilância do citoplasma contra invasores. Estes receptores apresentam três domínios distintos: (1) um domínio efetor N-terminal do tipo CARD ou Pirina; (2) um domínio de oligomerização e ligação de nucleotídeo (também chamado domínio NACHT); (3) e um domínio que apresenta um número variável de LRRs na porção C-terminal [38]. Os NLRs podem ser classificados em dois subgrupos, considerando o domínio efetor N-terminal: o subgrupo NLRC, que possuem o domínio CARD; e o NLRP, que apresentam o domínio Pirina [39]. Os receptores NLRPs geralmente estão envolvidos na ativação de caspase-1 e na formação de inflamossomas, uma plataforma molecular importante nas respostas imunes envolvendo IL-1 β e IL-18. Já o subgrupo NLRC inclui membros como NOD1 e NOD2 que têm papel importante no reconhecimento de patógenos e ativação da resposta imune [39].

O receptor NOD1 é encontrado em diversos tipos celulares enquanto NOD2 apresenta uma distribuição restrita a tipos celulares mais especializados como macrófagos e células dendríticas. Quanto à especificidade, NOD1 reconhece o ácido D-glutamyl-meso-diaminopimelico (DAP) encontrado em bactérias Gram-negativas e em algumas Gram-positivas. Por outro lado, NOD2 é ativado por muramyl-dipeptídeo (MDP), que é um motivo peptidoglicano amplamente distribuído entre as bactérias [40]. Após o reconhecimento de seus ligantes, os domínios centrais se oligomerizam e ocorre o recrutamento da proteína adaptadora cinase RIP-2 (*receptor-interacting protein 2*). A ativação de RIP-2 leva a uma cascata de sinalização que culmina na ativação de NF- κ B e transcrição de genes pró-inflamatórios [39].

Os receptores NODs são importantes na resposta imune contra diversos patógenos, tanto protozoários, quanto bactérias ou vírus [39]. Estudos recentes têm

relacionado NOD1 e NOD2 com a indução de autofagia [39-41]. Estes receptores interagem com a proteína ATG16L1, um componente importante para a formação do autofagossomo, desencadeando o processo [41]. Além disso, polimorfismos no gene *NOD2* estão intimamente ligados à doença de Crohn e colite ulcerativa [42].

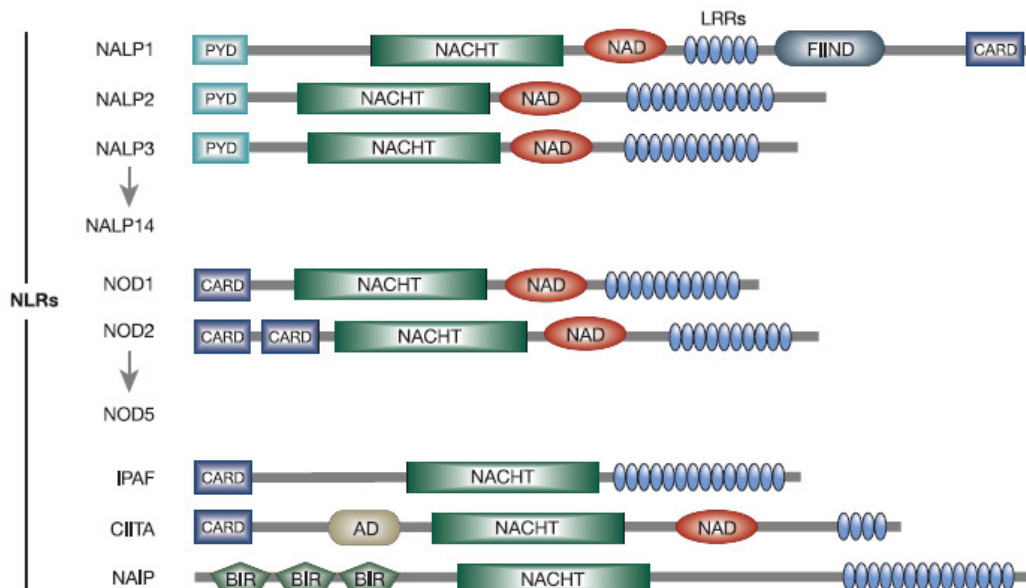


Figura 03: Receptores do tipo NOD. Os NLRs são caracterizados por três domínios distintos: a região rica em repetições de leucina (LRRs); o domínio central NACHT, que media a oligomerização; e um domínio efetor, que pode ser PYD, CARD ou BIR (repetições IAP baculovirus). Alguns NLRs também contêm um domínio associado a NACHT (NAD) [38].

1.3.3 Receptores semelhantes a RIG-I (RLRs)

Os receptores RLR compreendem uma família de helicases que funcionam como sensores citoplasmáticos de PAMPs comumente encontrados em RNAs virais. Até o momento, três membros da família RLR foram identificados: RIG-I (*retinoic acid-inducible gene-1*), MDA5 (*melanoma differentiation associated factor 5*), e LGP2 (*laboratory of genetics and physiology 2 and homolog of mouse D11lgp2*) [43]. Estes três receptores estão presentes na maioria dos tecidos e sua expressão é mantida em níveis basais mesmo em células em repouso [43].

RIG-I e MDA5 apresentam estrutura organizada em três domínios distintos: (1) uma região N-terminal contendo domínio de ativação de caspases CARD; (2) um domínio central de helicase de RNA DExD/H box; e (3) um domínio repressor C-terminal [44]. O receptor LGP2 se organiza de maneira semelhante, embora não possua o domínio N-terminal CARD [44]. Dentre os RLR, RIG-I é o representante melhor estudado. Análises de estrutura e função demonstraram que sua atividade de sinalização é auto-regulada através da interação entre o domínio CARD e a porção C-terminal dentro da mesma molécula. Após o estímulo pelo ligante, o receptor assume uma conformação “aberta” que o permite associar-se à proteína adaptadora IPS-1, culminando na produção de IFN e expressão de genes de defesa do hospedeiro. Os principais fatores de transcrição envolvidos nesta sinalização correspondem ao Fator Regulador de Interferon (IRF)3, IRF7 e NF- κ B [43].

As principais características ou motivos presentes nos RNAs reconhecidos pelos RLRs são a conformação em dupla fita e a presença de regiões poli(I:C), 5' trifosfato ou estrutura em alça formada pelas regiões 5' e 3' não traduzidas [44]. Apesar de estarem envolvidos principalmente no reconhecimento de vírus, estes receptores também influenciam o desencadeamento de respostas imunes antibacterianas. Em infecções por *Shigella flexneri*, RIG-I possui um papel importante na restrição de crescimento bacteriano [45]. De forma semelhante, LGP2 é importante para a produção de IFN do tipo 1 e IL-12 na patologia estabelecida por *Listeria monocytogenes* [46]. Por outro lado, a produção de IFN do tipo 1 mediado por RIG-I e MDA5 se mostra prejudicial ao hospedeiro em infecções por *Chlamydia pneumoniae* [47].

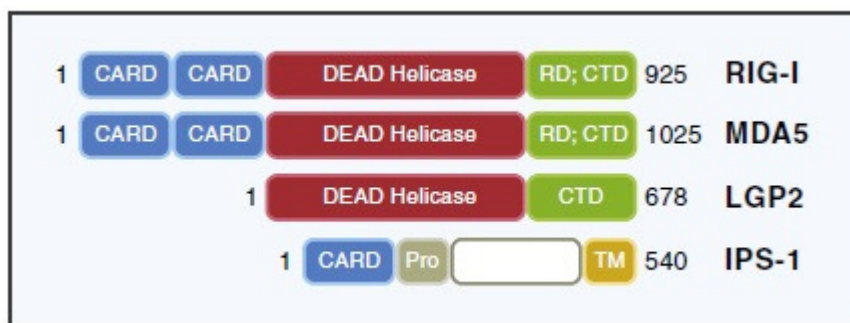


Figura 04: Representação estrutural dos RLRs e da molécula adaptadora IPS-1. Os domínios chave envolvidos na sinalização estão mostrados. Os RLRs possuem domínio CARD; domínio central helicase de RNA DExD/H box; e um domínio C-terminal (CTD) que em RIG-I e MDA5 codificam um domínio repressor (RD) envolvido em auto-regulação. IPS-1 consiste de CARD, uma região rica em prolina (Pro) e um domínio transmembrana (TM) [43].

1.4 O gênero *Mycobacterium*

As bactérias do gênero *Mycobacterium* pertencem à Ordem Actinomycetales, que contém também os gêneros *Nocardia* e *Corynebacterium*, formando o grupo chamado MNC, que inclui várias espécies patogênicas como *M. tuberculosis*, *M. leprae*, *M. avium*, *N. asteroides* e *C. diphtheriae* [48]. Os indivíduos do gênero *Mycobacterium* são geralmente bacilos aeróbios ou microaerófilos, imóveis, e que possuem a característica de serem ácido-álcool resistentes. Além disso, micobacterias não formam endósporos ou capsulas e são consideradas Gram-positivas. Uma subdivisão do gênero ainda classifica esses indivíduos nos grupos *M. tuberculosis/M. bovis*; *M. leprae*; e micobacterias não-tuberculosas, na qual estão incluídas as bactérias do complexo *Mycobacterium avium* (MAC). O grupo MAC reúne bactérias geneticamente relacionadas no qual estão incluídas *M. avium*, *M. avium* subspécies *paratuberculosis* e *M. intracellulare* [49].

A *M. avium* é uma bactéria ubíqua, sendo encontrada no solo e na água. No ambiente, esse microorganismo vive em biofilmes ou infectando amebas livres [50]. No entanto, em centros urbanos essa bactéria é comumente encontrada na forma de

biofilmes nas tubulações de água, mantendo contato íntimo com a população humana [51]. Tal distribuição, associada ao fato desse microorganismo ser um agente infeccioso oportunista que afeta principalmente pacientes com imunidade comprometida [52], o torna importante do ponto de vista da Saúde Pública.

Os indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA ou, do inglês, AIDS) são os principais acometidos pela infecção pelo *M. avium* [53]. Nessas pessoas, o *M. avium* induz uma doença disseminada com envolvimento de órgãos viscerais e é causa de morbidade e aumento de mortalidade [54]. Um estudo mostrou que no Brasil, em pacientes com AIDS e positivos para micobacteremias, a frequência de *M. avium* foi maior (58%) quando comparada à *M. tuberculosis* (42%). Geralmente infecções micobacterianas em tais pacientes são principalmente causadas por *M. avium* em países industrializados, enquanto em países em desenvolvimento é geralmente causada por *M. tuberculosis*. A alta prevalência de *M. tuberculosis* em países em desenvolvimento e, conseqüentemente, o alto grau de exposição da população a esse patógeno, pode ser o fator principal para essa taxa [55].

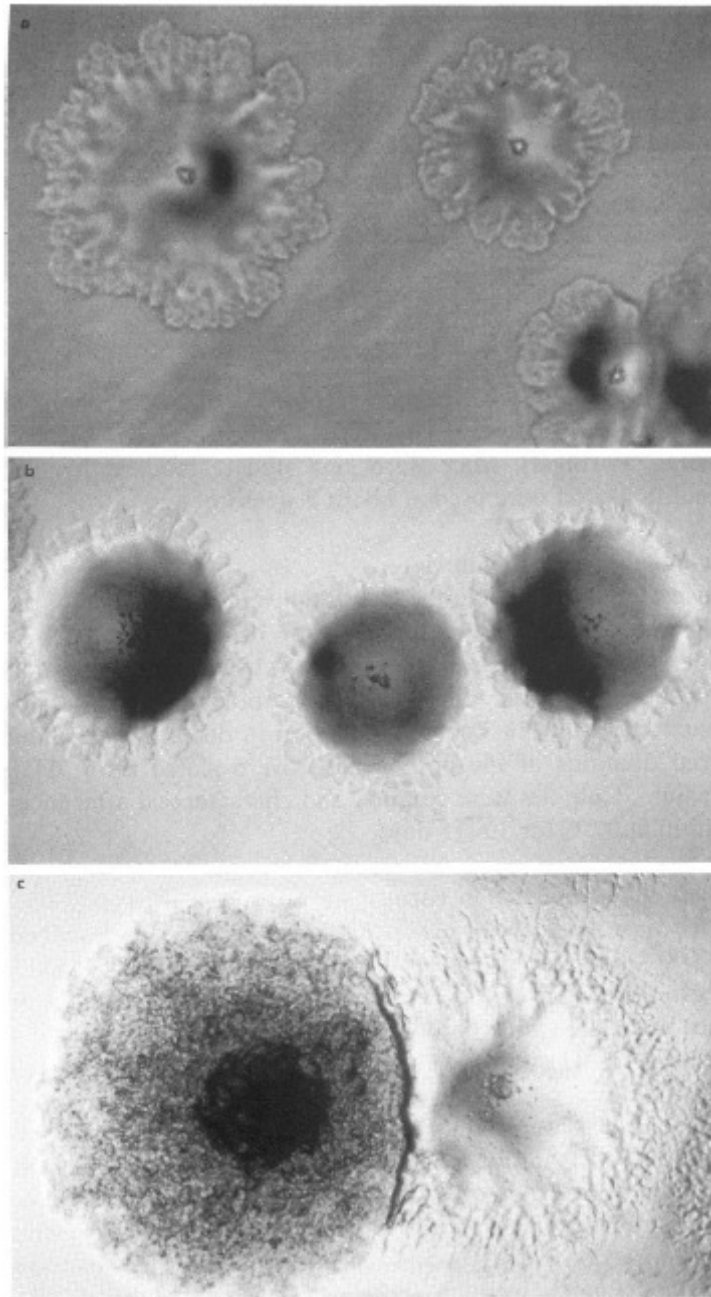


Figura 05: Morfologia de colônias do complexo *Mycobacterium avium*. Em (a), colônia do morfotipo liso-transparente. Em (b), colônia do morfotipo liso-opaco. Em (c), uma colônia rugosa (esquerda) e uma colônia liso-transparente (direita) [56].

1.5 Resposta imune contra *M. avium*

O estabelecimento de uma resposta imune eficiente contra bactérias intracelulares envolve a imunidade mediada por células T e é disparada por células fagocíticas através de apresentação de antígenos no contexto das moléculas de MHC de classe I e II. Essas APCs ativam e estimulam células T CD4⁺ que, em contrapartida, secretam citocinas como o IFN- γ que aumentam a capacidade bacteriostática e bactericida das células fagocíticas, favorecendo a destruição de microorganismos intracelulares [57].

Estudos utilizando modelo murino demonstraram que o controle da infecção por *M. avium* em animais imunocompetentes depende da ativação de células T CD4⁺ com um padrão de resposta imune do tipo 1, envolvendo a produção de IFN- γ e TNF- α [58-59]. Na resposta imune contra esse patógeno o macrófago possui papel crucial agindo como célula hospedeira e efetora da imunidade [59].

1.5.1 Resposta imune inata ao *M. avium*

As infecções humanas por *M. avium* são iniciadas através do trato intestinal ou pela inalação de aerossol contendo o microorganismo. Após atravessar a barreira mucosa, a bactéria é capturada e replica dentro de macrófagos, que é a sua principal célula hospedeira. Os receptores do complemento, receptores de manose, CD14, receptores *scavenger* e outros participam na internalização da bactéria pelo macrófago [50]. Uma vez dentro da célula hospedeira, as micobactérias sobrevivem no interior de vacúolos que não se acidificam nem se fundem com lisossomos [52, 60]. É interessante salientar que outras vesículas endossomais podem se fundir a este compartimento, indicando que esse microorganismo pode acessar nutrientes através da rota endossomal dentro dos macrófagos [52].

Os macrófagos, quando ativados, são uma fonte importante de IL-12 e atuam na estimulação da produção de IFN- γ pelas células NK e no estabelecimento da resposta imune do tipo 1 [57]. Nessa infecção a produção de IL-12 é crucial, uma vez que sua neutralização exacerba a patogênese [61]. Por outro lado, estudos *in vitro* mostraram que a restrição do crescimento de muitos isolados de *M. avium* não é dependente de espécies reativas de oxigênio ou óxido nítrico [62-63]. Contudo, na presença de IFN- γ , a capacidade da bactéria de bloquear a formação do fagolisossomo nos macrófagos é reduzida [64], o que auxilia na eliminação do microorganismo.

Outros mecanismos imunes utilizados pelos macrófagos correspondem à apoptose e a autofagia. O *M. avium* é capaz de induzir apoptose dessas células tanto pela via extrínseca quanto pela via intrínseca [48]. Esse processo leva ao seqüestro dos patógenos dentro de corpos apoptóticos e subsequente eliminação da micobactéria por outros fagócitos [54]. No entanto, Early e colaboradores [65] mostraram que *M. avium* é capaz de sobreviver e até mesmo evadir de macrófagos sob indução de apoptose e, dessa maneira, infectar outros fagócitos. Esse mesmo estudo mostrou que autofagia não é suficiente para eliminar completamente a bactéria, contrastando com a resposta ao *M. tuberculosis*, onde esse processo consiste em um importante mecanismo de contenção bacteriana [66-67].

As células dendríticas representam as APCs mais eficientes na ativação de células T virgens, sendo ainda uma importante fonte de IL-12 após o estímulo microbiano [57]. A importância dessas células na resposta ao *M. avium* se baseia no seu papel em outras infecções micobacterianas. A infecção de DCs por *M. tuberculosis* ou BCG está associada a uma crescente produção de TNF- α e IL-12, necessárias ao estabelecimento da resposta imune protetora. No entanto, após ativação por IFN- γ , as DCs são capazes apenas de controlar o crescimento bacteriano, não erradicando o patógeno, ao contrário

dos macrófagos [68]. Esse microambiente é importante para manutenção da disponibilidade de antígenos para apresentação às células T, o que por um lado potencializa a resposta imune, mas também as tornam importantes reservatórios, contribuindo para a persistência intracelular micobacteriana [69].

Outras células do sistema imune inato também estão envolvidas na resposta a *M. avium*. Os neutrófilos têm papel crucial apenas na resposta inicial à bactéria, exercendo uma função importante na produção de citocinas como TNF- α e IL-12. Quando ativadas, essas células podem eliminar a *M. avium* intracelular, embora não sejam tão eficientes quanto os macrófagos [70-71]. As células NK também possuem papel importante no controle da patogênese principalmente devido à produção de IFN- γ nos momentos iniciais da infecção, e não à sua atividade citolítica [72].

O reconhecimento da micobacteria é um passo crucial na resposta imune do hospedeiro ao patógeno. Estudos de infecções por BCG ou *M. tuberculosis* mostraram que TLRs são importantes para o desencadeamento de uma resposta imune eficiente. Dentre eles, TLR2 e TLR9 parecem ter papéis cruciais nessa ativação, por reconhecerem PAMPs abundantes nessas bactérias [73-75]. Esses receptores promovem a produção de peptídeos microbicidas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de participar do processo de maturação do fagossomo [75]. Com relação ao *M. avium*, o reconhecimento deste patógeno ocorre principalmente via TLR2. Animais deficientes para TLR2 (TLR2 KO) apresentam um aumento na susceptibilidade à infecção pelo *M. avium*. Isso pode ser associado a um atraso no desenvolvimento da resposta imune adaptativa, mas também está relacionado a um manejo deficiente da infecção pelo macrófago [76-77]. Nessa infecção, o TLR9 é requerido para a resistência do hospedeiro mas não apresenta papel no estabelecimento da resposta imune do tipo 1 [78]. No entanto, como camundongos deficientes para MyD88 são ainda mais

susceptíveis que os TLR2 KO [76], outros TLRs podem estar envolvidos no reconhecimento inato desse agente infeccioso. O TLR6 parece não estar envolvido na resposta à infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis* [31-32]. Contudo, na infecção por *M. leprae*, o TLR6 tem papel importante mediando a fagocitose do patógeno pelas células de Schwann [33]. Além disso, há indícios de que o TLR6 seja importante no reconhecimento e na resposta contra *M. avium* [35].

1.5.2 Resposta imune adaptativa ao *M. avium*

Após o reconhecimento do *M. avium* pelos fagócitos mononucleares, várias citocinas e quimiocinas são secretadas: TNF- α , linfotoxina, IL-6, IL-12 e IL-18; CXCL-1 a 3, CCL-2 a 5, entre outras [52]. Esses produtos secretados irão compor o ambiente necessário à ativação das células T virgens e indução da resposta imune adaptativa. A imunidade adaptativa é centrada nas células T CD4⁺ e na produção de IFN- γ . Nessa resposta, as células T CD8⁺ restritas a MHC de classe I não têm papel importante para o controle da proliferação bacteriana [59]. O IFN- γ ativa tanto macrófagos quanto células dendríticas, tornando-os mais eficientes nas suas funções de eliminação e/ou contenção da bactéria.

Uma das conseqüências da ativação dos macrófagos é o aumento da secreção de TNF- α . Essa citocina está envolvida em ambas as respostas, inata e adaptativa, e a sua ausência está relacionada com aumento de susceptibilidade ao *M. avium* [59, 79]. De fato, essa citocina também é importante na resposta à infecção pelo *M. tuberculosis* e *M. bovis*, na qual animais deficientes para TNF- α ou sua sinalização apresentam uma morte prematura [80].

Uma das principais características da resposta imune adaptativa à infecção por micobactérias é a formação de granulomas. Essas estruturas são dependentes da

cooperação entre células T e células da imunidade inata, bem como da manutenção do microambiente de citocinas, principalmente contendo TNF- α e IFN- γ . Os granulomas são importantes sítios de restrição do crescimento bacteriano, onde os macrófagos são ativados a exercerem sua atividade bactericida e bacteriostática [58, 81].

A resposta imune do tipo 2, envolvendo principalmente IL-4 e IL-13, ou a produção de IL-10, parece não ter papel significativo na determinação de susceptibilidade à infecção por *M. avium* [52].

2. Justificativa

2 JUSTIFICATIVA

Infecções micobacterianas representam um grave problema de saúde pública. Em 2010, as infecções por *M. tuberculosis* chegaram a 8.8 milhões de casos, levando a 1.1 milhões de mortes [82]. Muito esforço tem sido aplicado em políticas que visam a erradicação desse patógeno, como por exemplo a *Stop TB Strategy* [82]. No entanto, as infecções causadas por micobactérias não-tuberculosas são negligenciadas. *M. avium*, que é um agente oportunista ubíquo no ambiente, é responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade em indivíduos imunocomprometidos, apresentando 8.8% de prevalência entre indivíduos infectados pelo HIV-1 no Brasil [55]. Dessa maneira, apesar da aparente não-virulência em indivíduos saudáveis, a infecção pelo *M. avium* deve ser estudada a fim de se obter um melhor entendimento dessa patologia e elucidar mecanismos passíveis de extrapolação a espécies relacionadas.

Como bem abordado por Napolitani e colaboradores [83], estudos com TLRs devem levar em consideração a cooperação entre múltiplos receptores, uma vez que é pouco provável que um único TLR seja individualmente crucial para o estabelecimento da resposta imune contra determinado patógeno. Dessa forma, é importante elucidar o papel do TLR6 nessa infecção, uma vez que este é um dos receptores responsáveis pelo aumento do espectro de reconhecimento do TLR2. Além disso, já foi demonstrado que o TLR6 pode ser o determinante do curso da resposta imunológica, favorecendo a inflamação [29]. Adicionalmente, em infecções pelo *M. avium* é postulado que o animal MyD88 KO apresenta maior susceptibilidade do que o animal TLR2 KO [76], indicando que outros receptores podem estar envolvidos no desencadeamento dessa resposta imune. Recentemente, alguns estudos demonstraram que o TLR6 tem relação com infecções micobacterianas [33, 35]. Portanto, este estudo focou no papel do receptor TLR6 no reconhecimento e controle da infecção causada pelo *M. avium*.

O modelo experimental murino representa uma boa abordagem para o estudo da infecção pelo *M. avium*, uma vez que nessa espécie animal se desenvolve uma patologia semelhante à observada na infecção humana avançada [52]. Assim, investigar o papel de receptores da imunidade inata durante a infecção pelo *M. avium* em modelo murino se mostra uma ferramenta promissora para o entendimento desse processo infeccioso, bem como para o desenvolvimento de possíveis estratégias de intervenção contra a doença.

3. Objetivos

3 OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo central determinar o papel do receptor TLR6 na infecção pelo *Mycobacterium avium*. Para tal, pretendemos atingir os seguintes objetivos específicos:

*Avaliar a ativação de NF- κ B por TLRs após estimulação com *M. avium* através de ensaio de luciferase em células HEK 293.

*Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de macrófagos TLR6, TLR2, TLR2/6 e MyD88 KO derivados da medula óssea através de uma cinética de infecção pelo *M. avium*.

*Avaliar a produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas TLR6, TLR2, TLR2/6 e MyD88 KO derivados da medula óssea após infecção pelo *M. avium*.

*Avaliar a influência do TLR6 na ativação das vias das MAPKs e de NF- κ B de macrófagos e células dendríticas através da análise por Western Blot e pela utilização de inibidores dessas vias, avaliando a produção de citocinas.

*Avaliar a susceptibilidade de animais TLR6, TLR2, TLR2/6 e MyD88 KO 30 e 100 dias após a infecção pelo *M. avium* através de contagem de unidades formadoras de colônias nos pulmões, fígado e baço.

*Determinar o padrão das citocinas TNF- α e IFN- γ da cultura de esplenócitos e do tecido pulmonar dos animais após 30 e 100 dias de infecção.

*Avaliar a alteração histopatológica no fígado de animais TLR6, TLR2, TLR2/6 e MyD88 KO 30 e 100 dias após infecção por *M. avium*.

*Avaliar o efeito do bloqueio do receptor TLR6 e TLR2 em células da linhagem monocítica humana THP-1 na infecção por *M. avium*.

4. Metodologia

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Para todos os experimentos foram utilizados camundongos com 7 a 12 semanas de idade das linhagens C57BL/6, obtidos no Centro de Bioterismo do ICB/UFMG; e camundongos deficientes para as moléculas MyD88 (MyD88 KO), TLR2 (TLR2 KO), TLR6 (TLR6 KO) e simultaneamente para TLR2 e TLR6 (TLR2/6 KO), criados no biotério do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas do ICB/UFMG. Os animais TLR2/6 foram obtidos em nosso laboratório pelo cruzamento entre TLR2 KO e TLR6 KO. A dupla deficiência foi comprovada por PCR utilizando os *primers* descritos na Tabela 01.

Tabela 01: Sequência de *primers* utilizados para tipagem dos animais TLR2/6 KO.

<i>Primer</i>	5' Sequência 3'
TLR2 A	GTT TAG TGC CTG TAT CCA GTC AGT GCG
TLR2 B	TTG GAT AAG TCT GAT AGC CTT GCC TCC
TLR2 ou TLR6 C	ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG
TLR6 A	GAA ATG TAA ATG AGC TTG GGG ATG GCG
TLR6 B	TTA TCA GAA CTC ACC AGA GGT CCA ACC

Foi utilizado o aparelho termociclador PTC-200 (MJ Research Inc.) conforme as seguintes condições: **TLR2:** 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 67°C por 90 segundos e 74°C por 1 minuto; 74°C por 10 minutos; **TLR6:** 95°C por 3 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 67°C por 90 segundos e 72°C por 1 minuto; 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel

de agarose 1%. Nesse PCR, o par de primers A-B era usado para confirmação do genótipo selvagem e o par de primers B-C correspondiam ao gene interrompido pelo gene de resistência à neomicina. Os animais foram mantidos em biotério livre de patógenos, com ambiente controlado e livre acesso a alimento. Para os experimentos, os camundongos eram divididos em grupos de 5 animais. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal (protocolo 145/2012).

4.2 Bactéria e condições de cultivo

Nos experimentos foram utilizadas bactérias da espécie *Mycobacterium avium* da cepa 2447, isolada de paciente com AIDS, exibindo morfotipo liso-transparente (SmT) virulento [56]. Para tal, uma colônia isolada do baço de animais C57BL/6 infectados foi adicionada ao meio líquido Difco™ Middlebrook 7H9 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) contendo 0.05% Tween-80, 0.2% glicerol e suplementado com 10% ADC (do inglês *albumin-dextrose-catalase*) até a fase de crescimento exponencial (7 a 10 dias). As bactérias foram coletadas por centrifugação, re-suspendidas em salina contendo 0.05% Tween-80, brevemente sonicadas e estocadas a -70°C, onde, após quantificação, estavam prontas para uso.

4.3 Ensaio de Luciferase

Células da linhagem HEK 293 (ATCC, Rockville, MD) foram cultivadas em meio DMEM (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado com 10% soro fetal bovino (FBS) até obter confluência de 90% quando então foram transferidas para placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^6 células/poço em meio DMEM suplementado com 10% de FBS e 1% de antibióticos penicilina (100 U/mL, Gibco) e estreptomicina (100 µg/mL,

Gibco). As células foram transfectadas usando polyethylenimina (PEI) e os seguintes plasmídeos na concentração 1 µg/poço: pcDNA3 (Invitrogen), pcDNA3-TLR1, -TLR2 e -TLR6. As células também foram transfectadas com o plasmídeo NF-κB-Luc a 200ng/poço (Fluc) contendo o gene sintético de vagalume *luc2* (*Photinius pyralis*), e o plasmídeo controle pRL-TK a 50 ng/poço (Rluc), que expressa constitutivamente o gene de luciferase *Renilla hRluc* (*Renilla reniformis*), para normalização da eficiência de transfecção. Adicionou-se 150 µL do mix de transfecção a 250 µL de meio suplementado, para cada poço. As placas foram incubadas a 37°C 5% CO₂ por 24 horas. Após esse período, os estímulos *M. avium* 2447 (MOI 5:1), Pam3CSK4 (agonista do TLR2/1 – 1 µg/mL; Invivogen, San Diego, CA) e Malp-2 (agonista de TLR2/6 – 0,1µg/mL; Alexis Biochemicals) foram adicionados nas concentrações mencionadas acima, a um volume final de 200 µL/poço, por 8 horas a 37°C 5% CO₂.

As células foram então re-suspendidas em tampão de lise e testadas para atividade de luciferase, como determinado pelo protocolo do fabricante Dual-Luciferase®Reporter Assay System (Promega, Madison, WI). Brevemente, 5 µl do lisado celular foi adicionado a 45mL do Luciferase Assay Reagent II e a luminescência de Fluc foi quantificada por luminômetro (LumiCount™-Packard). Então, foi adicionado 45 mL de Stop & Go® Reagent e, novamente, foi quantificado por luminômetro, para avaliar luminescência de Rluc. Os resultados são expressos em termos de Fluc/Rluc.

4.4 Infecção *in vivo* e análise da resposta imunológica

Os camundongos foram infectados por via intravenosa com 200 µL contendo 1×10^6 unidades formadoras de colônias (CFUs) de *M. avium*/animal. Os animais foram sacrificados 30 e 100 dias após a infecção.

4.4.1 Determinação da carga bacteriana nos órgãos dos animais infectados

Após o sacrifício, o lóbulo caudal do fígado e o lóbulo direito do pulmão dos camundongos foram extraídos, homogeneizados em água contendo 0.05% Tween-80 com o auxílio de um triturador (TE-099, Tecnal). O baço também foi extraído e homogeneizado em solução salina (NaCl 0.9%) utilizando uma pequena tela de aço. Os órgãos macerados foram diluídos serialmente e plaqueados em meio Difco™ Middlebrook 7H10 Agar (BD Biosciences) suplementado com OADC (do inglês *oleic acid-albumin-dextrose-catalase*). As placas foram incubadas a 37°C e a contagem de CFU foi realizada 10 dias após o plaqueamento das bactérias, utilizando uma lupa. Os resultados foram expressos como a média do log de CFU de cada grupo.

4.4.2 Cultura e estimulação de esplenócitos

As suspensões de células obtidas após os baços serem macerados foram submetidas à centrifugação por 10 minutos a 600g. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi re-suspendido em 1 mL de tampão ACK (10mM KHCO₃, 155mM NH₄Cl, pH 7.2 em água destilada) e incubadas por 5 minutos, à temperatura ambiente, ocorrendo assim a lise osmótica das hemácias. Acrescentou-se solução salina às amostras até atingir o volume de 30 mL, quando então foram

centrifugadas novamente. O pellet foi então re-suspendido em 2 mL de meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% de FSB e 1% dos antibióticos (penicilina e estreptomicina), e a concentração de células foi determinada na câmara de Neubauer.

As células foram cultivadas na concentração de 1×10^6 células/poço em placas de 96 poços com fundo em U (NUNC, Rochester, NY). Em seguida, os esplenócitos foram estimulados com *M. avium* 2447 (MOI 5:1). Células não-estimuladas foram utilizadas como controle negativo e as estimuladas com Concanavalina A (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou LPS de *Escherichia coli* (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) serviram como controle positivo. Após 48 e 72 horas de incubação 37 °C e sob atmosfera com 5% de CO₂, os sobrenadantes foram coletados para a quantificação de TNF- α e IFN- γ .

4.5 Análise por citometria de fluxo

Para a detecção de IFN- γ intracelular, esplenócitos de camundongos C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO infectados por 30 dias foram processados e semeados a 1×10^6 células/poço. Essas células foram então estimuladas com *M. avium* (MOI 5:1) ou ConA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 40 h em estufa a 37°C 5% CO₂. Brefeldina A (1 $\mu\text{g}/\text{poço}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) foi adicionada durante as últimas 4 h de estimulação. As células então foram marcadas para os determinantes de superfície CD4 ou CD8, e IFN- γ intracelular. Brevemente, as células foram incubadas por 20 min com anti-mouse CD16/32 (eBioscience, San Diego, CA) para bloquear os receptores Fc em FACS buffer (PBS, 0.25% BSA, 1 mM NaN₃). Então as células receberam os marcadores de superfície anti-mouse CD4 conjugado a FITC (clone RM4-5, eBioscience) ou anti-mouse CD8 conjugado a biotina (clone 53-6.7, eBioscience) por 20 min. Em seguida, Streptavidina PE-Cy5.5 (eBioscience) foi adicionado. Após 20 min,

as células foram lavadas, fixadas em solução de formaldeído 4% e permeabilizadas com solução de saponina 0.5% em PBS. Em seguida, as células foram marcadas com anti-mouse IFN- γ conjugado a PE (clone XMG1.2, eBioscience) por 30 min. Então elas foram lavadas com a solução de permeabilização e re-suspendidas em PBS. 50.000 eventos foram capturados usando citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA) e os resultados foram analisados usando FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR).

4.6 Análise de citocinas nos pulmões

As concentrações de IFN- γ e TNF- α foram analisadas a partir do tecido pulmonar por ELISA. 100 mg de cada pulmão foi homogenizado em 1 mL de Solução de Extração de Citocinas, que compreende PBS, antiproteases (0.1 mM PMSF, 0.1 mM cloreto de benzetônio, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0.05% de Tween 20. As amostras então foram centrifugadas por 20 min a 3000g e os sobrenadantes foram usados imediatamente para análise por ELISA.

4.7 Análise histopatológica

Fragmentos do fígado dos animais infectados (5 animais por grupo) foram coletados e fixados em paraformaldeído 10%. Os fragmentos foram processados em parafina e cortes histológicos de 6-7 μ m foram feitos utilizando um micrótomo. As secções de fígados foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE). Foram considerados granulomas aqueles com característico infiltrado inflamatório. A imagem de 35 granulomas hepáticos de cada animal foi capturada utilizando um microscópio óptico,

na objetiva de 40x, e digitalizada através da microcâmara Olympus SC30 (Tokyo, JP). A área dos granulomas foi determinada utilizando o programa KS300, conectado ao analisador de imagens Carl Zeiss (Oberkochen, Germany). Os resultados foram expressos como a média da área de cada grupo analisado.

4.8 Geração de macrófagos (BMM) e células dendríticas (BMDC) derivados da medula óssea

Para a obtenção de células da medula óssea, camundongos selvagens, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram sacrificados para extração dos fêmures e tíbias. A extremidade proximal e distal destes ossos foi seccionada e injetou-se 5 mL de HBSS (do inglês *Hank's Balanced Salt Solution*, Gibco) por osso. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 600g por 10 minutos a 4 °C, e o precipitado foi ressuspendido em 10mL/por animal de meio para cultivo DMEM (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Gibco) suplementado com 10% de FBS (Gibco) e submetidas a uma filtração em separadores de nylon com a malha de 70 µm (BD Biosciences) para a remoção de detritos e ruptura de ligações célula-célula. Logo em seguida, as células foram plaqueadas em placas de petri para cultivo celular e incubadas por 3 horas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, as células não aderentes foram coletadas, centrifugadas a 600g por 10 minutos a 4°C, e re-suspendidas em 1 mL de DMEM suplementado. Em seguida, as células foram contadas em câmara de Neubauer.

As células extraídas da medula foram diferenciadas em macrófagos plaqueando-as em placas de 24 poços na concentração de 5×10^5 células/poço. As células foram mantidas em DMEM (Gibco) suplementado com 10% de FBS (Gibco), 1% de HEPES 1M (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e streptomina), e 10% de LCCM (do

inglês L929 *cell conditioned medium*), como uma fonte de M-CSF (fator estimulador de colônias de monócitos). As placas então foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Quatro dias após o plaqueamento inicial, foram adicionados 100 µL/poço de LCCM, e no sétimo dia o meio de cultura foi substituído por um novo meio contendo os mesmos suplementos acima. No décimo dia de cultura as células estavam completamente diferenciadas em macrófagos.

Para a diferenciação em DCs, as células extraídas da medula foram plaqueadas em placas de petri de 35 mm na concentração de 1×10^7 células/placa contendo 7mL de meio DMEM (Gibco), 10% de FSB (Gibco), 1% de HEPES 1M (Gibco), 1% de antibióticos (penicilina e streptomina), e 30% de GM-CSF obtido a partir do sobrenadante de cultura de células Ag8653 (transfectadas com cDNA de GM-CSF murino). As placas então foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Três dias após o plaqueamento inicial, foram adicionados 5 mL de meio fresco contendo GM-CSF. No quinto e sétimo dias 3 mL de meio de cultura foram substituídos por um novo meio contendo os mesmos suplementos acima. No décimo dia de cultura as células não-aderentes foram coletadas e semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço).

4.9 Infecção *in vitro* e análise de citocinas

Para a análise da cinética de infecção, BMMs foram infectados com *M. avium* 2447 (MOI 5:1) durante 4 horas. Em seguida, os poços foram lavados 4 vezes com HBSS e foi acrescentado 1 mL/poço de DMEM suplementado com 10% FSB e 1% HEPES. As células foram lisadas com 0.01% de saponina logo após a infecção (T0), um (T1), três (T3) e sete (T7) dias após a infecção, diluídos serialmente em água contendo

0.05% Tween 80 e plaqueados em meio 7H10 suplementado com OADC, para avaliação do crescimento intracelular da bactéria através de contagem de CFUs.

Para a análise de citocinas, as células foram estimuladas com meio DMEM suplementado contendo *M. avium* 2447 (MOI 5:1), Pam3CSK4 (1 µg/mL; InvivoGen), Malp-2 (0,1 µg/mL; Alexis Biochemicals), *E. coli* LPS (1 µg/mL) ou CpG (1 µg/mL; InvivoGen). Os sobrenadantes foram coletados após 24 horas de estimulação e analisados acerca da concentração de IL-6, IL-12 e TNF-α por ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN).

4.10 Cultura de células THP-1 e bloqueio de TLRs

As células THP-1 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 10% FBS (Gibco) e 1% de antibióticos (penicilina e streptomina). O meio foi renovado a cada 3-4 dias, quando a confluência alcançava $1-3 \times 10^6$ células/mL. Para a diferenciação dos monócitos, 5×10^5 células foram semeadas em placas de 24 poços onde foi permitido adesão e diferenciação por 48h na presença de PMA 100 nM (Sigma-Aldrich).

As células THP-1 diferenciadas com PMA foram então incubadas com 1 µg/mL dos anticorpos anti-human TLR2 (clone B4H2; Invivogen, San Diego CA), anti-human TLR6 (clone C5C8; Invivogen), IgA2 isotype control (clone T9C6; Invivogen), ou IgG1 isotype control (clone T8E5; Invivogen) durante 1h a 37°C. Para o tratamento denominado anti-TLR2/TLR6, 1 µg/mL de cada anticorpo foi adicionado aos poços. Após isso, adicionamos meio, *M. avium* (MOI 5:1), LPS (1 µg/mL) ou Malp-2 (0,01 µg/mL) aos poços. Os sobrenadantes foram coletados após 24 hrs de estimulação para análise dos níveis de TNF-α humano (BD Biosciences, San Diego, CA).

4.11 PCR em tempo real

BMMs e BMDCs (5×10^5 células/poço) de camundongos C57BL/6 foram infectados com *M. avium* cepa 2447 durante 24 horas. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e as células infectadas foram homogeneizadas em reagente TRIzol (Invitrogen) para isolar RNA total. A transcrição reversa de 1 µg de RNA total foi realizada usando Illustra™ Ready-To-Go RT-PCR Beads (GE Healthcare, Buckinghamshire, ENG) de acordo com instruções do fabricante. O PCR em tempo real foi conduzido com um volume final de 10 µL contendo SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), oligo(dT), cDNA como o molde de PCR, e 10 µM de *primers* de acordo com o alvo a ser amplificado. A reação foi realizada no aparelho ABI 7900 real-time PCR system (Applied Biosystems) usando os seguintes parâmetros: 60°C por 10 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 1 min, e um estágio de dissociação de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 15 s, e 60°C por 15 s. Os *primers* foram usados para amplificar um fragmento específico de 100 a 120 pares de bases correspondendo a um gene específico. Os *primers* usados para os genes TLR1, TLR2, TLR6 e β-actina estão listados na Tabela 02.

As células THP-1 (1×10^6 células/poço; placa de cultura de 6 poços) foram estimuladas com PMA 100 nM ou com meio durante 24 hrs. Após este período, as células foram processadas como descrito acima e a expressão de CD14 foi avaliada.

Tabela 02: Sequência de *primers* utilizados no PCR em tempo real.

<i>Primer</i>	5' Sequência 3'
Murine TLR1 forward	CCGTGATGCACAGCTCCTTGGTTT
Murine TLR1 reverse	TGTCCACAATTGCCTCTGCTCGC
m-TLR2 forward	GCTGGCGACCGGGAAGTTCG
m-TLR2 reverse	TCTCCTGCCAGTGACCGCCT
m-TLR6 forward	AGAAAATGGTACCGTCAGTGCTGGA
m-TLR6 reverse	AGGCCAGGGCGCAAACAAAG
Human CD14 forward	GGTGCCGCTGTGTAGGAAAGA
Human CD14 reverse	GGTCCTCGAGCGTCAGTTCCT
m- β -actina forward	AGGTGTGCACCTTTTATTGGTCTCAA
m- β -actina reverse	TGTATGAAGGTTTGGTCTCCCT
h-GAPDH forward	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT
h-GAPDH reverse	ACGACCAAATCCGTTGACTC

Todos os resultados são apresentados como unidades de expressão relativa após normalização à expressão do gene β -actina ou GAPDH. As análises foram conduzidas em triplicata.

4.12 Ensaio de Western blot

BMMs e BMDCs derivadas como descrito acima foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço). No dia 10 de cultura, as células foram incubadas em meio sem FBS por 16 h e então estimuladas com *M. avium* (MOI 5:1), meio ou LPS por 10 min (BMM) ou 30 min (BMDC). As células THP-1 derivadas na presença de PMA foram carenciadas por 16 h em meio sem FBS e então tratadas com anticorpos como mencionado anteriormente. Em seguida, essas células foram estimuladas com *M. avium* (MOI 5:1) ou meio durante 30 min. Após o tratamento, todas as células foram lavadas com HBSS (Gibco) a temperatura ambiente e lisadas com tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 10 mM β -glicerofosfato, 0.1 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Triton X-100, 1 mM ortovanadato de sódio e coquetel de inibidores de protease (1:100; Sigma-Aldrich). A concentração de proteínas foi determinada pelo método do ácido bicinonínico. Quantidades iguais de proteína foram carregadas em géis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e então transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare) de acordo com técnicas padrão. As membranas foram bloqueadas por 1 h em temperatura ambiente com tampão de bloqueio (TBS contendo 0.1% Tween-20 e 5% leite em pó desnatado) antes de incubação com anti-fosfo-JNK (clone 81E11), fosfo-ERK1/2 (clone D13.14.4E), fosfo-p38 (clone D3F9), I κ B- α (clone 44D4) ou β -actina (clone 13E5) *overnight* a 4°C. Então as membranas foram incubadas com anti-rabbit IgG conjugado a HRP durante 1 h em temperatura ambiente e as bandas de proteínas foram visualizadas usando substrato quimioluminescente para HRP Luminol (Millipore, Billerica, MA) e capturadas em *scanner* Storm System 860 (GE Healthcare). Todos os anticorpos monoclonais usados foram adquiridos de Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, MA). A análise de densitometria foi realizado usando programa KODAK versão 1D-3.5.

4.13 Ensaio de inibição de MAPKs e NF- κ B

BMMs e BMDCs foram semeadas em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço) e incubadas na presença dos inibidores de MAPKs U0126 (ERK1/2), SP600125 (JNK), SB203580 (p38) ou do inibidor de NF- κ B Bay11-7082 em variadas concentrações por 45 min. Após esse período, as células foram estimuladas com *M. avium* 2447 (MOI 5:1). Após 24 h os sobrenadantes foram coletados analisados acerca da concentração de IL-12 e TNF- α por ELISA.

4.14 Dosagem de citocinas por ELISA

As citocinas IL-12p40, IL-6, TNF- α e IFN- γ murinos foram dosadas através do método de ELISA, utilizando os kits adquiridos da R&D Systems, de acordo com o protocolo do fabricante. O TNF- α humano foi dosado utilizando o kit BD Biosciences, seguindo recomendações do fabricante.

4.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por testes *t* de student não pareado ou One-way Anova com pós-teste de Tukey, utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Foram considerados significativos os valores de $p < 0.05$.

5. Resultados

5 RESULTADOS

5.1 TLR6 age sinergicamente com TLR2 no reconhecimento do *M. avium* em células HEK 293

O domínio intracelular do TLR6 não é funcionalmente equivalente ao domínio intracelular de outros TLRs, como o TLR4. Com isso, o TLR6 é incapaz de disparar a cascata de sinalização intracelular sem um receptor parceiro [84]. Dessa forma, o receptor TLR6 atua como um receptor adjunto a outros [27, 84], o que aumenta o espectro de agonistas dos receptores aos quais se liga. Utilizando o ensaio de luciferase analisamos a sinalização desencadeada pelo TLR6 mediante a estimulação por *M. avium*. Esse sistema permite a avaliação de receptores individuais ou grupos de receptores que, quando estimulados, levam à expressão do gene da luciferase, permitindo a quantificação relativa da ativação.

Pela análise da expressão de FLuc (luciferase induzida por ativação) em relação à RLuc (luciferase produzida constitutivamente), observamos que os receptores TLR1 e TLR6 não ativam a via de sinalização sem o auxílio de TLR2 (Figura 06). No entanto, quando estimulamos com *M. avium*, a sinalização via TLR2/6 se mostrou significativamente maior em comparação ao heterodímero TLR2/1 e aos receptores individualmente, indicando que o reconhecimento dessa bactéria ocorre também via TLR6 e esse reconhecimento apresenta efeito sinérgico quando associado ao receptor TLR2.

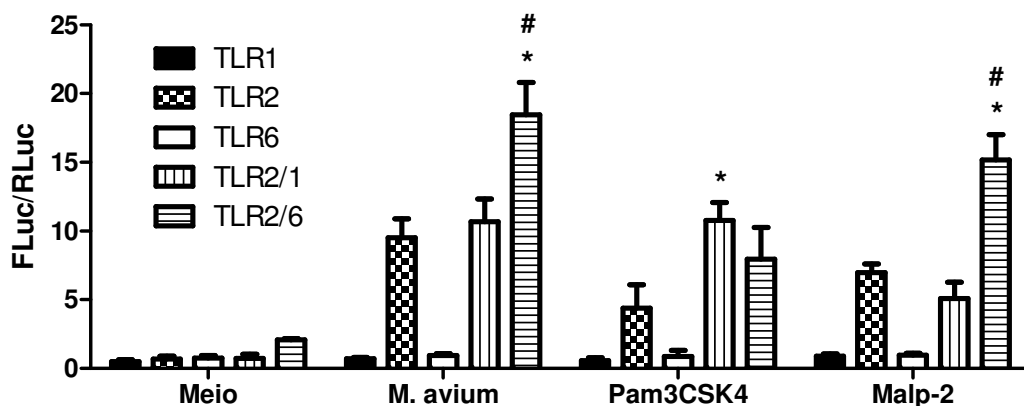


Figura 06: Efeito sinérgico entre TLR2 e TLR6 após estímulo com *M. avium*. Células HEK 293 foram transfectadas com plasmídios codificando TLRs e estimuladas com Pam3CysK4 (agonista de TLR2/1), Malp-2 (agonista de TLR2/6) ou *M. avium*. Após 8 horas de estímulo, as proporções de FLuc e RLuc foram mensuradas e a produção relativa obtida. O resultado é expresso em unidades arbitrárias. (*) indica valor estatisticamente significativo referente à TLR2; (#) indica valor estatisticamente significativo referente ao TLR2/1; $p < 0.05$.

5.2 Obtenção e análise dos animais TLR2/6 KO

O receptor TLR6 necessita associar-se a outro receptor a fim de ativar as cascatas de sinalização intracelular e estimular a produção de citocinas. Surpreendentemente, o resultado do ensaio de luciferase indicou que a sinalização mediada por *M. avium* apresenta efeito sinérgico quando ocorre a associação entre TLR2/TLR6. Dessa forma, objetivamos gerar o animal duplo knockout TLR2 e TLR6 (TLR2/6 KO) a fim de enriquecer a análise experimental dos fenômenos imunológicos envolvendo o TLR6 na infecção pelo *M. avium*.

O animal TLR2/6 KO foi obtido a partir do cruzamento entre um animal TLR2 KO e um animal TLR6 KO e seguiu a segregação mendeliana de di-híbridos. Após a geração F1 (heterozigota), conduzimos auto-cruzamentos entre os animais até obtermos matrizes puras TLR2/6 KO. Os animais provenientes dessas matrizes foram utilizados nos experimentos subsequentes (Figura 07). A ausência de alelos funcionais de *tlr2* e

tlr6 foi confirmada por PCR (Figura 08). Neste experimento, o par de primers para identificação da sequência selvagem é o AB e o par identificador da sequência interrompida pelo cassete de neomicina é o BC. O tamanho esperado do fragmento amplificado de TLR2 correspondia a aproximadamente 2000 pares de bases. Para TLR6, o tamanho esperado foi de aproximadamente 500 pares de bases. Em algumas reações é possível observar ampliações inespecíficas. No entanto, estas reações não dificultavam a análise do fenótipo.

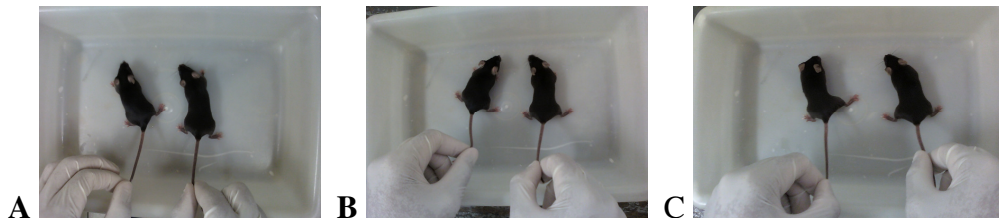


Figura 07: Animais TLR2/6 KO apresentam background C57BL/6. Os animais TLR2/6 KO não são fenotipicamente diferentes dos demais animais knockouts. Para exemplificar, pareamos lado a lado animais com a idade de 06 semanas. Estão representados em (A) C57BL/6 e TLR2/6 KO; (B) TLR2 KO e TLR2/6 KO; (C) TLR6 KO e TLR2/6 KO.

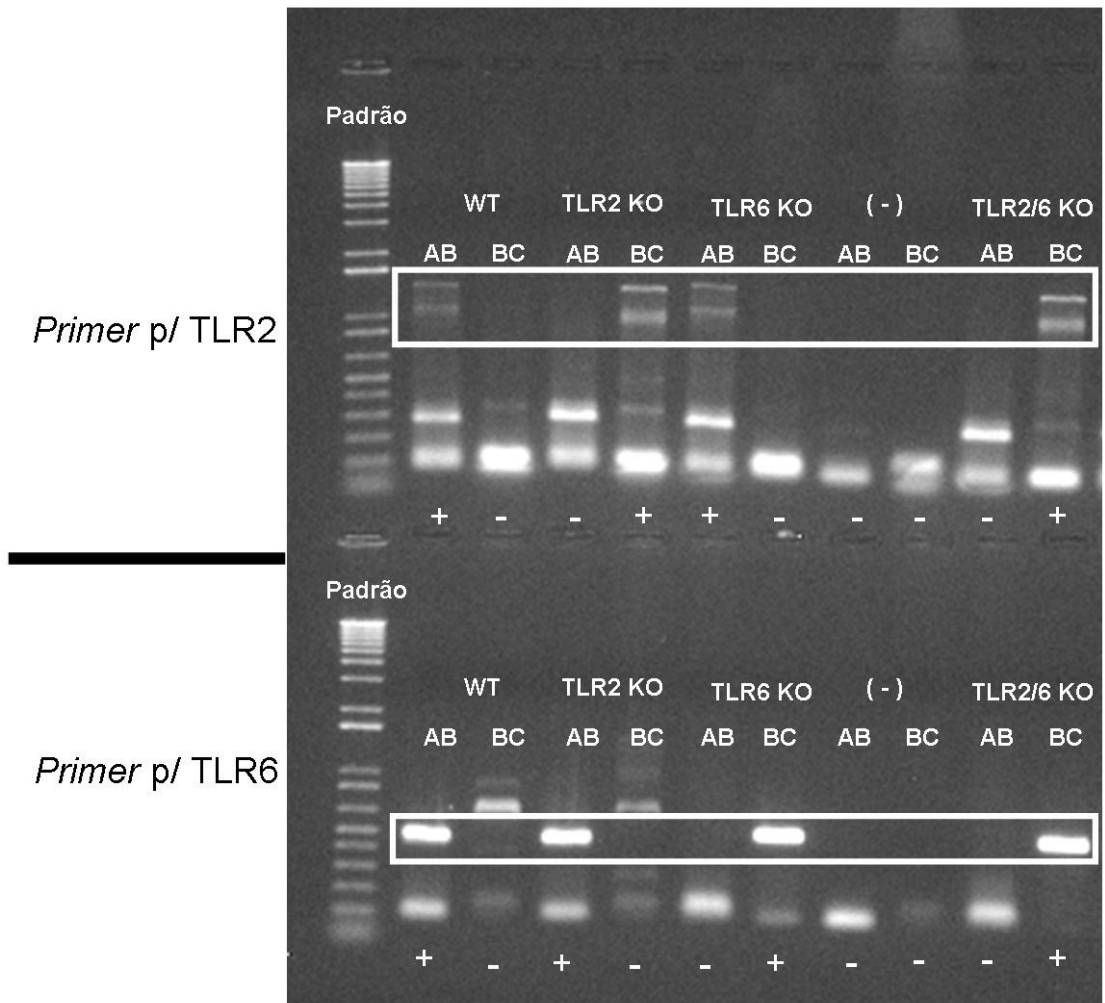


Figura 08: Tipagem dos animais TLR2/6 KO. No primeiro painel estão representadas as amostras utilizando pares de *primers* para amplificação do gene de *tlr2* (par AB para sequência selvagem e par BC para sequência interrompida pelo cassete de neomicina). No segundo painel estão representadas as mesmas amostras utilizando pares de *primers* para amplificação do gene *tlr6* (par AB para sequência selvagem e par BC para sequência interrompida pelo cassete de neomicina). Os fragmentos considerados positivos estão demarcados pelo quadro branco. Padrão: 1Kb DNA Ladder (Life Technologies)

5.3 Avaliação do papel de TLR6 em BMMs e BMDCs durante a infecção por *M. avium*

5.3.1 Infecção por *M. avium* induz a expressão de TLR2 e TLR6 em BMMs e BMDCs

Durante infecções, um evento importante é o reconhecimento de PAMPs pelos TLRs, o que ajuda a estabelecer a resposta imune inata contra os patógenos. Para avaliar a participação de TLR6 na infecção por *M. avium*, a expressão relativa de TLR1, 2 e 6 em BMMs e BMDCs foi analisada após 24 horas de exposição ao patógeno. O nível de expressão de todos os três TLRs estava aumentado significativamente quando comparados às células não estimuladas. Além disso, nós observamos que os níveis de expressão de TLR2 e TLR6 foram significativamente maiores comparados aos níveis de TLR1. Adicionalmente, observamos maiores níveis de transcritos de TLR2 e TLR6 em macrófagos quando comparados aos expressos pelas células dendríticas.

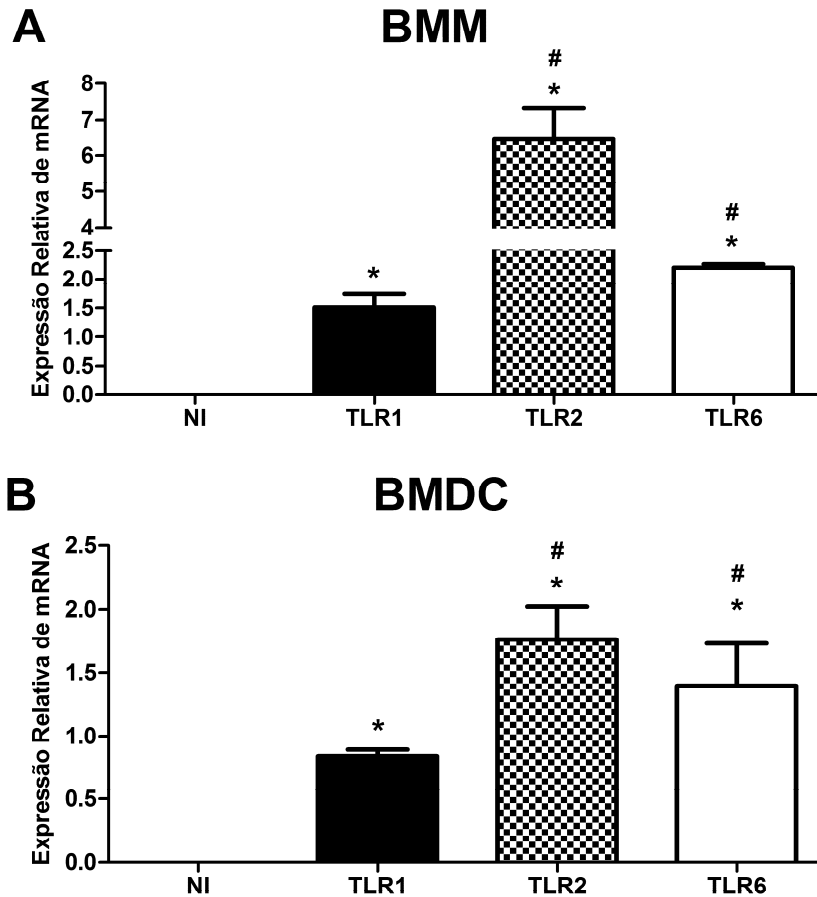


Figura 09: Infecção por *M. avium* induz a expressão de TLR2 e TLR6. (A) BMMs e (B) BMDCs de camundongos C57BL/6 foram infectados com *M. avium* 2447. Após 24 horas de infecção as células foram homogeneizadas em reagente TRIzol para isolamento de RNA total. Após isso, PCR em tempo real foi realizado utilizando *primers* para TLR1, TLR2, TLR6 e β -actina. O resultado é apresentado em unidades arbitrárias de expressão relativa após normalização quanto à expressão do gene de β -actina. Os valores de expressão observados nas células não-infectadas (NI) foram subtraídos dos valores das células estimuladas. (*) indica valor estatisticamente significativo referente às células NI ($p < 0.05$); (#) indica valor estatisticamente significativo referente à expressão de TLR1 ($p < 0.05$).

5.3.2 Ausência de TLR6 altera a produção de citocinas pró-inflamatórias em células dendríticas mas não afeta a produção por macrófagos

As células apresentadoras de antígenos orquestram as respostas imunes através da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-12 e IL-6. Para investigar o papel de TLR6 na produção de citocinas pró-inflamatórias pelas APCs, macrófagos e

células dendríticas foram estimuladas por 24 horas com *M. avium*. Os BMMs dos camundongos MyD88, TLR2 e TLR2/6 KO apresentaram produção reduzida de TNF- α , IL-12 e IL-6. No entanto a produção dessas citocinas não foi dependente de TLR6, uma vez que seus níveis nas células TLR6 KO foram similares ao apresentado pelas células selvagens (Figura 10). Com relação às células dendríticas, a produção de citocinas pelas células provenientes de camundongos MyD88, TLR2 e TLR2/6 KO também estava comprometida. Contudo, as BMDCs TLR6 KO mostraram reduzida produção de TNF- α , IL-12 e IL-6 quando comparadas às C57BL/6 (Figura 11). Estes resultados indicam que o TLR6 possui papéis diferentes na produção de citocinas pró-inflamatórias após estímulo por *M. avium* dependendo do tipo celular, sendo importantes para células dendríticas mas dispensáveis para macrófagos.

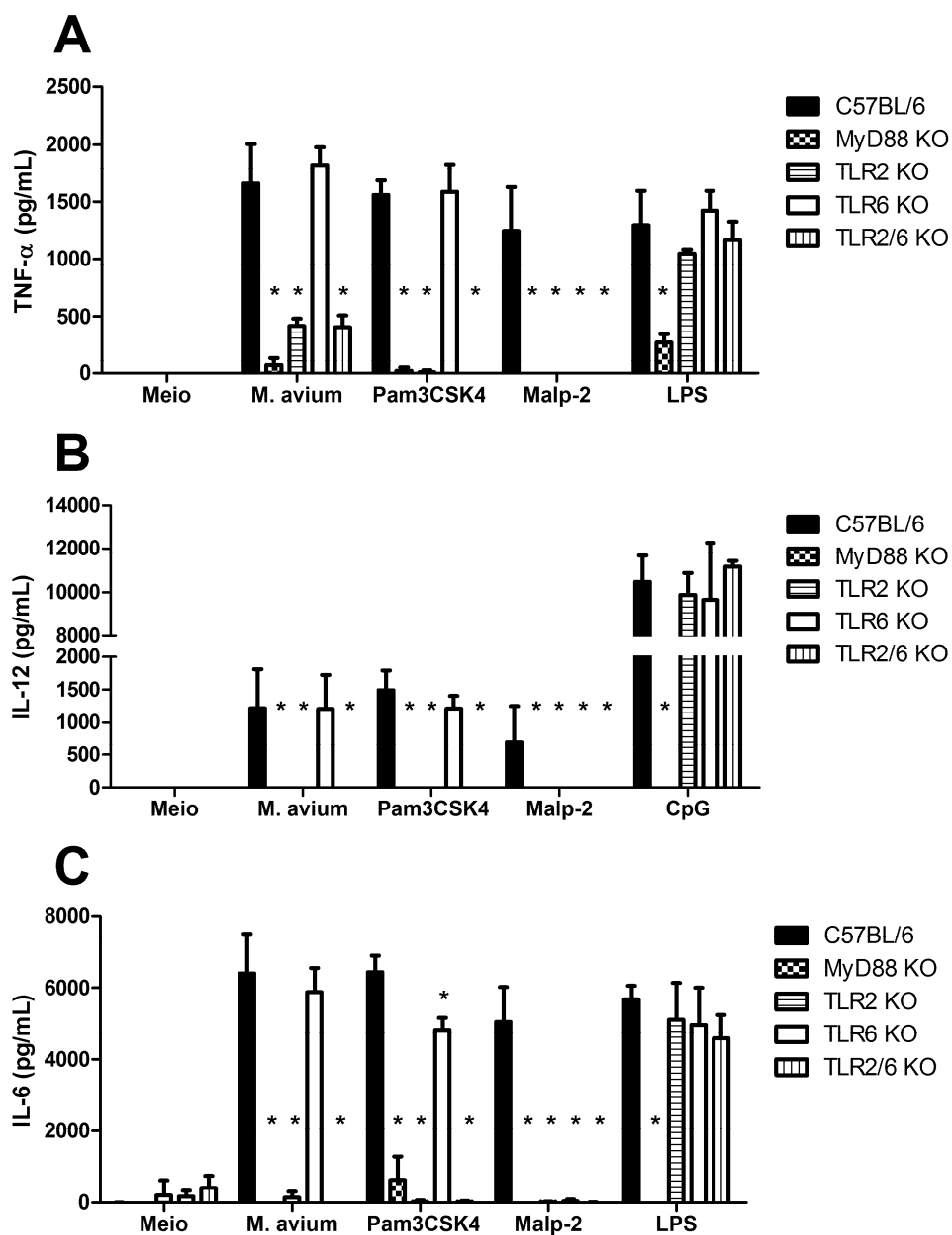


Figura 10: Produção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos em resposta ao *M. avium*. BMMs de camundongos C57BL/6 e MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram cultivadas e estimuladas com *M. avium* 2447 (MOI 5:1), Pam3CSK4, Malp-2, CpG, LPS de *E. coli* ou meio. Os níveis de (A) TNF- α , (B) IL-12p40 e (C) IL-6 foram determinados por ELISA a partir dos sobrenadantes após 24 horas de estimulação. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0.05$.

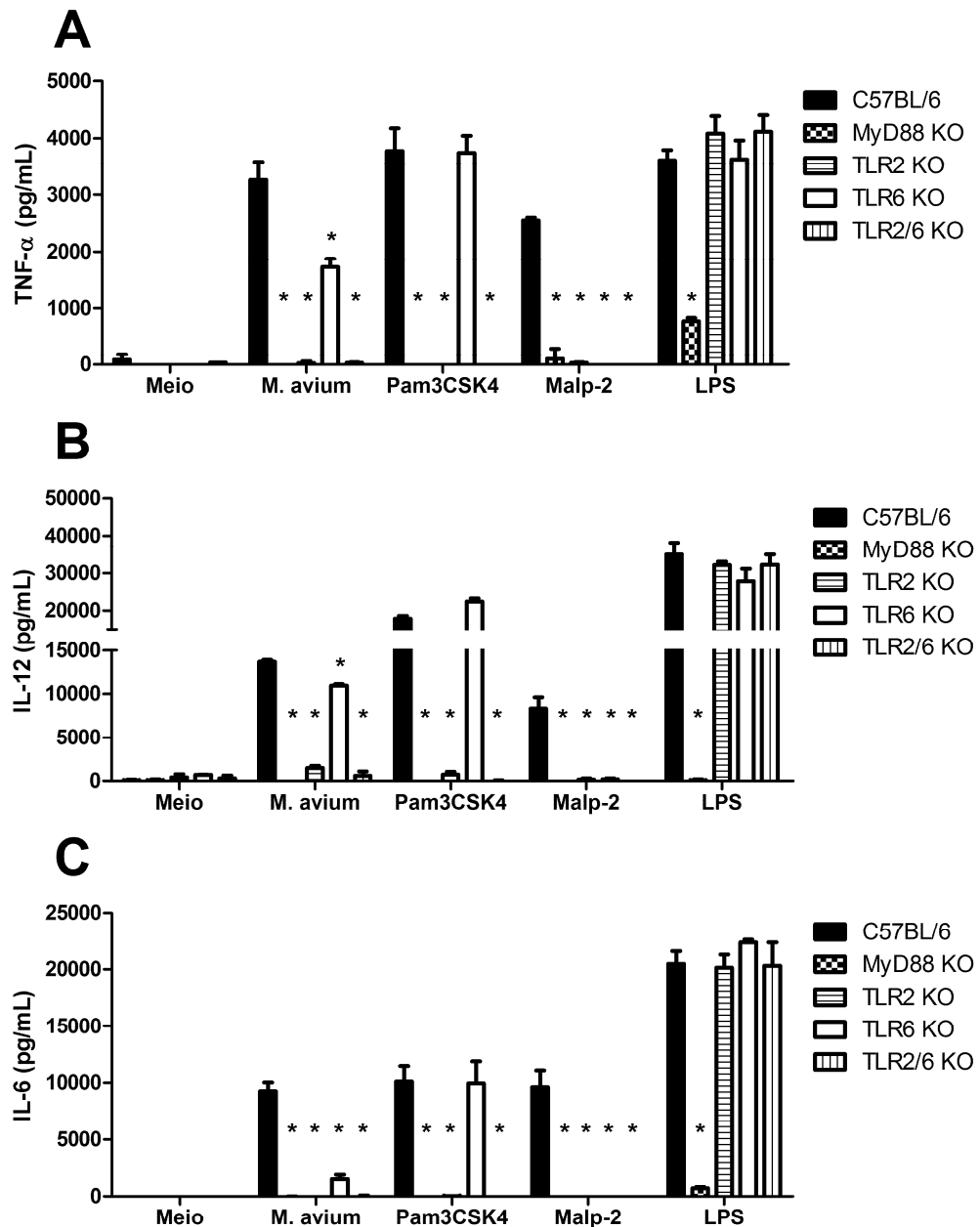


Figura 11: TLR6 é necessário para a produção eficiente de citocinas pró-inflamatórias pelas células dendríticas em resposta ao *M. avium*. BMDCs de camundongos C57BL/6 e MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram cultivadas e estimuladas com *M. avium* 2447 (MOI 5:1), Pam3CSK4, Malp-2, CpG, LPS de *E. coli* ou meio. Os níveis de (A) TNF- α , (B) IL-12p40 e (C) IL-6 foram determinados por ELISA a partir dos sobrenadantes após 24 horas de estimulação. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0.05$.

5.3.3 BMM TLR6 KO são mais susceptíveis à infecção por *M. avium*

Os macrófagos têm papel importante na infecção por *M. avium* por serem as principais células hospedeiras e por também serem células efetoras. A fim de verificar se a deficiência para TLR6 alterava a susceptibilidade dos BMMs no decorrer da infecção por *M. avium*, tais células foram infectadas e o crescimento intracelular da bactéria foi avaliado no decorrer de 7 dias.

Observamos que as células dos animais selvagens, MyD88 KO, TLR2 KO, TLR6 KO e TLR2/6 KO apresentavam uma cinética de infecção similar (Figura 12). No entanto, no ponto referente ao sétimo dia, os animais deficientes para os TLRs ou para a molécula adaptadora MyD88 apresentaram as maiores contagens de CFUs. O aumento observado indica que os mecanismos de controle dessa infecção pelos macrófagos envolvem a sinalização via o heterodímero TLR2 e TLR6.

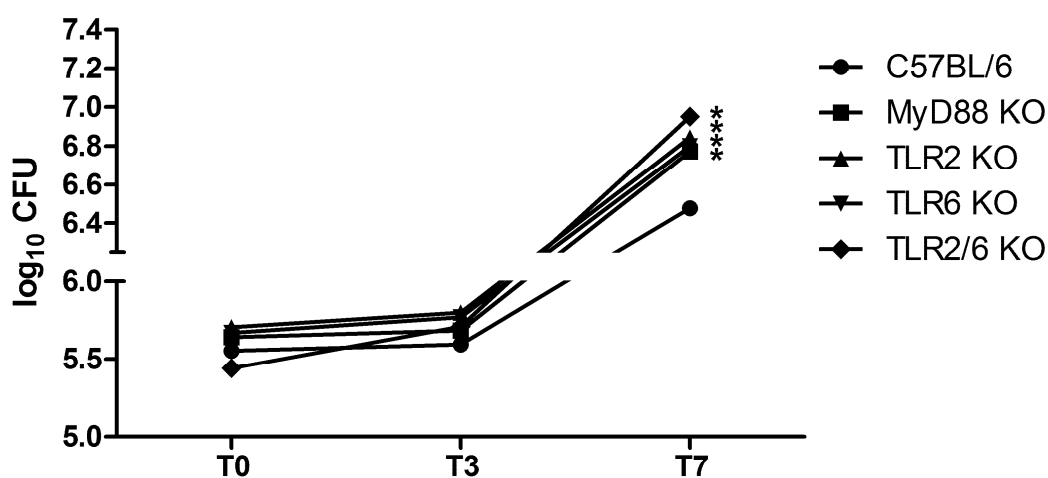


Figura 12: Aumento da carga bacteriana devido à deficiência em TLR6 em macrófagos infectados com *M. avium*. BMM de animais C57BL/6, MyD88 KO, TLR2 KO, TLR6 KO e TLR2/6 KO foram infectados com *M. avium* 2447 e o crescimento intracelular bacteriano foi avaliado durante um período de 07 dias, nos pontos determinados no gráfico. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0.05$.

5.3.4 TLR6 é importante para ativação de MAPKs em BMMs e BMDCs

Várias vias de sinalização celular são ativadas após o reconhecimento e internalização de micobacterias. Esses sinais iniciam uma cascata de eventos que levam à produção de moléculas imunes efetoras [85]. Para investigar o papel de TLR2 e TLR6 nas vias de sinalização induzidas por *M. avium*, BMMs e BMDCs foram estimuladas com a bactéria e a fosforilação dos componentes da via das MAPKs foi analisada. Além disso, a ativação do fator de transcrição NF- κ B foi avaliada indiretamente pela degradação de seu inibidor I κ B- α .

A fim de escolher o tempo ideal de estimulação para análise da ativação das MAPKs, macrófagos e células dendríticas selvagens foram infectados por 10, 30 ou 60 minutos e a presença de ERK1/2, JNK e p38 fosforiladas foi avaliada. Em BMMs, observa-se que após 10 minutos de estímulo as três MAPKs avaliadas já apresentam o pico de ativação. Com relação às células dendríticas, após 10 minutos já se observa ERK1/2 e p38 fosforiladas. No entanto, o pico de ativação ocorre após 30 minutos de estímulo. Além disso, JNK também apresenta um pico de fosforilação após 30 minutos. Dessa forma, optamos por avaliar a ativação de MAPKs após 10 minutos de estimulação em BMMs e após 30 minutos de estimulação em BMDCs.

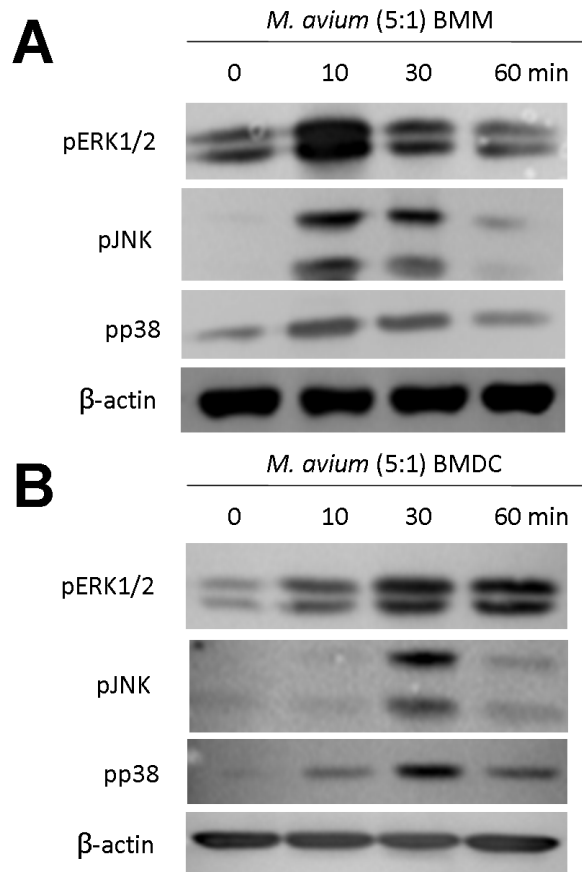


Figura 13: Cinética de ativação de MAPKs após estímulo por *M. avium*. (A) BMMs e (B) BMDCs foram infectadas com *M. avium* 2447 durante 10, 30 ou 60 minutos e os níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 foram avaliados. Os picos de ativação foram observados após 10 minutos de infecção em BMMs e após 30 minutos em BMDCs.

Uma vez determinado o tempo ótimo de estímulo, as células de animais C57BL/6 ou TLR2, TLR6, TLR2/6 e MyD88 KO foram infectadas com *M. avium* e a ativação de MAPKs e, indiretamente, de NF- κ B, foi avaliada. A ativação das MAPKs foi avaliada pela presença de proteínas fosforiladas. Já o perfil de ativação de NF- κ B é observado pela degradação de I κ B- α : a ausência de bandas indica NF- κ B ativado. A fosforilação de JNK estava bastante reduzida tanto em macrófagos quanto em células dendríticas TLR2, TLR6, TLR2/6 e MyD88 KO. Ademais, a ativação de ERK1/2 e p38 foi parcialmente reduzida em todas as células *knockouts*. No entanto, o perfil de I κ B- α foi diferentemente alterado em BMMs e BMDCs. A estimulação com *M. avium* levou à degradação de I κ B- α nas células selvagens, como esperado. No entanto, os macrófagos deficientes para TLRs ou MyD88 apresentaram redução parcial dos níveis de I κ B- α . Com relação à BMDCs, todas as células *knockouts* apresentaram altos níveis de I κ B- α , indicando que a ativação de NF- κ B estimulado por *M. avium* depende de TLR2, TLR6 e MyD88 nesse tipo celular. Em resumo, esses resultados indicam que a infecção pelo *M. avium* ativa uma via dependente de TLR2/6-MAPKs tanto em macrófagos quanto em células dendríticas. No entanto, parece que a ativação de NF- κ B é parcialmente dependente de TLRs em macrófagos enquanto em células dendríticas a via envolvendo TLR2/6 é essencial para a ativação desse fator de transcrição.

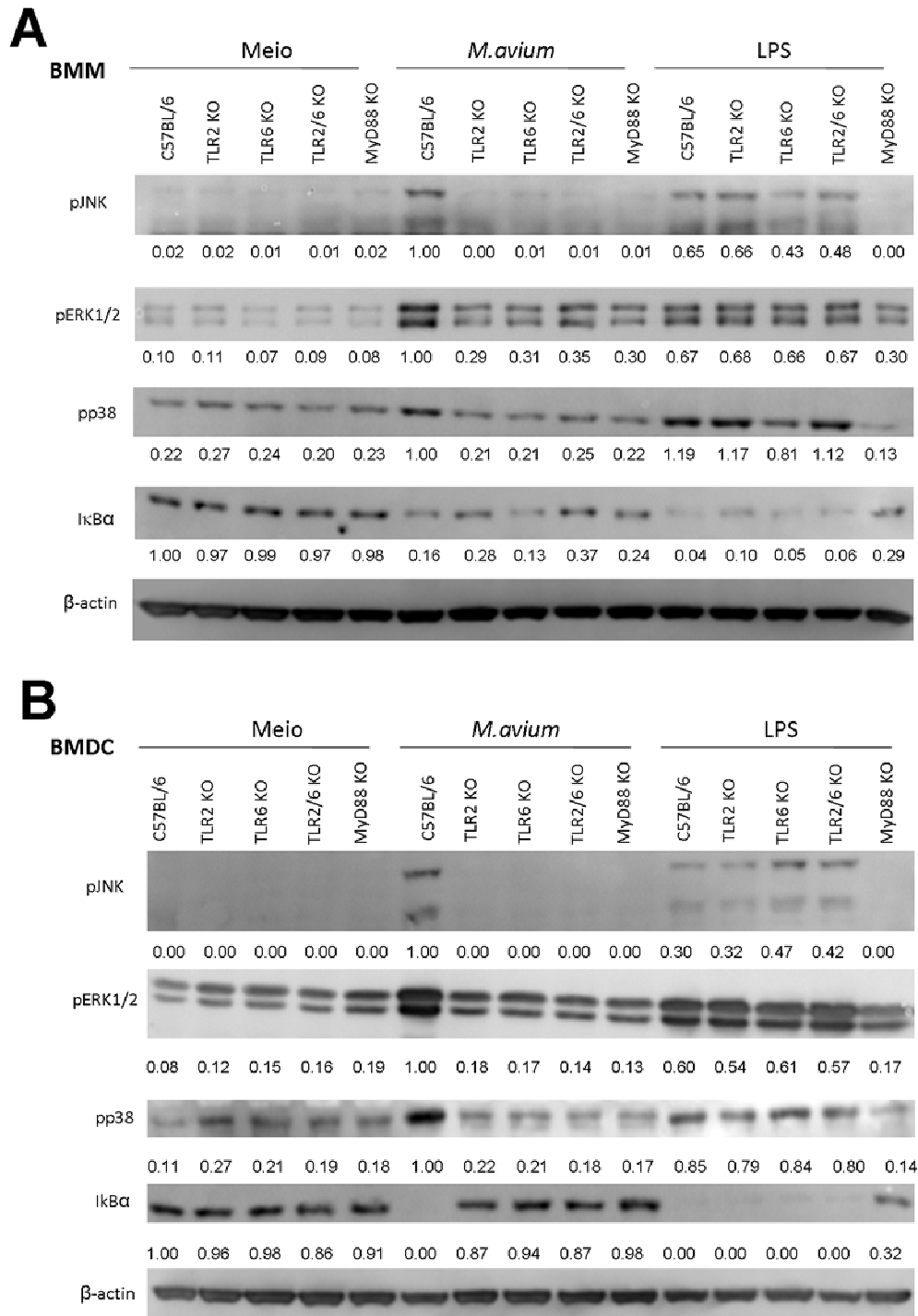


Figura 14: Ativação de MAPKs e NF-κB após infecção por *M. avium* depende de TLR2/6. (A) BMMs e (B) BMDCs de camundongos C57BL/6, TLR2, TLR6, TLR2/6 e MyD88 KO foram estimuladas com *M. avium* 2447, LPS ou meio durante 10 ou 30 minutos, respectivamente. Os níveis de fosforilação de JNK, ERK1/2, p38 e IκB-α foram avaliados. As quantidades de β-actina foram usadas como controle. Os valores sob as bandas indicam a quantificação relativa ao C57BL/6, em unidades arbitrárias.

5.3.5 BMMs e BMDCs apresentam requerimentos diferentes para a produção de citocinas após infecção pelo *M. avium*

Após o reconhecimento do estímulo pela célula, as proteínas das vias das MAPKs podem ser fosforiladas se tornando funcionais, e isto culmina na ativação de fatores de transcrição que levarão à produção de moléculas, como as citocinas [86]. A fim de investigar a relevância de JNK, ERK1/2, p38 e NF- κ B na produção de citocinas, BMMs e BMDCs foram estimuladas com *M. avium* na presença de concentrações crescentes de inibidores específicos para cada uma dessas proteínas e os níveis de TNF- α e IL-12 foram medidos. Em macrófagos, apenas a via envolvendo ERK1/2 se mostrou importante para a produção de TNF- α . No entanto, a produção de IL-12 foi influenciada por JNK e p38, mas não por ERK1/2 (Figura 15). Quanto às células dendríticas, a produção de TNF- α foi influenciada por ERK1/2 e por p38, enquanto a produção de IL-12 foi alterada apenas com o inibidor de p38. Nessas células, a inibição de JNK não influenciou a produção de citocinas (Figura 16). A inibição de NF- κ B mostrou que esse fator de transcrição é importante para a produção de ambas citocinas em BMMs e BMDCs. Além disso, os resultados sugerem que o NF- κ B é mais importante para a produção de citocinas em BMDCs do que em BMMs, uma vez que concentrações baixas de inibidor alteravam os níveis de TNF- α e IL-12 (Figura 17).

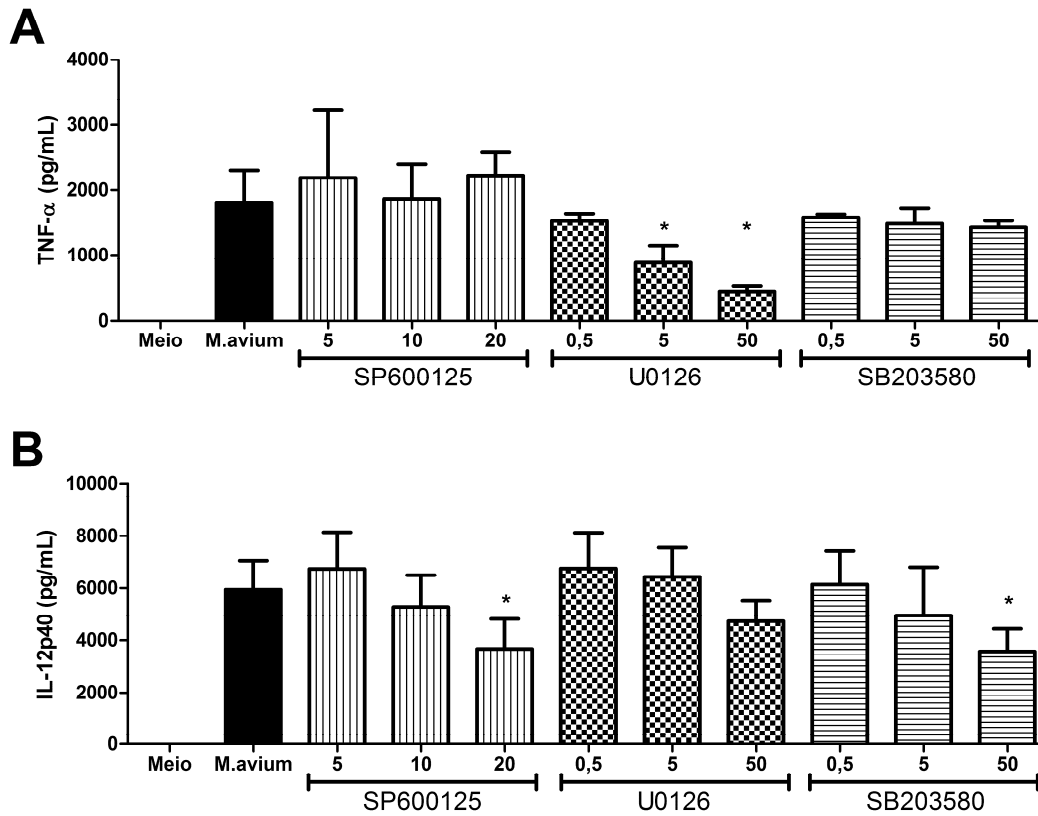


Figura 15: Inibição de MAPKs influencia a produção de citocinas em BMMs após estímulo por *M. avium*. Macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados por 45 minutos na presença dos inibidores de JNK (SP600125), ERK1/2 (U0126) e p38 (SB203580) e então foram estimulados com *M. avium* 2447 durante 24 horas. Então os níveis de (A) TNF- α e (B) IL-12 foram avaliados nos sobrenadantes. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao *M. avium*; $p < 0.05$.

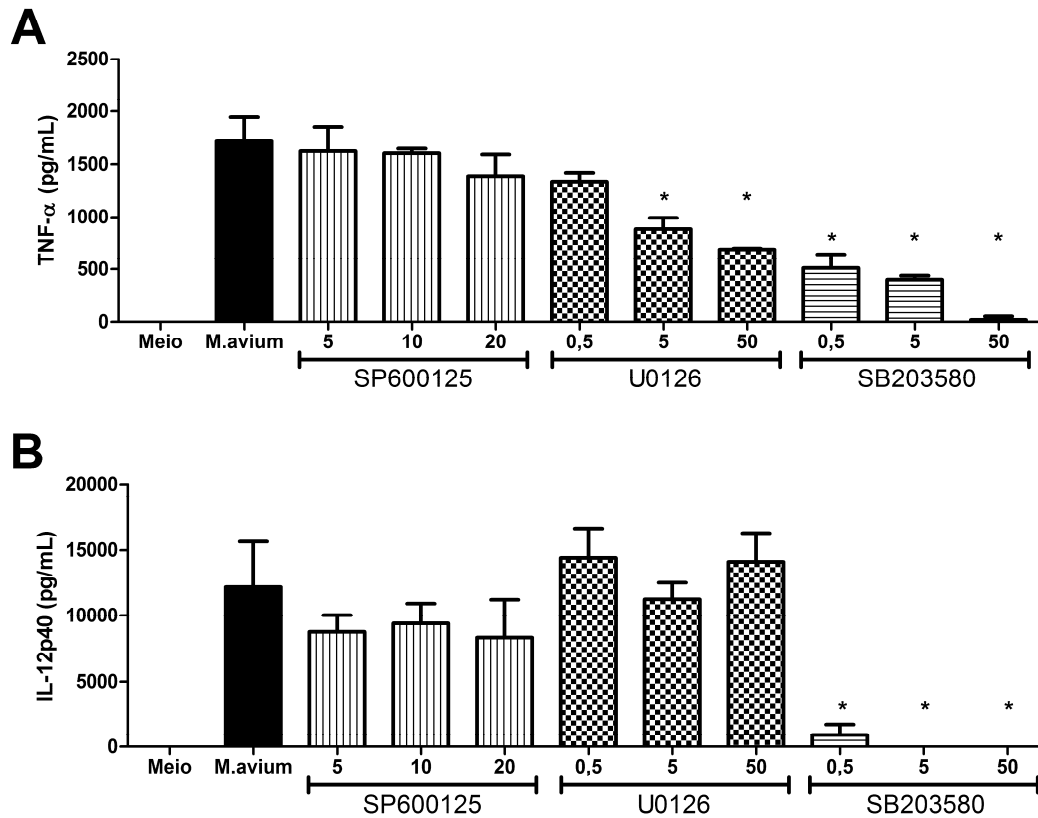


Figura 16: Inibição de MAPKs influencia a produção de citocinas em BMDCs após estímulo por *M. avium*. Células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubadas por 45 minutos na presença dos inibidores de JNK (SP600125), ERK1/2 (U0126) e p38 (SB203580) e então foram estimuladas com *M. avium* 2447 durante 24 horas. Então os níveis de (A) TNF- α e (B) IL-12 foram avaliados nos sobrenadantes. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao *M. avium*; $p < 0.05$.

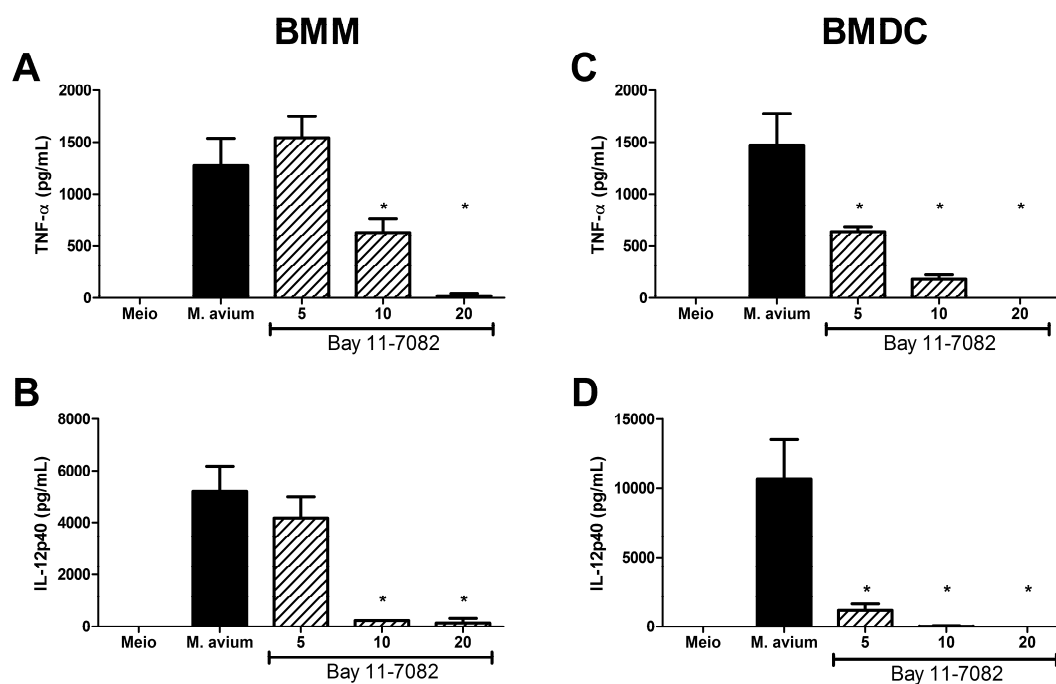


Figura 17: Inibição de NF- κ B influencia a produção de citocinas em BMMs e BMDCs após estímulo por *M. avium*. Macrófagos (A e B) e células dendríticas (C e D) derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foram incubados por 45 minutos na presença do inibidor de NF- κ B (Bay11-7082) e então foram estimulados com *M. avium* 2447 durante 24 horas. Então os níveis de TNF- α e IL-12 foram avaliados nos sobrenadantes. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao *M. avium*; $p < 0.05$.

5.4 Avaliação do papel de TLR6 na infecção por *M. avium* *in vivo*

Com os dados *in vitro* bem estabelecidos, investigou-se o reflexo da ausência do TLR6 no decorrer da infecção *in vivo*. A fim de verificar a contribuição do receptor na resposta imune do hospedeiro contra *M. avium*, animais selvagens, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram infectados por via intravenosa e avaliados após 30 ou 100 dias.

5.4.1 Animais deficientes para TLR6 são mais susceptíveis à infecção por *M. avium*

Após os períodos determinados, os animais foram sacrificados e o crescimento bacteriano foi avaliado no baço, no fígado e nos pulmões (Figura 18). Nos pulmões e no fígado as contagens de CFUs foram maiores nos animais TLR6, MyD88, TLR2 e TLR2/6 KO comparados aos animais C57BL/6. No entanto, esse aumento de susceptibilidade no baço só foi observado após 100 dias de infecção nos animais TLR6 KO, ao contrário dos animais MyD88, TLR2 e TLR2/6 KO, que apresentaram um aumento no número de bactérias já 30 dias pós-infecção. É interessante observar que a carga bacteriana no fígado 30 dias pós-infecção e no baço 100 dias pós-infecção em animais TLR6 KO foi menor do que a observada nos animais TLR2 KO. Em todos os períodos avaliados os camundongos TLR2/6 KO apresentaram contagens de CFU similares às dos animais TLR2 KO.

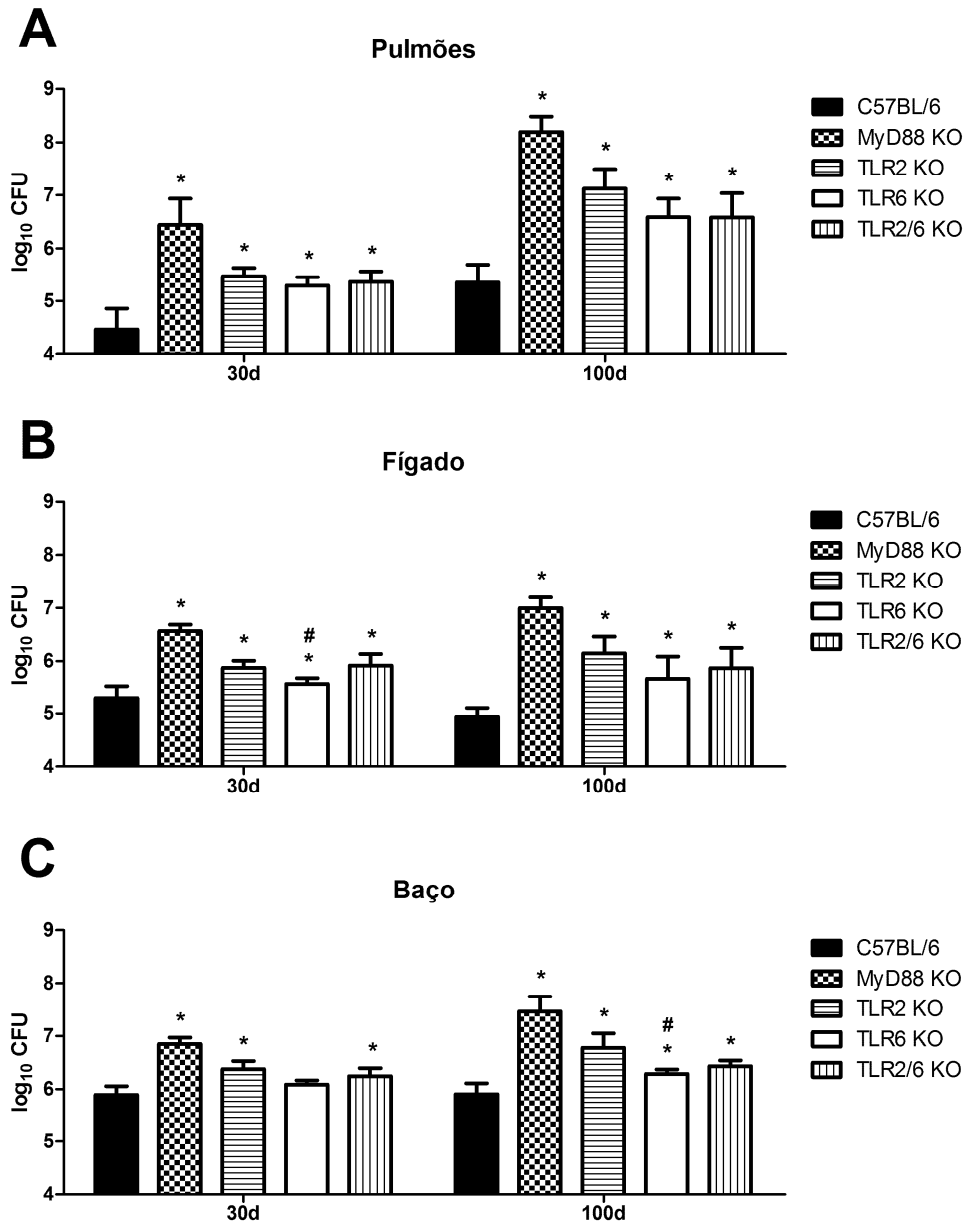


Figura 18: Papel do receptor TLR6 no crescimento bacteriano *in vivo*. O crescimento de *M. avium* nos pulmões, fígado ou baço, foi avaliado após 30 e 100 dias de infecção. Os animais C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram infectados intravenosamente com 1×10^6 CFUs de *M. avium* 2447. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; (#) indica valor estatisticamente significativo referente ao TLR2 KO; $p < 0.05$.

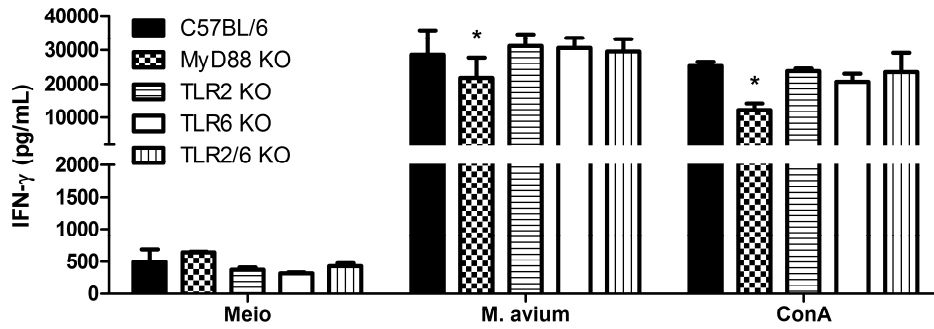
5.4.2 A ausência de TLR6 não altera a produção de citocinas pró-inflamatórias em esplenócitos de camundongos infectados pelo *M. avium*

As citocinas pró-inflamatórias são importantes para a manutenção de um ambiente propício ao controle do crescimento bacteriano. Após 30 e 100 dias de infecção, os esplenócitos de animais C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram cultivados e re-estimulados com *M. avium*. Então, a produção de IFN- γ e TNF- α foi dosada por ELISA.

As células MyD88 KO foram as únicas que apresentaram níveis reduzidos de IFN- γ e TNF- α comparados aos esplenócitos selvagens, em ambos os períodos avaliados. As ausências de TLR6 ou TLR2 não alteraram significativamente a produção dessas citocinas.

30d.p.i

A



B

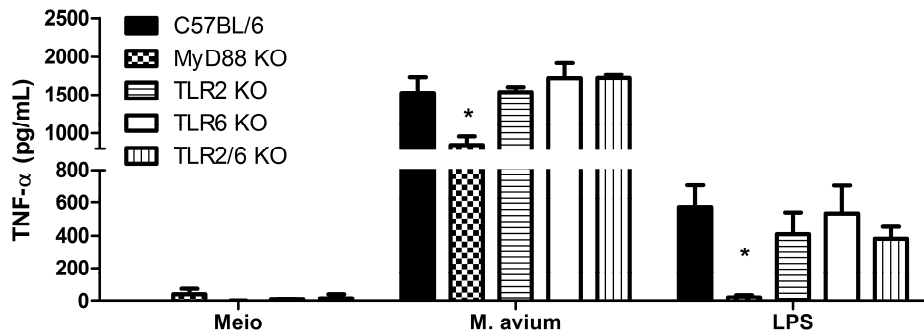


Figura 19: Produção de citocinas pró-inflamatórias 30 dias pós-infecção. Esplenócitos dos animais C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram estimulados com ConA, LPS ou re-estimulados com *M. avium*, e as citocinas IFN- γ e TNF- α foram dosadas no sobrenadante da cultura. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0,05$.

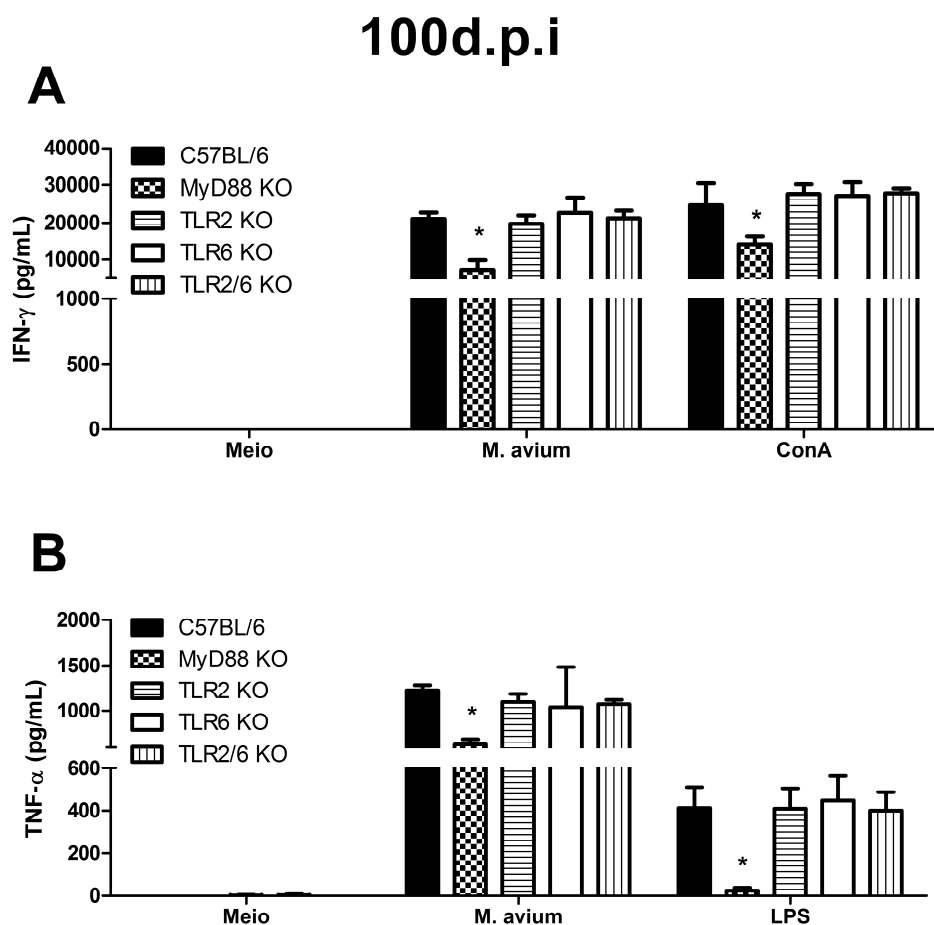


Figura 20: Produção de citocinas pró-inflamatórias 100 dias pós-infecção. Esplenócitos dos animais C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram estimulados com ConA, LPS ou re-estimulados com *M. avium*, e as citocinas IFN- γ e TNF- α foram dosadas no sobrenadante da cultura. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0,05$.

5.4.3 TLR6 não influencia a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ na infecção por *M. avium*.

A produção de IFN- γ é um dos mecanismos centrais para o controle da infecção causada pelo *M. avium*. Para avaliar a influência do TLR6 na produção dessa citocina por linfócitos T, foi analisado através da citometria de fluxo a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ de animais infectados durante 30 dias.

Corroborando os dados obtidos por ELISA, apenas a ausência de MyD88 reduziu significativamente a porcentagem de células T CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de IFN- γ . Novamente, TLR2 ou TLR6 não influenciam o desenvolvimento de células do tipo Th1.

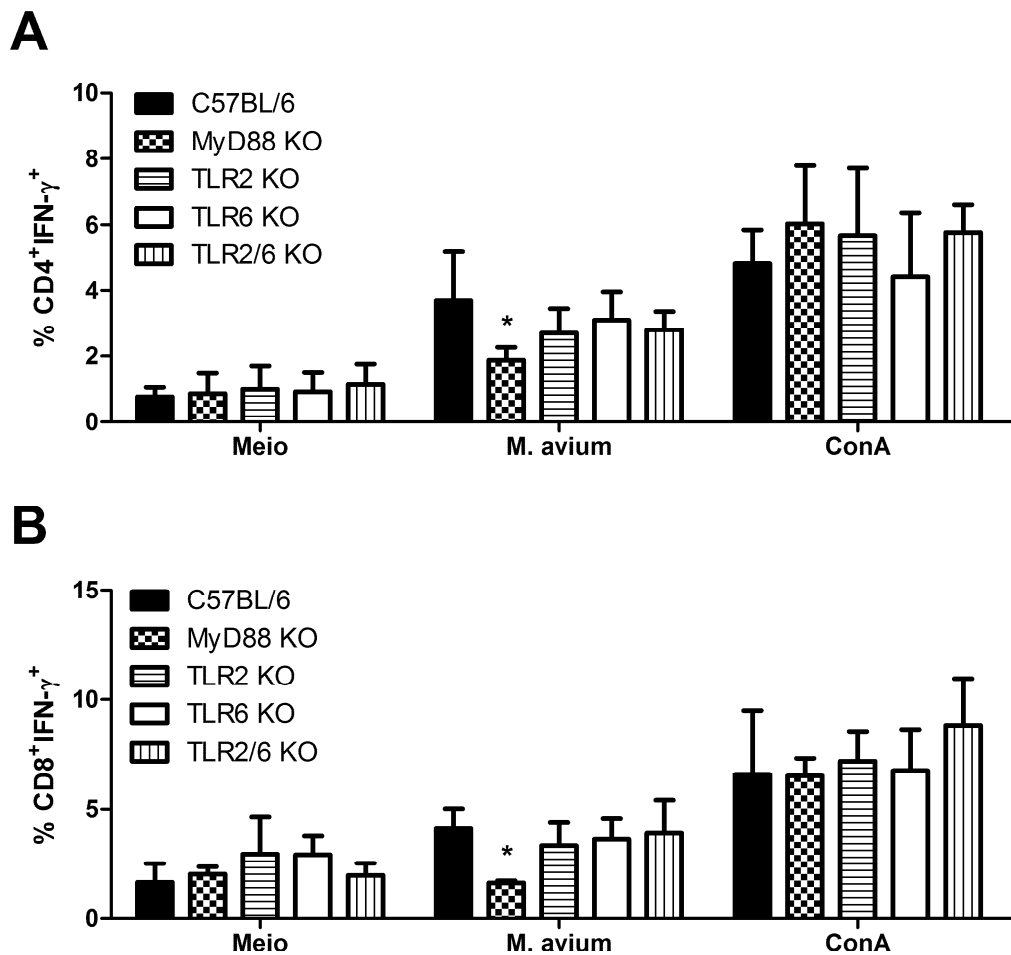


Figura 21: TLR6 não altera a porcentagem de células T CD4⁺ ou CD8⁺ produtoras de IFN- γ . Esplenócitos de camundongos C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO foram cultivados e estimulados com *M. avium* (MOI 5:1) ou ConA durante 40 h. As células foram marcadas com (A) FITC-anti mouse CD4 ou (B) Biotin-anti mouse CD8, e PE-anti mouse IFN- γ . Então os eventos foram adquiridos no citômetro FACScan e os resultados foram analisados no programa FlowJo. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; p<0,05.

5.4.4 A deficiência em TLR6 e TLR2 reduz a produção de IFN- γ nos pulmões de camundongos infectados pelo *M. avium*

Durante a infecção por micobactérias, os pulmões são órgãos chave devido sua importância na localização das bactérias no hospedeiro. A fim de determinar se TLR6 influencia a resposta imune específica nesse tecido, os níveis de IFN- γ e TNF- α foram medidos em homogenatos de tecido pulmonar. A avaliação da produção de IFN- γ nos pulmões dos animais infectados revelou níveis baixos dessa citocina em todos os animais *knockouts* estudados 30 dias pós-infecção, comparados aos animais selvagens. No entanto, no período de 100 dias pós-infecção os níveis de IFN- γ se apresentaram reduzidos em todos os animais, incluindo os animais selvagens. Este resultado indica uma forte dependência da sinalização de TLR2 e TLR6 para a produção de IFN- γ nos pulmões nos períodos iniciais de infecção. Além disso, embora haja o requerimento desses receptores para a produção de IFN- γ nos pulmões, não foi observado um efeito sinérgico já que o nível de IFN- γ nos camundongos TLR2/6 KO foram similares aos produzidos pelos animais TLR2 ou TLR6 KO. Com relação ao TNF- α , a ausência de TLR6 surpreendentemente levou a um aumento dos níveis dessa citocina 30 dias pós-infecção. Esse aumento não foi observado nos demais animais *knockouts*. No período de 100 dias pós-infecção os níveis de TNF- α estavam reduzidos em todos os animais infectados.

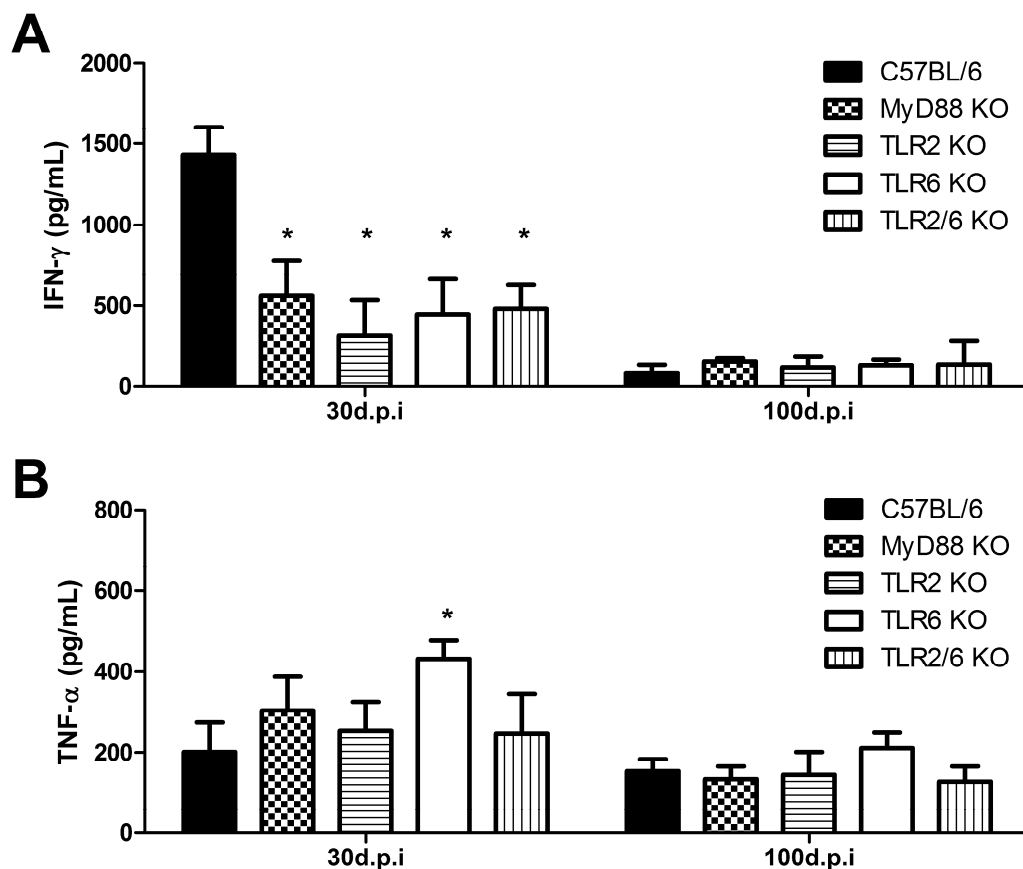


Figura 22: Produção de IFN- γ e TNF- α no tecido pulmonar de animais infectados pelo *M. avium*. Os pulmões de camundongos C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO infectados foram extraídos 30 e 100 dias pós-infecção e processados usando solução de extração de citocinas. Os níveis de (A) IFN- γ e (B) TNF- α foram avaliados por ensaio de ELISA. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0,05$.

5.4.5 Deficiência para TLR6 não afeta área de granulomas no fígado de animais infectados pelo *M. avium*

O fígado é outro importante órgão acometido durante a infecção por *M. avium*. Lesões hepáticas e formação de granulomas são frequentemente observadas em indivíduos infectados sistemicamente e animais infectados experimentalmente. Dessa forma, essa patologia é uma marca de infecções micobacterianas [81]. Para avaliar se a ausência de TLR6 levava a alterações histopatológicas, amostras do fígado de animais

infectados foram coletadas e processadas a fim de se avaliar o tamanho de granulomas (Figura 22). Não houve diferença significativa entre animais selvagens e TLR6 KO quanto à área dos granulomas. Foi observado que apenas os animais MyD88 KO apresentaram proeminente redução na área de granulomas tanto em 30 quanto em 100 dias pós-infecção. Dessa forma, a ausência de TLR6 ou TLR2 não alterou significativamente a formação de granulomas hepáticos.

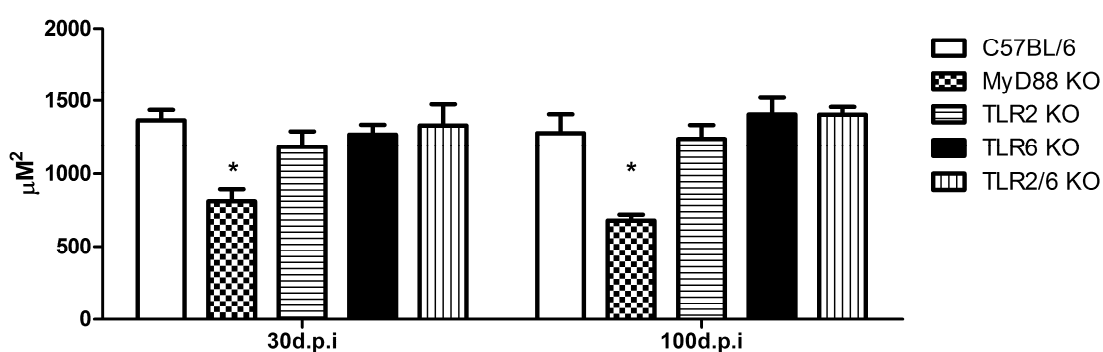


Figura 23: Área dos granulomas hepáticos. O lobo medial do fígado de animais C57BL/6, MyD88, TLR2, TLR6 e TLR2/6 KO infectados pelo *M. avium* foram coletados, fixados em formaldeído e embebidos em parafina. As secções foram coradas com Hematoxilina e Eosina e a área de granulomas de cada amostra foram medidas em μm^2 utilizando o programa KS300. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao C57BL/6; $p < 0,05$.

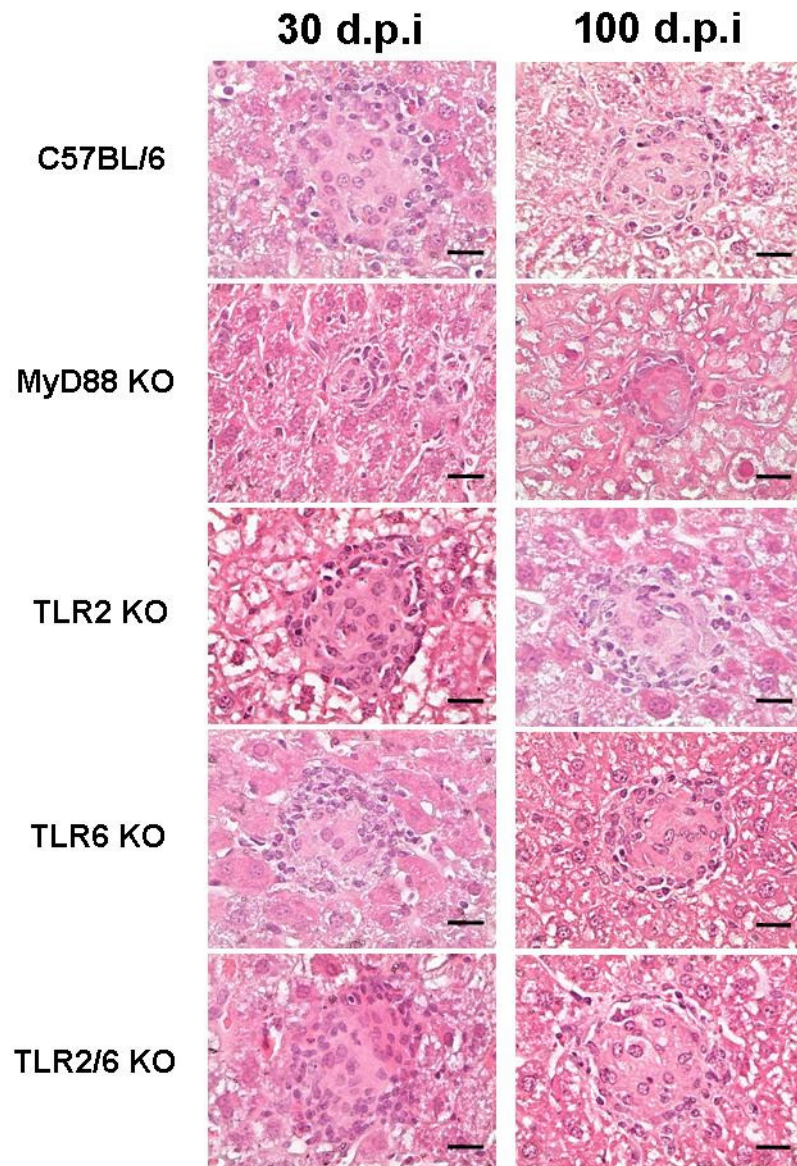


Figura 24: Granulomas hepáticos de animais infectados pelo *M. avium*. Imagens digitais representativas capturadas no aumento 40x. As barras de referência correspondem a 20 μ m; d.p.i = dias pós-infecção.

5.5 O receptor TLR6 é importante para a ativação da resposta imune contra o *M. avium* em células humanas

As células THP-1 correspondem a uma linhagem monocítica humana que assumem características de macrófagos quando diferenciadas na presença de ésteres de forbol, como PMA. Estas células são comumente utilizadas como modelos experimentais *in vitro* para a avaliação da resposta imune humana [87-88]. A fim de

verificar o desenvolvimento de um fenótipo semelhante a macrófagos das células THP-1, a expressão de CD14 foi avaliada após a incubação com PMA durante 24 horas. Foi observado um aumento significativo da expressão de CD14 nas células tratadas (Figura 25). Além disso, as THP-1 se mostraram aderidas ao fundo dos poços incubados com PMA (dado não mostrado).

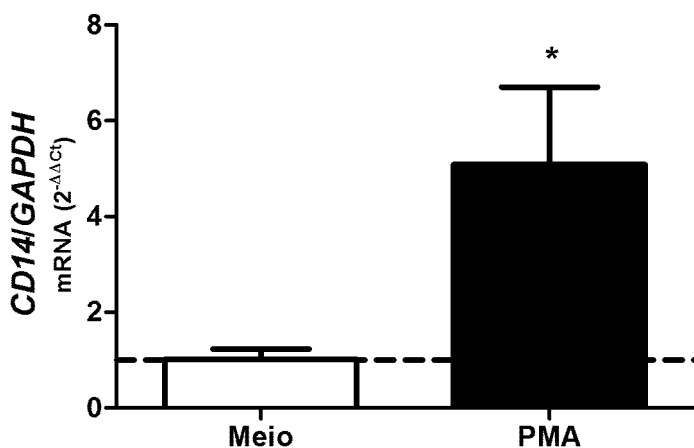


Figura 25: Expressão de CD14 em células THP-1 estimuladas com PMA. As células THP-1 foram semeadas em placas de 6 poços e estimuladas com PMA 100 nM. Após 24 horas o RNA foi extraído para avaliação dos níveis de expressão de CD14.

A fim de avaliar se os resultados obtidos nas células de animais deficientes para TLR6 podem ser extrapolados para um modelo humano, as células THP-1 foram diferenciadas e os receptores TLR6 e TLR2 foram bloqueados. Após isso, a produção de TNF- α e a sinalização intracelular desencadeada em resposta à infecção por *M. avium* foram avaliadas. O bloqueio de TLR6 levou a um decréscimo significativo na produção de TNF- α (Figura 26A). Assim como observado nas células murinas, a ausência do reconhecimento via TLR2 levou a uma maior redução na produção dessa citocina, indicando que o receptor TLR2 é o mais importante neste reconhecimento. É importante ressaltar que as células tratadas para o bloqueio de ambos receptores (TLR2/TLR6) apresentaram efeito sinérgico na diminuição da produção de TNF- α .

Além disso, o bloqueio de TLR6 levou a uma redução na ativação de JNK, ERK1/2 e p38 (Figura 26B), confirmando o papel deste receptor na ativação celular.

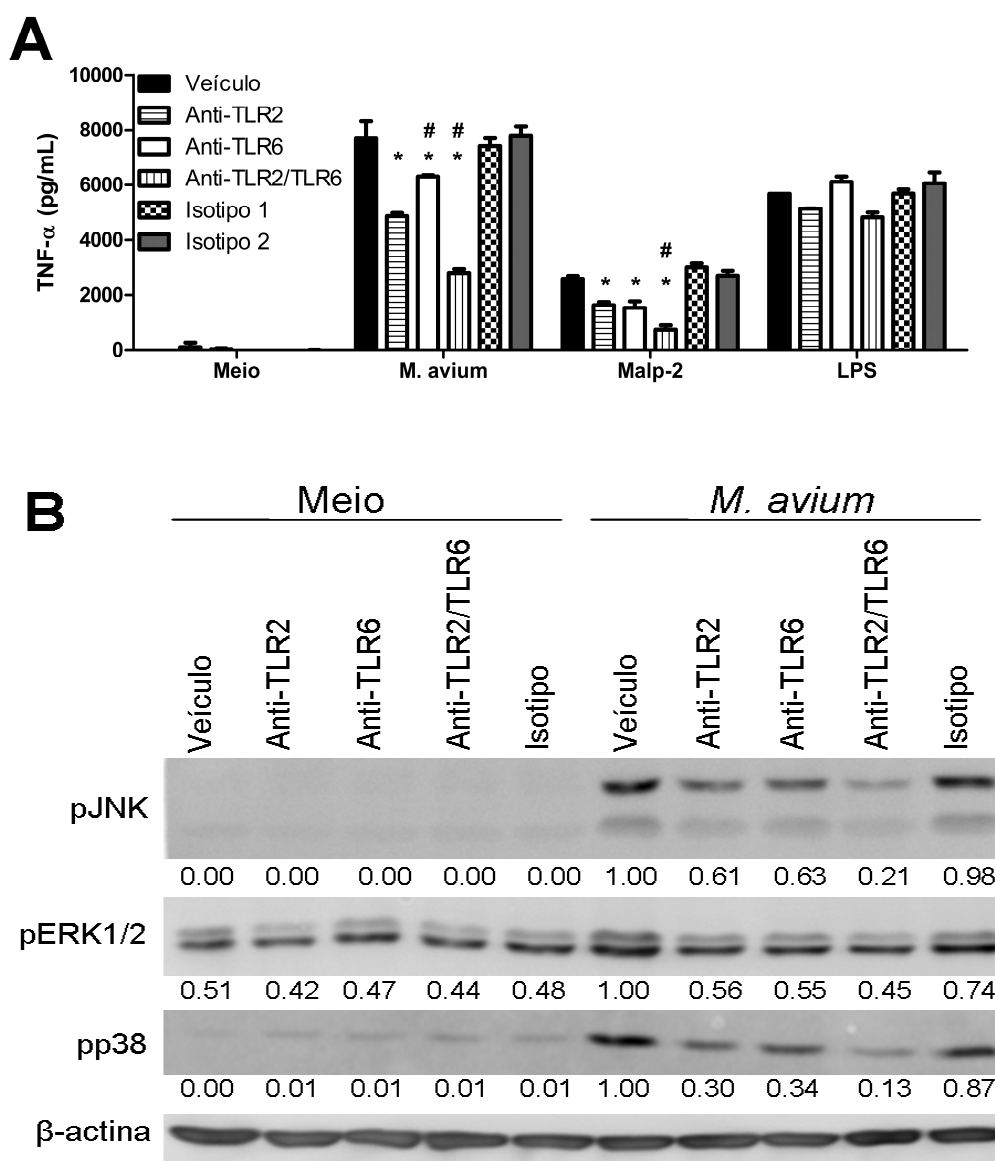


Figura 26: Efeito do bloqueio de TLR6 em células THP-1 estimuladas com *M. avium*. O receptor TLR6 é importante para produção de TNF- α e ativação de MAPK após infecção por *M. avium*. (A) Células THP-1 diferenciadas na presença de PMA foram incubadas com 1 μ g/mL de anti-human TLR2, TLR6, controle de isotipo IgG1 (Isotipo 1) ou IgA2 (Isotipo 2) por 1 h a 37°C. Para o tratamento denominado anti-TLR2/TLR6, 1 μ g/mL de cada anticorpo foi adicionado aos poços. Após isso, as células foram estimuladas com *M. avium* (MOI 5:1), Malp-2, LPS ou meio durante 24 hrs. (*) indica valor estatisticamente significativo referente ao Veículo ($P < 0.05$); (#) indica valor estatisticamente significativo referente ao tratamento anti-TLR2 ($P < 0.05$). (B) Após incubação com os anticorpos, as células foram estimuladas com *M. avium* ou meio por 30 min. Os níveis de fosforilação de JNK, ERK1/2 e p38 foram avaliados. As quantidades de β -actina foram usadas como controle. Os valores sob as bandas indicam a quantificação relativa ao Veículo, em unidades arbitrárias.

6. Discussão

6 DISCUSSÃO

As doenças micobacterianas constituem importantes problemas de saúde pública, como, por exemplo, a tuberculose que é uma doença infecciosa proeminente em todo o mundo. Em 2010 houve aproximadamente 8.8 milhões de casos de tuberculose em todo o mundo, relacionados a cerca de 1.1 milhões de mortes entre pacientes HIV-negativos e 390 mil mortes em pacientes infectados pelo HIV [82]. Um esforço global tem sido aplicado em estratégias que visam controlar e erradicar essa doença, apoiada por organizações como NIH, Bill & Melinda Gates Foundation, WHO e UNICEF [82]. No entanto, a ocorrência de infecções com micobactérias não-tuberculosas, especialmente aquelas envolvendo *Mycobacterium avium*, têm aumentado principalmente entre indivíduos imunocomprometidos, como os pacientes acometidos pela AIDS. O entendimento dos fatores determinantes na infecção por *M. avium* é de extrema relevância e contribui de forma significativa para uma melhor intervenção na patogênese induzida por essa bactéria.

Um evento crucial na imunidade contra *M. avium* é a participação de TLRs no reconhecimento e estabelecimento de respostas imunes protetoras. Estudos prévios demonstraram a importância de TLR2 e MyD88 na resposta efetiva a esse patógeno [76, 89]. No entanto, a importância do TLR6 durante a infecção por *M. avium* tem sido subestimada. Esta é uma lacuna importante uma vez que o TLR6 coopera funcionalmente com o TLR2, o que é responsável pelo aumento do repertório de ligantes relacionados a esse receptor [7]. Além disso, a maior susceptibilidade de animais deficientes para MyD88 é um indício de que há o requerimento de múltiplos TLRs para uma resistência completa e eficiente contra este patógeno [76]. Nosso grupo já determinou anteriormente que o TLR9 é importante para a resistência do hospedeiro nessa patologia [78]. Neste estudo, apresentamos indícios de que TLR6 é importante no

reconhecimento de *M. avium*, cooperando com o TLR2 nesse papel. A avaliação da ativação de NF-κB em células HEK 293 através do ensaio de luciferase sugere que TLR2 e TLR6 atuam sinergicamente nessa sinalização, apresentando níveis de ativação significativamente mais elevados do que os observados pela estimulação do dímero TLR2/TLR1 ou TLR2 sozinho. Esse ensaio ainda confirmou que TLR1 e TLR6 sozinhos não são suficientes para a ativação de NF-κB estimulada por *M. avium*.

A resposta imune eficiente contra *M. avium* depende inicialmente da imunidade inata seguida de uma fase em que as células T têm papel crucial. Os macrófagos apresentam papel importante tanto como células hospedeiras quanto efetoras do controle do crescimento bacteriano, enquanto as células dendríticas são potentes estimuladoras de respostas de células T [10, 62]. Estas células cooperam no estabelecimento de respostas efetivas pela ativação de mecanismos antimicrobianos e através da produção de citocinas que são necessárias ao início e manutenção de um ambiente do tipo Th1 [52]. Um importante passo para a ativação tanto de macrófagos quanto de células dendríticas é o reconhecimento e sinalização através de TLRs. A infecção por *M. avium* induziu o aumento de expressão gênica de *TLR1*, *TLR2* e *TLR6* em macrófagos e células dendríticas. Além disso, os níveis de transcritos de TLR2 e TLR6 foram significativamente maiores do que os de TLR1, um fato que foi mais pronunciado em macrófagos comparados às células dendríticas. Esta observação é corroborada por estudos que mostram que TLR6 é um potencial biomarcador para identificação de infecções micobacterianas ativas [34-35]. Adicionalmente, os níveis de mRNA de TLR6 estavam aumentados nos leucócitos mononucleares de pacientes com tuberculose pulmonar ativa e no cólon de camundongos após exposição oral de *M. avium* subspécies *paratuberculosis*, o agente causador da doença de Crohn [90-91].

Os resultados iniciais com o TLR6 nos levaram a hipotetizar que o animal duplo *knockout* TLR2/6 consistiria num importante controle experimental para esse estudo. Esse animal poderia nos revelar o papel da interação heterodimérica na infecção por *M. avium* ou mesmo confirmar um efeito sinérgico entre os receptores após a infecção devido à cooperação entre os TLRs. Com o cruzamento dos animais *knockouts* para TLR2 e TLR6 obtivemos o animal duplo *knockout* TLR2/6, cuja dupla deficiência foi confirmada por PCR. Dessa forma utilizamos esses animais nos experimentos subsequentes.

As citocinas representam importantes sinais pelas quais o sistema imune é ativado e organiza uma resposta contra os patógenos. Após a infecção pelo *M. avium*, os macrófagos e células dendríticas produzem TNF- α , IL-12 e IL-6, citocinas características de um perfil pró-inflamatório [52, 92]. Com relação aos BMMs, a deficiência em TLR6 não altera a produção dessas citocinas. No entanto, a produção de TNF- α e IL-12 por BMDCs foi parcialmente reduzida nas células TLR6 KO, enquanto IL-6 foi severamente diminuída nessas células. Além disso, a produção de citocinas se mostrou completamente dependente de MyD88 e TLR2 em ambas as células, BMMs e BMDCs. As células TLR2/6 KO apresentaram níveis semelhantes àqueles apresentados pelas células TLR2 KO. Esses resultados sugerem que a sinalização dependente de TLR6 é importante para estimular a produção de citocinas em BMDCs. As células dendríticas são especializadas na apresentação de antígenos e ativação da resposta imune adaptativa, e a produção de citocinas tem grande importância nessa função celular. Os macrófagos por outro lado apresentam habilidades antimicrobianas mais relevantes [10]. A análise do crescimento intracelular em BMMs mostrou que a ausência de TLR6 aumenta a susceptibilidade dessas células ao *M. avium in vitro*. Ademais, TLR2 e MyD88 também foram importantes para o controle do crescimento

bacteriano intracelular, como reportado anteriormente [78, 93]. As células TLR2/6 KO não apresentaram efeito sinérgico na susceptibilidade à infecção por *M. avium in vitro*, apesar de apresentarem aumento da contagem de CFUs em relação às células selvagens. Os resultados observados nas células MyD88 e TLR2 KO estão de acordo com os demonstrados em outros estudos [76, 78, 93].

Após o reconhecimento dos agonistas pelo respectivo TLR, uma cascata de sinalização intracelular é disparada, o que determina as respostas celulares ao estímulo. Nesse processo, as MAPKs têm papel chave na ativação dos fatores de transcrição que determinarão os efeitos celulares pertinentes à resposta imune [86]. Na padronização do experimento foi observado que o pico de ativação das MAPKs em macrófagos já ocorre após 10 minutos de estímulo com *M. avium*, enquanto em células dendríticas esse pico é atingido após 30 minutos. Isso indica que a ativação em BMDCs é mais tardia quando comparada aos BMMs. A análise da via de sinalização intracelular revelou que TLR6, TLR2 e MyD88 são importantes para a fosforilação de JNK, ERK1/2 e p38 em ambos tipos celulares. No entanto, enquanto BMDCs apresentaram uma forte dependência de TLR2 e TLR6 para a ativação de NF- κ B, este evento estava apenas parcialmente comprometido em BMMs devido à ausência desses receptores. Isto sugere que em macrófagos a relevância de vias independentes do reconhecimento por TLRs para ativação de NF- κ B é maior do que em células dendríticas. Uma via alternativa envolve o receptor Mincle (*Macrophage Inducible C-type Lectin*), que está envolvido no reconhecimento de glicolipídios na membrana de mycobacteria. Este receptor tem papel central no reconhecimento de micobacteria independente de TLR e sua ativação leva à produção de citocinas inflamatórias e óxido nítrico [94].

A produção de citocinas é um dos resultados da ativação celular via TLRs e pode envolver a via das MAPKs [86]. O ensaio de inibição dessas vias de sinalização

mostrou que em macrófagos tanto a produção de TNF- α quanto IL-12 é influenciada pela via das MAPKs, mas de maneira diferente. A inibição de ERK1/2 alterou os níveis de TNF- α , enquanto JNK e p38 influenciaram a produção de IL-12. Com relação às BMDCs, novamente ERK1/2 influenciou a produção de TNF- α . No entanto, a inibição de p38 se mostrou mais efetiva na redução dos níveis de ambas citocinas. Nestas células, JNK não influenciou a produção das citocinas avaliadas. Esses resultados sugerem que a produção de citocinas envolve diferentes requerimentos comparando-se macrófagos e células dendríticas. Entretanto, a inibição de NF- κ B reduziu os níveis de TNF- α e IL-12 em ambos os tipos celulares. Porém, os resultados apresentam indícios de que a produção de citocinas envolvendo este fator de transcrição é mais relevante em BMDCs. Estes dados estão de acordo com o painel encontrado pela análise do Western Blot, quando se observa a relevância de TLRs na ativação das vias de sinalização intracelulares. Tanto em macrófagos quanto em células dendríticas estes receptores têm papel importante na fosforilação de MAPKs, o que leva à produção de citocinas. Com relação ao fator de transcrição NF- κ B, os TLRs influenciam parcialmente sua ativação em BMMs ao passo que em BMDCs esses receptores são cruciais para este fato. Adicionalmente, as células dendríticas apresentam maior dependência de NF- κ B para a produção de citocinas do que os macrófagos. Estes dados são corroborados por outros trabalhos. Estudos com outras cepas de *M. avium* mostraram que bactérias mais virulentas tendem a limitar a ativação de MAPKs, levando a uma menor produção de mediadores inflamatórios em macrófagos [85]. Além disso, NF- κ B tem papel chave na regulação das funções de maturação e ativação de células dendríticas, enquanto em macrófagos essa função crítica é compartilhada com outros fatores de transcrição, como AP-1 [95]. Em conjunto, os resultados *in vitro* apresentam evidências de que TLR6 é importante para reconhecimento de *M. avium*. Além disso, TLR6 é relevante para a

ativação de BMMs e BMDCs, mas apresenta papéis diferentes dependendo do tipo celular. Em macrófagos, o receptor se mostrou importante para a ativação de mecanismos antibacterianos, possivelmente através da indução da maturação dos fagossomos contendo o patógeno [93]. Entretanto, em células dendríticas o TLR6 está envolvido na produção de citocinas, um evento importante para seu papel como ligação entre as respostas imunes inata e adaptativa.

O papel do TLR6 na infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* e *M. bovis* já foi abordado em estudos anteriores. Estes trabalhos propuseram que o TLR6 não participa do controle dessas infecções uma vez que camundongos TLR6 KO apresentam fenótipo similar aos animais selvagens [31-32]. No entanto, outros investigadores demonstraram que polimorfismos no gene *tlr6* em humanos estavam associados às deficiências na produção de IL-6 e na sinalização por NF- κ B, aumentando o risco de se desenvolver tuberculose [36-37]. No modelo de infecção experimental pelo *M. avium* foi observado que camundongos TLR6 KO não são capazes de controlar o crescimento bacteriano com a mesma eficiência que animais selvagens. Da mesma maneira, os valores de CFU nos animais MyD88, TLR2 e TLR2/6 KO se mostraram significativamente maiores do que os observados nos animais C57BL/6. Surpreendentemente, os camundongos TLR6 KO apresentaram um nível intermediário de carga bacteriana no fígado (30 dias pós-infecção) e baço (100 dias pós-infecção), com valores estatisticamente diferentes de animais C57BL/6 e TLR2 KO. Possivelmente a susceptibilidade devido à ausência de TLR6 leva mais tempo para se estabelecer do que a apresentada pelos animais TLR2 KO.

O *M. avium*, quando inoculado intravenosamente em camundongos, inicia uma infecção disseminada que mimetiza as manifestações patológicas que são observadas durante infecção humana avançada [52]. O aumento da carga bacteriana observadas nos

pulmões, fígado e baço de camundongos TLR6 KO levaram a uma investigação do envolvimento do TLR6 em outros parâmetros inflamatórios. A produção de citocinas é um importante evento que leva à ativação de células imunes e está envolvida no controle da infecção [96]. Além disso, estudos prévios demonstraram que a resistência à infecção por *M. avium* requer um perfil de citocinas do tipo Th1, principalmente IFN- γ [52, 97]. No entanto, a re-estimulação de esplenócitos de animais infectados mostrou que a produção de TNF- α e IFN- γ não foi influenciada pelo TLR6. Corroborando esses dados, os resultados obtidos através da citometria de fluxo mostraram que a produção de IFN- γ pelos linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺ não era influenciada pelo TLR6. Outros estudos também mostraram que o TLR2 não influencia a produção desta citocina após 30 dias ou mais de infecção pelo *M. avium* cepa 2447 [77-78], assim como o TLR6. Surpreendentemente, os níveis de IFN- γ medidos diretamente no homogenato de tecido pulmonar de camundongos TLR6 KO foram menores do que os apresentados pelos camundongos selvagens 30 dias pós-infecção. Após 100 dias de infecção a produção de IFN- γ nos pulmões se mostrou reduzida em todos os animais, inclusive nos C57BL/6. Esse resultado pode ser relacionado com o grande incremento na carga bacteriana observado nesse órgão em todos os animais 100 dias pós-infecção: os baixos níveis de IFN- γ levariam a um reduzido controle do crescimento bacteriano. Com relação à TNF- α , é interessante observar que os níveis encontrados nos pulmões após 30 dias de infecção nos animais TLR6 KO estavam aumentados em relação aos animais selvagens. No entanto, esse perfil não foi encontrado nos demais animais *knockouts*. Abrahams e colaboradores [29] demonstraram que trofoblastos estimulados por peptidoglicano de bactérias Gram-positivas desenvolvem apoptose mediada por TLR2/1, um evento que é bloqueado pela presença de TLR6. Além disso, o TLR6 desencadeava um perfil pró-inflamatório, com produção de IL-8 e IL-6. Da mesma maneira, a ausência de TLR6 nos

pulmões dos animais infectados por *M. avium* pode estar relacionado a um perfil pró-apoptótico, relacionado à produção aumentada de TNF- α . Neste momento, este tipo de resposta seria danoso ao hospedeiro, como demonstrado por Early e colaboradores [65], correlacionando com o aumento da carga bacteriana nos pulmões dos animais TLR6 KO. Após 100 dias de infecção os níveis de TNF- α estavam reduzidos em todos os animais analisados, assim como os níveis de IFN- γ . O outro órgão avaliado, o fígado, é o alvo predominante pela infecção sistêmica por *M. avium* [98]. Nesse tecido, o mecanismo principal para eliminação da bactéria é a formação de granulomas, componente imunológico proveniente de uma defesa antimicrobiana bem coordenada, onde linfócitos cooperam com macrófagos para isolar e restringir crescimento bacteriano [81]. As citocinas do tipo Th1 são cruciais na formação e manutenção dessas estruturas [96]. Nesse estudo, a ausência de TLR6 não alterou a formação de granulomas tanto em 30 quanto em 100 dias pós-infecção, apresentando áreas similares àquelas observadas nos camundongos C57BL/6. Este resultado está de acordo com o observado durante infecção por *M. tuberculosis* e *M. bovis*, onde a deficiência em TLR6 ou TLR2 não influencia a formação de granulomas [31-32]. É importante observar que todos esses parâmetros inflamatórios avaliados revelaram o quanto a molécula MyD88 é crucial no desencadeamento da resposta imune contra o *M. avium*.

A utilização de modelos murinos para o estudo de infecções e a resposta imune desencadeada contra os patógenos representa uma ferramenta científica importante no entendimento dos mecanismos envolvidos na imunidade. A fim de avaliar se os resultados obtidos com camundongos podem ser extrapolados para células humanas, a linhagem celular THP-1 foi utilizada. Estas células são comumente utilizadas como modelos experimentais *in vitro* para a avaliação da resposta imune humana [87-88]. O bloqueio de TLR2 ou TLR6 reduziu a produção de TNF- α e ativação de MAPKs nas

células THP-1, demonstrando que estes receptores estão envolvidos no reconhecimento de *M. avium*. Dessa forma, os resultados obtidos a partir dessas células humanas corroboram os dados observados nas células murinas deficientes para os receptores TLR2 ou TLR6.

Lipídios micobacterianos são PAMPs importantes que podem ser associados a uma proteína ou motivo peptídico para facilitar a ancoragem da proteína hidrofílica aos fosfolípidos da parede celular. Tanto lipídios quanto lipoproteínas podem estar envolvidos em funções associadas à virulência bacteriana como invasão celular, evasão da resposta imune do hospedeiro e imunomodulação [99-100]. O TLR2 é o principal receptor estimulado por essa classe de PAMP, e as modificações das lipoproteínas em formas diaciladas ou triaciladas levam ao reconhecimento por TLR2/6 ou TLR2/1, respectivamente [99]. Dentre as micobactérias, os lipídios da parede celular de *M. tuberculosis* são os melhor estudados. Trehalose 6,6'-dimicolato (TDM) é o lipídio mais abundante desse patógeno e é reconhecido por macrófagos através do receptor *scavenger* de classe A MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*), além do TLR2. O TDM dispara uma via de sinalização dependente de MyD88, culminando na ativação de NF- κ B e na produção de citocinas pró-inflamatórias [100]. Lipoproteínas do *M. tuberculosis*, como a LprG, também são agonistas importantes do TLR2. No entanto, essas proteínas apresentam principalmente a forma triacilada, o que implica na dependência do receptor TLR1 associado ao TLR2 para ser reconhecida [101-103]. Esse fato corrobora com o aparente papel secundário de TLR6 durante a infecção por *M. tuberculosis* [31]. Outra classe de ligantes de TLR2, os glicopeptidolipídios (GPLs) são moléculas de superfície celular altamente expressas por *M. avium* e outras micobactérias não-tuberculosas [104]. Sweet e colaboradores [89] mostraram que a estimulação de BMMs por GPLs leva à ativação de MAPKs e NF- κ B,

culminando na produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta ativação era dependente de TLR2 e MyD88. No entanto, não foi abordado se TLR1 e/ou TLR6 são decisivos para o reconhecimento de GPLs. Por outro lado, Gomes e colaboradores [93] mostraram que a estimulação de BMMs com FSL-1 (*Fibroblast-Stimulating Lipopeptide-1*), um lipopeptídeo diacilado, promove a maturação do fagossomo, levando ao controle do crescimento intracelular bacteriano do *M. avium*. Os resultados apresentados nessa tese demonstram a importância de TLR6 na resposta imune contra esse patógeno. Os dados sugerem que a sinalização via TLR2/6, que possivelmente são disparadas por GPLs e/ou outros agonistas lipídicos de *M. avium*, envolve a molécula adaptadora MyD88 e leva à ativação de MAPKs e NF- κ B dependendo do tipo celular, culminando na indução de mecanismos antimicrobianos em BMMs ou na produção de citocinas pró-inflamatórias em BMDCs. A estimulação via TLR6 é importante para a resposta eficiente do hospedeiro, uma vez que a deficiência nesse receptor aumenta a susceptibilidade dos animais à infecção *in vivo*. Além disso, estes dados são possivelmente extensíveis ao modelo humano.

7. Conclusão

7 CONCLUSÃO

Os dados apresentados neste estudo demonstram o envolvimento do TLR6 no estabelecimento da resposta imune contra a infecção pelo *M. avium*. O reconhecimento do patógeno e a sinalização celular são comprometidos na ausência do TLR6. Além disso, o receptor está envolvido na ativação das funções efetoras de macrófagos e células dendríticas, atuando no controle bacteriano e na produção de citocinas. Em resumo, esses resultados indicam que o TLR6 é um receptor que atua no reconhecimento e controle eficiente da infecção pelo *M. avium*.

8. Bibliografia

8 BIBLIOGRAFIA

- 1 **Abul K. Abbas, A. H. L., Jordan S. Pober, *Imunologia Celular e Molecular*, 6 Edn. Elsevier Editora Ltda: 2008.**
- 2 **Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.,** Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006. **124**: 783-801.
- 3 **Beutler, B. A.,** TLRs and innate immunity. *Blood* 2009. **113**: 1399-1407.
- 4 **Janeway, C. A., Jr. and Medzhitov, R.,** Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002. **20**: 197-216.
- 5 **Medzhitov, R.,** Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007. **449**: 819-826.
- 6 **Kumar, H., Kawai, T. and Akira, S.,** Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009. **388**: 621-625.
- 7 **Omueti, K. O., Beyer, J. M., Johnson, C. M., Lyle, E. A. and Tapping, R. I.,** Domain exchange between human toll-like receptors 1 and 6 reveals a region required for lipopeptide discrimination. *J Biol Chem* 2005. **280**: 36616-36625.
- 8 **Appelberg, R.,** Neutrophils and intracellular pathogens: beyond phagocytosis and killing. *Trends Microbiol* 2007. **15**: 87-92.
- 9 **Kaisho, T.,** Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine* 2012.
- 10 **Rosenberger, C. M. and Finlay, B. B.,** Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signalling by bacterial pathogens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003. **4**: 385-396.
- 11 **Gumbleton, M. and Kerr, W. G.,** Role of inositol phospholipid signaling in natural killer cell biology. *Front Immunol* 2013. **4**: 47.
- 12 **Kwon, H. J. and Kim, H. S.,** Signaling for synergistic activation of natural killer cells. *Immune Netw* 2012. **12**: 240-246.
- 13 **Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M. and Ley, K.,** Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010. **327**: 656-661.
- 14 **Sica, A. and Mantovani, A.,** Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012. **122**: 787-795.
- 15 **Liu, G. and Yang, H.,** Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *J Cell Physiol* 2013. **228**: 502-512.
- 16 **Foti, M., Granucci, F., Pelizzola, M., Beretta, O. and Ricciardi-Castagnoli, P.,** Dendritic cells in pathogen recognition and induction of immune responses: a functional genomics approach. *J Leukoc Biol* 2006. **79**: 913-916.
- 17 **Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K.,** Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000. **18**: 767-811.
- 18 **Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. and Amigorena, S.,** Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002. **20**: 621-667.
- 19 **Ferenbach, D. and Hughes, J.,** Macrophages and dendritic cells: what is the difference? *Kidney Int* 2008. **74**: 5-7.

- 20 **Hashimoto, C., Hudson, K. L. and Anderson, K. V.**, The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 1988. **52**: 269-279.
- 21 **Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A.**, The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell* 1996. **86**: 973-983.
- 22 **Kawai, T. and Akira, S.**, Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* 2005. **7**: 12-19.
- 23 **Jin, M. S. and Lee, J. O.**, Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 2008. **29**: 182-191.
- 24 **Kruithof, E. K., Satta, N., Liu, J. W., Dunoyer-Geindre, S. and Fish, R. J.**, Gene conversion limits divergence of mammalian TLR1 and TLR6. *BMC Evol Biol* 2007. **7**: 148.
- 25 **Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Roschmann, K., Jung, G., Wiesmuller, K. H. and Ulmer, A. J.**, Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol* 2008. **83**: 692-701.
- 26 **Kang, J. Y., Nan, X., Jin, M. S., Youn, S. J., Ryu, Y. H., Mah, S., Han, S. H., Lee, H., Paik, S. G. and Lee, J. O.**, Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009. **31**: 873-884.
- 27 **Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T. and Moore, K. J.**, CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol* 2010. **11**: 155-161.
- 28 **Netea, M. G., van de Veerdonk, F., Verschueren, I., van der Meer, J. W. and Kullberg, B. J.**, Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008. **52**: 118-123.
- 29 **Abrahams, V. M., Aldo, P. B., Murphy, S. P., Visintin, I., Koga, K., Wilson, G., Romero, R., Sharma, S. and Mor, G.**, TLR6 modulates first trimester trophoblast responses to peptidoglycan. *J Immunol* 2008. **180**: 6035-6043.
- 30 **Delaloye, J., Roger, T., Steiner-Tardivel, Q. G., Le Roy, D., Knaup Reymond, M., Akira, S., Petrilli, V., Gomez, C. E., Perdiguero, B., Tschopp, J., Pantaleo, G., Esteban, M. and Calandra, T.**, Innate immune sensing of modified vaccinia virus Ankara (MVA) is mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 inflammasome. *PLoS Pathog* 2009. **5**: e1000480.
- 31 **Sugawara, I., Yamada, H., Li, C., Mizuno, S., Takeuchi, O. and Akira, S.**, Mycobacterial infection in TLR2 and TLR6 knockout mice. *Microbiol Immunol* 2003. **47**: 327-336.
- 32 **Nicolle, D., Fremont, C., Pichon, X., Bouchot, A., Maillet, I., Ryffel, B. and Quesniaux, V. J.**, Long-term control of Mycobacterium bovis BCG infection in the absence of Toll-like receptors (TLRs): investigation of TLR2-, TLR6-, or TLR2-TLR4-deficient mice. *Infect Immun* 2004. **72**: 6994-7004.
- 33 **Mattos, K. A., Oliveira, V. G., D'Avila, H., Rodrigues, L. S., Pinheiro, R. O., Sarno, E. N., Pessolani, M. C. and Bozza, P. T.**, TLR6-driven lipid droplets in Mycobacterium leprae-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *J Immunol* 2011. **187**: 2548-2558.

- 34 **Lu, C., Wu, J., Wang, H., Wang, S., Diao, N., Wang, F., Gao, Y., Chen, J., Shao, L., Weng, X., Zhang, Y. and Zhang, W.,** Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One* 2011. **6**: e24290.
- 35 **Plain, K. M., Purdie, A. C., Begg, D. J., de Silva, K. and Whittington, R. J.,** Toll-like receptor (TLR)6 and TLR1 differentiation in gene expression studies of Johne's disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2010. **137**: 142-148.
- 36 **Ma, X., Liu, Y., Gowen, B. B., Graviss, E. A., Clark, A. G. and Musser, J. M.,** Full-exon resequencing reveals toll-like receptor variants contribute to human susceptibility to tuberculosis disease. *PLoS One* 2007. **2**: e1318.
- 37 **Shey, M. S., Randhawa, A. K., Bowmaker, M., Smith, E., Scriba, T. J., de Kock, M., Mahomed, H., Hussey, G., Hawn, T. R. and Hanekom, W. A.,** Single nucleotide polymorphisms in toll-like receptor 6 are associated with altered lipopeptide- and mycobacteria-induced interleukin-6 secretion. *Genes Immun* 2010. **11**: 561-572.
- 38 **Meylan, E., Tschopp, J. and Karin, M.,** Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006. **442**: 39-44.
- 39 **Moreira, L. O. and Zamboni, D. S.,** NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front Immunol* 2012. **3**: 328.
- 40 **Correa, R. G., Milutinovic, S. and Reed, J. C.,** Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. *Biosci Rep* 2012. **32**: 597-608.
- 41 **Travassos, L. H., Carneiro, L. A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y. G., Magalhaes, J. G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., Boneca, I. G., Allaoui, A., Jones, N. L., Nunez, G., Girardin, S. E. and Philpott, D. J.,** Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol* 2010. **11**: 55-62.
- 42 **Rubino, S. J., Selvanantham, T., Girardin, S. E. and Philpott, D. J.,** Nod-like receptors in the control of intestinal inflammation. *Curr Opin Immunol* 2012. **24**: 398-404.
- 43 **Loo, Y. M. and Gale, M., Jr.,** Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011. **34**: 680-692.
- 44 **Leung, D. W. and Amarasinghe, G. K.,** Structural insights into RNA recognition and activation of RIG-I-like receptors. *Curr Opin Struct Biol* 2012. **22**: 297-303.
- 45 **Jehl, S. P., Nogueira, C. V., Zhang, X. and Starnbach, M. N.,** IFNgamma inhibits the cytosolic replication of *Shigella flexneri* via the cytoplasmic RNA sensor RIG-I. *PLoS Pathog* 2012. **8**: e1002809.
- 46 **Pollpeter, D., Komuro, A., Barber, G. N. and Horvath, C. M.,** Impaired cellular responses to cytosolic DNA or infection with *Listeria monocytogenes* and vaccinia virus in the absence of the murine LGP2 protein. *PLoS One* 2011. **6**: e18842.
- 47 **Chiliveru, S., Birkelund, S. and Paludan, S. R.,** Induction of interferon-stimulated genes by *Chlamydia pneumoniae* in fibroblasts is mediated by intracellular nucleotide-sensing receptors. *PLoS One* 2010. **5**: e10005.
- 48 **Barry, D. P. and Beaman, B. L.,** Modulation of eukaryotic cell apoptosis by members of the bacterial order Actinomycetales. *Apoptosis* 2006. **11**: 1695-1707.
- 49 **Sundaramurthy, V. and Pieters, J.,** Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes Infect* 2007. **9**: 1671-1679.

- 50 **Danelishvili, L., Cirillo, S. L., Cirillo, J. D. and Bermudez, L. E.,** Virulent mycobacteria and the many aspects of macrophage uptake. *Future Microbiol* 2007. **2**: 461-464.
- 51 **Feazel, L. M., Baumgartner, L. K., Peterson, K. L., Frank, D. N., Harris, J. K. and Pace, N. R.,** Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009. **106**: 16393-16399.
- 52 **Appelberg, R.,** Pathogenesis of Mycobacterium avium infection: typical responses to an atypical mycobacterium? *Immunol Res* 2006. **35**: 179-190.
- 53 **Inderlied, C. B., Kemper, C. A. and Bermudez, L. E.,** The Mycobacterium avium complex. *Clin Microbiol Rev* 1993. **6**: 266-310.
- 54 **Fratazzi, C., Arbeit, R. D., Carini, C., Balcewicz-Sablinska, M. K., Keane, J., Kornfeld, H. and Remold, H. G.,** Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol* 1999. **66**: 763-764.
- 55 **Nakatani, S. M., Messias-Reason, I. J., Burger, M. and Cunha, C. A.,** Prevalence of Mycobacterium avium and Mycobacterium tuberculosis in blood cultures of Brazilian AIDS patients after introduction of highly active retroviral therapy. *Braz J Infect Dis* 2005. **9**: 459-463.
- 56 **Pedrosa, J., Florido, M., Kunze, Z. M., Castro, A. G., Portaels, F., McFadden, J., Silva, M. T. and Appelberg, R.,** Characterization of the virulence of Mycobacterium avium complex (MAC) isolates in mice. *Clin Exp Immunol* 1994. **98**: 210-216.
- 57 **Jiao, X., Lo-Man, R., Guermonprez, P., Fiette, L., Deriaud, E., Burgaud, S., Gicquel, B., Winter, N. and Leclerc, C.,** Dendritic cells are host cells for mycobacteria in vivo that trigger innate and acquired immunity. *J Immunol* 2002. **168**: 1294-1301.
- 58 **Smith, D., Hansch, H., Bancroft, G. and Ehlers, S.,** T-cell-independent granuloma formation in response to Mycobacterium avium: role of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma. *Immunology* 1997. **92**: 413-421.
- 59 **Appelberg, R., Castro, A. G., Pedrosa, J., Silva, R. A., Orme, I. M. and Minoprio, P.,** Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of Mycobacterium avium infection. *Infect Immun* 1994. **62**: 3962-3971.
- 60 **Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. L., Collins, H. L., Fok, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J. and Russell, D. G.,** Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 1994. **263**: 678-681.
- 61 **Saunders, B. M., Zhan, Y. and Cheers, C.,** Endogenous interleukin-12 is involved in resistance of mice to Mycobacterium avium complex infection. *Infect Immun* 1995. **63**: 4011-4015.
- 62 **Appelberg, R. and Orme, I. M.,** Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of Mycobacterium avium infections in murine macrophages. *Immunology* 1993. **80**: 352-359.
- 63 **Bermudez, L. E.,** Differential mechanisms of intracellular killing of Mycobacterium avium and Listeria monocytogenes by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol* 1993. **91**: 277-281.
- 64 **Schaible, U. E., Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H. and Russell, D. G.,** Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of Mycobacterium avium-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol* 1998. **160**: 1290-1296.

- 65 **Early, J., Fischer, K. and Bermudez, L. E.**, Mycobacterium avium uses apoptotic macrophages as tools for spreading. *Microb Pathog* 2011. **50**: 132-139.
- 66 **Deretic, V., Delgado, M., Vergne, I., Master, S., De Haro, S., Ponpuak, M. and Singh, S.**, Autophagy in immunity against mycobacterium tuberculosis: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009. **335**: 169-188.
- 67 **Jo, E. K.**, Innate immunity to mycobacteria: vitamin D and autophagy. *Cell Microbiol* 2010. **12**: 1026-1035.
- 68 **Prendergast, K. A. and Kirman, J. R.**, Dendritic cell subsets in mycobacterial infection: Control of bacterial growth and T cell responses. *Tuberculosis (Edinb)* 2012.
- 69 **Martino, A.**, Mycobacteria and innate cells: critical encounter for immunogenicity. *J Biosci* 2008. **33**: 137-144.
- 70 **Petrofsky, M. and Bermudez, L. E.**, Neutrophils from Mycobacterium avium-infected mice produce TNF-alpha, IL-12, and IL-1 beta and have a putative role in early host response. *Clin Immunol* 1999. **91**: 354-358.
- 71 **Saunders, B. M. and Cheers, C.**, Intranasal infection of beige mice with Mycobacterium avium complex: role of neutrophils and natural killer cells. *Infect Immun* 1996. **64**: 4236-4241.
- 72 **Florido, M., Correia-Neves, M., Cooper, A. M. and Appelberg, R.**, The cytolytic activity of natural killer cells is not involved in the restriction of Mycobacterium avium growth. *Int Immunol* 2003. **15**: 895-901.
- 73 **Mendez-Samperio, P., Belmont, L. and Miranda, E.**, Mycobacterium bovis BCG Toll-like receptors 2 and 4 cooperation increases the innate epithelial immune response. *Arch Med Res* 2008. **39**: 33-39.
- 74 **Bafica, A., Scanga, C. A., Feng, C. G., Leifer, C., Cheever, A. and Sher, A.**, TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to Mycobacterium tuberculosis. *J Exp Med* 2005. **202**: 1715-1724.
- 75 **Korbel, D. S., Schneider, B. E. and Schaible, U. E.**, Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 2008. **10**: 995-1004.
- 76 **Feng, C. G., Scanga, C. A., Collazo-Custodio, C. M., Cheever, A. W., Hieny, S., Caspar, P. and Sher, A.**, Mice lacking myeloid differentiation factor 88 display profound defects in host resistance and immune responses to Mycobacterium avium infection not exhibited by Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-deficient animals. *J Immunol* 2003. **171**: 4758-4764.
- 77 **Gomes, M. S., Florido, M., Cordeiro, J. V., Teixeira, C. M., Takeuchi, O., Akira, S. and Appelberg, R.**, Limited role of the Toll-like receptor-2 in resistance to Mycobacterium avium. *Immunology* 2004. **111**: 179-185.
- 78 **Carvalho, N. B., Oliveira, F. S., Duraes, F. V., de Almeida, L. A., Florido, M., Prata, L. O., Caliari, M. V., Appelberg, R. and Oliveira, S. C.**, Toll-like receptor 9 is required for full host resistance to Mycobacterium avium infection but plays no role in induction of Th1 responses. *Infect Immun* 2011. **79**: 1638-1646.
- 79 **Bala, S., Hastings, K. L., Kazempour, K., Inglis, S. and Dempsey, W. L.**, Inhibition of tumor necrosis factor alpha alters resistance to Mycobacterium avium complex infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1998. **42**: 2336-2341.
- 80 **Jacobs, M., Togbe, D., Fremond, C., Samarina, A., Allie, N., Botha, T., Carlos, D., Parida, S. K., Grivennikov, S., Nedospasov, S., Monteiro, A., Le**

- Bert, M., Quesniaux, V. and Ryffel, B.,** Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect* 2007. **9**: 623-628.
- 81 **Ehlers, S., Benini, J., Kutsch, S., Endres, R., Rietschel, E. T. and Pfeffer, K.,** Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun* 1999. **67**: 3571-3579.
- 82 **Lienhardt, C., Glaziou, P., Uplekar, M., Lonnroth, K., Getahun, H. and Raviglione, M.,** Global tuberculosis control: lessons learnt and future prospects. *Nat Rev Microbiol* 2012. **10**: 407-416.
- 83 **Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. and Lanzavecchia, A.,** Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005. **6**: 769-776.
- 84 **Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. and Aderem, A.,** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000. **97**: 13766-13771.
- 85 **Schorey, J. S. and Cooper, A. M.,** Macrophage signalling upon mycobacterial infection: the MAP kinases lead the way. *Cell Microbiol* 2003. **5**: 133-142.
- 86 **Li, X., Jiang, S. and Tapping, R. I.,** Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival. *Cytokine* 2010. **49**: 1-9.
- 87 **Bas, S., Neff, L., Vuillet, M., Spenato, U., Seya, T., Matsumoto, M. and Gabay, C.,** The proinflammatory cytokine response to *Chlamydia trachomatis* elementary bodies in human macrophages is partly mediated by a lipoprotein, the macrophage infectivity potentiator, through TLR2/TLR1/TLR6 and CD14. *J Immunol* 2008. **180**: 1158-1168.
- 88 **Giambartolomei, G. H., Zwerdling, A., Cassataro, J., Bruno, L., Fossati, C. A. and Philipp, M. T.,** Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*. *J Immunol* 2004. **173**: 4635-4642.
- 89 **Sweet, L. and Schorey, J. S.,** Glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium* promote macrophage activation in a TLR2- and MyD88-dependent manner. *J Leukoc Biol* 2006. **80**: 415-423.
- 90 **Chang, J. S., Huggett, J. F., Dheda, K., Kim, L. U., Zumla, A. and Rook, G. A.,** *Mycobacterium tuberculosis* induces selective up-regulation of TLRs in the mononuclear leukocytes of patients with active pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 2006. **176**: 3010-3018.
- 91 **Roderfeld, M., Koc, A., Rath, T., Blocher, S., Tschuschner, A., Akineden, O., Fischer, M., von Gerlach, S., Goethe, R., Eckelt, E., Meens, J., Bulte, M., Basler, T. and Roeb, E.,** Induction of matrix metalloproteinases and TLR2 and 6 in murine colon after oral exposure to *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Microbes Infect* 2012. **14**: 545-553.
- 92 **Appelberg, R., Castro, A. G., Pedrosa, J. and Minoprio, P.,** Role of interleukin-6 in the induction of protective T cells during mycobacterial infections in mice. *Immunology* 1994. **82**: 361-364.
- 93 **Gomes, M. S., Sousa Fernandes, S., Cordeiro, J. V., Silva Gomes, S., Vieira, A. and Appelberg, R.,** Engagement of Toll-like receptor 2 in mouse macrophages infected with *Mycobacterium avium* induces non-oxidative and TNF-independent anti-mycobacterial activity. *Eur J Immunol* 2008. **38**: 2180-2189.

- 94 **Ishikawa, E., Ishikawa, T., Morita, Y. S., Toyonaga, K., Yamada, H., Takeuchi, O., Kinoshita, T., Akira, S., Yoshikai, Y. and Yamasaki, S.**, Direct recognition of the mycobacterial glycolipid, trehalose dimycolate, by C-type lectin Mincle. *J Exp Med* 2009. **206**: 2879-2888.
- 95 **Gasparini, C. and Feldmann, M.**, NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. *Curr Pharm Des* 2012. **18**: 5735-5745.
- 96 **Balaram, P., Kien, P. K. and Ismail, A.**, Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int J Med Microbiol* 2009. **299**: 177-185.
- 97 **Gomes, M. S. and Appelberg, R.**, NRAMP1- or cytokine-induced bacteriostasis of Mycobacterium avium by mouse macrophages is independent of the respiratory burst. *Microbiology* 2002. **148**: 3155-3160.
- 98 **Hibiya, K., Utsunomiya, K., Yoshida, T., Toma, S., Higa, F., Tateyama, M. and Fujita, J.**, Pathogenesis of systemic Mycobacterium avium infection in pigs through histological analysis of hepatic lesions. *Can J Vet Res* 2010. **74**: 252-257.
- 99 **Kovacs-Simon, A., Titball, R. W. and Michell, S. L.**, Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun* 2011. **79**: 548-561.
- 100 **Bowdish, D. M., Sakamoto, K., Kim, M. J., Kroos, M., Mukhopadhyay, S., Leifer, C. A., Tryggvason, K., Gordon, S. and Russell, D. G.**, MARCO, TLR2, and CD14 are required for macrophage cytokine responses to mycobacterial trehalose dimycolate and Mycobacterium tuberculosis. *PLoS Pathog* 2009. **5**: e1000474.
- 101 **Drage, M. G., Pecora, N. D., Hise, A. G., Febbraio, M., Silverstein, R. L., Golenbock, D. T., Boom, W. H. and Harding, C. V.**, TLR2 and its co-receptors determine responses of macrophages and dendritic cells to lipoproteins of Mycobacterium tuberculosis. *Cell Immunol* 2009. **258**: 29-37.
- 102 **Drage, M. G., Tsai, H. C., Pecora, N. D., Cheng, T. Y., Arida, A. R., Shukla, S., Rojas, R. E., Seshadri, C., Moody, D. B., Boom, W. H., Sacchettini, J. C. and Harding, C. V.**, Mycobacterium tuberculosis lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. *Nat Struct Mol Biol* 2010. **17**: 1088-1095.
- 103 **Lancioni, C. L., Li, Q., Thomas, J. J., Ding, X., Thiel, B., Drage, M. G., Pecora, N. D., Ziady, A. G., Shank, S., Harding, C. V., Boom, W. H. and Rojas, R. E.**, Mycobacterium tuberculosis lipoproteins directly regulate human memory CD4(+) T cell activation via Toll-like receptors 1 and 2. *Infect Immun* 2011. **79**: 663-673.
- 104 **Schorey, J. S. and Sweet, L.**, The mycobacterial glycopeptidolipids: structure, function, and their role in pathogenesis. *Glycobiology* 2008. **18**: 832-841.

9. Anexos

9 ANEXOS

9.1 Anexo I: Outros artigos publicados ou submetidos durante o doutorado

de Almeida LA, Macedo GC, **Marinho FA**, Gomes MT, Corsetti PP, Silva AM, Cassataro J, Giambartolomei GH, Oliveira SC; TLR6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice; Infect Immun; março 2013 (Epub ahead of print).

Marinho FA, Souza SC, Silva CM, Cassali GD, Fonseca CT, Oliveira SC, Pacífico LG; *Schistosoma mansoni* schistosomula tegument (Smtteg) induces IL-10 production and modulates the experimental allergic asthma; Int Arch Allergy Immunol; Submetido.

Marinho FA, Pacífico LG, Miyoshi A, Azevedo V, Le Loir Y, Guimarães VD, Langella P, Cassali GD, Fonseca CT, Oliveira SC; An intranasal administration of *Lactococcus lactis* strains expressing recombinant interleukin-10 modulates acute allergic airway inflammation in a murine model; Clin Exp Allergy, 40(10): 1541-51; 2010.

9.2 Anexo II: Artigo publicado referente à Tese