



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

ANA CRISTINA DORIA DOS SANTOS

**ACÚMULO DE COLESTEROL POR *Mycobacterium
smegmatis* COMO POSSÍVEL MODULADOR DA
BIOSSÍNTESE DE LIPOMANANA E LIPOARABINOMANANA**

Belém

2015

ANA CRISTINA DORIA DOS SANTOS

ACÚMULO DE COLESTEROL POR *Mycobacterium smegmatis* COMO POSSÍVEL MODULADOR DA BIOSÍNTESE DE LIPOMANANA E LIPOARABINOMANANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena.

Belém

2015

ANA CRISTINA DORIA DOS SANTOS

ACÚMULO DE COLESTEROL POR *Mycobacterium smegmatis* COMO POSSÍVEL MODULADOR DA BIOSÍNTESE DE LIPOMANANA E LIPOARABINOMANANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pará (UFPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia sob orientação do Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena.

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2015.

Resultado: _____APROVADO_____

Belém (PA), de 2015.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Luciana Pereira Xavier
ICB – UFPA

Prof^a. Dr^a. Barbarella de Matos Macchi
ICB – UFPA

Prof. Dr. Agenor Valadares Santos
ICB – UFPA

Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro de Sena
ICB – UFPA (Orientador)

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Santos, Ana Cristina Doria dos, 1987-

Acúmulo de colesterol por *Mycobacterium smegmatis* como possível modulador da biossíntese de lipomanana e lipoarabinomanana / Ana Cristina Doria dos Santos. - 2015.

Orientador: Chubert Bernardo Castro de Sena.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2015.

1. Tuberculose. 2. Micobactérias. 3. Glicolipídios. 4. Glicoconjugados. I. Título.

CDD 22. ed. 616.995

A

minha querida mãe Dagmar, luz da minha vida. A meu pai José, pelo carinho e dedicação. E a meu irmão Judiron pelo amor incondicional, que hoje se projeta através da sua filha Annalís.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Carvalho e Dagmar Carvalho, por terem concedido a minha vida, e dedicarem todo apoio e amor.

A meu irmão, fonte inesgotável de amor e carinho, minha inspiração, meu melhor amigo. A minha cunhada Jhenny, pela amizade e companheirismo, a minha “boadrasta” Mércia e todos familiares e amigos por estarem comigo me dando forças para sempre seguir rumo ao meus objetivos.

A minha sobrinha Annalís, que desde que nasceu alegrou meus dias, um sorriso contagiante que me dá energia extra, quando estou com ela cada segundo é mágico com muito amor envolvido em cada olhar.

A meu orientador e amigo, Chubert Bernardo Castro de Sena, sempre atencioso e receptivo me ajudando nessa etapa com muita paciência. Exemplo de profissional, um verdadeiro mestre, que com certeza é uma fonte de inspiração para todos os alunos fascinados pela Ciência.

Ao professor, José Luiz Martins do Nascimento pelas contribuições como mestre e pelo apoio que tive no Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular, fundamentais para realização deste projeto. Parabéns pela dedicação na pesquisa, que ao longo dos anos vem ajudando e formando cientistas.

As técnicas Neidiane e Fernanda, por terem me ajudado no desenvolvimento do trabalho. Com a prestatividade de vocês tudo ficou mais fácil, muito obrigada pela atenção.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural, coordenado pela professora Edilene Oliveira da Silva, onde grande parte do trabalho foi realizado, com todos reagentes e equipamentos necessários para o desenvolvimento dos ensaios experimentais.

A todos os alunos e amigos do Laboratório de Biologia Estrutural: Victor Marinho, Jéssica Batista, Rafael Blois, Pedro Aviz, Roberto Moraes, Aldanete Rosário, Vanessa Miranda, Giselle Brasil, Dhara Yasmim e Jaqueline Batista. Em ordem hierárquica pra não ter problemas, minha segunda família em Belém, sem palavras para agradecer a cada um de vocês! A Deus por ter me proporcionado realizar essa nova fase de minha vida, e por sempre ter colocado pessoas tão maravilhosas no meu caminho...

*“O que se vê,
Antes não era;
E o que era, não é
Mais.”*

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A parede celular micobacteriana é uma característica marcante do gênero *Mycobacterium*, apresentando lipídios e glicoconjugados bioativos, como fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). A infecção crônica no interior de macrófagos pulmonares é relacionada com o acúmulo de colesterol na célula hospedeira, conferindo uma fonte alternativa de energia e carbono para o bacilo manter suas funções fisiológicas. Com base na atividade imunomoduladora desses glicoconjugados e na adaptação em outro ambiente no interior da célula hospedeira infectada, propomos investigar a possível modulação da biossíntese de LM/LAM em *Mycobacterium smegmatis* (saprofítico), após o cultivo em meio mínimo (MM) suplementado com glicerol e/ou colesterol. Como resultados, obtivemos que o bacilo, mesmo sendo saprofítico, foi capaz de acumular colesterol e influenciar na fisiologia bacteriana por apresentar um crescimento lento com densidade bacteriana comprometida. Além disso, o colesterol diminuiu o acúmulo de PIMs e promoveu mudanças morfológicas e de agregação bacteriana, mesmo mantendo a parede celular com sua característica físico-química específica (resistência a descoloração por álcool e ácido). A mudança mais marcante induzida pelo consumo do colesterol foi na biossíntese de LAM, que apresentou migração eletroforética diferenciada, compatível às massas moleculares maiores, assemelhando-se a de bacilos não saprofíticos (de 25 – 30 KDa para 30 – 50 KDa). Estes resultados mostram que o colesterol, quando utilizado como principal alternativa de fonte de energia e carbono, pode induzir mudanças fisiológicas em micobactérias, principalmente na biossíntese de LAM, uma das principais moléculas imunoreguladoras presente na parede celular. Estes dados sugerem que micobactérias podem sofrer mudanças semelhantes no interior de granulomas, e que estas mudanças podem ajudar na evolução da tuberculose para a forma crônica multibacilar, marcada por um aspecto imunodeficiente contra o bacilo.

Palavras-chaves: Tuberculose; Glicoconjugados; Lipomanana; Lipoarabinomanana; Colesterol.

ABSTRACT

Mycobacterial cell wall is a hallmark of *Mycobacterium* genus, constituted of bioactive lipids and glycoconjugates: phosphatidylinositol mannoside (PIMs), lipomannan (LM) and lipoarabinomannan (LAM). The chronic infection inside lung macrophages is related with cholesterol accumulation into host cells as an alternative source of carbon and energy to maintain the bacilli with its physiological functions. To understand the activity of these immunomodulatory glycoconjugates during adaptation under the unusual environment inside the host infected cells, the present work propose to investigate the possible modulation of LM/LAM biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis* (saprophytic) after culture in minimal medium (MM), supplemented with glycerol and/or cholesterol. Our results showed that saprophytic bacilli are able to accumulate the cholesterol and change the bacterial physiology due to slow growth and restrict cell density. Furthermore, the cholesterol consumption decreased the accumulation of PIMs and promoted morphological changes and bacterial aggregates, even maintaining the cell wall with its specific physic-chemistry characteristic (alcohol-acid resistance). The most impressive change after cholesterol consumption was the LAM biosynthesis, which showed distinct electrophoresis migration, compatible to high molecular weight of LAM from non-saprophytic bacilli (from 25 – 30 KDa to 30 – 50 KDa). These results showed that cholesterol consumption, when utilized as principal alternative of carbon and energy source, is able to induce physiological changes in mycobacteria, mainly in LAM biosynthesis, one of the most immunoregulatory molecules of cell wall. Ours data suggest that similar changes in mycobacteria may occur inside the granuloma, and that changes may help the evolution of tuberculosis to chronic and multibacillary form, hallmarked by immunodeficient aspect against the bacilli.

Keyword: Tuberculosis; Glycoconjugates; Lipomannan; Lipomannan; Cholesterol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Número de novos casos estimados de TB no mundo em 2013.....	19
Figura 2. Número de casos TB-MDR estimados para ocorrer entre os casos notificados de TB pulmonar em 2013.....	20
Figura 3. Ciclo de infecção da TB.....	22
Figura 4. Esquema do <i>M. tuberculosis</i> no interior do macrófago.....	24
Figura 5. . Modelo hipotético para o papel do IFN- γ na produção de NO em macrófagos humanos infectados por micobactérias.....	25
Figura 6. Representação da via metabólica e seus produtos durante o crescimento <i>in vitro</i> em meio contendo colesterol como fonte principal de carbono e energia.....	28
Figura 7. Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana...	30
Figura 8. O metabolismo de inositol em micobactérias.....	31
Figura 9. Esquema das diferenças estruturais das capas de LAM em <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. smegmatis</i>	32
Figura 10. Esquema dos mecanismos de modulação da biossíntese de PIM, LM e LAM.....	34
Figura 11. Perfil lipídico e de glicoconjugados de cepas deficientes em manosiltransferases.....	35
Gráfico 1. Curva de crescimento de <i>M. smegmatis</i> em meio rico e pobre de nutriente.....	44
Gráfico 2. Acúmulo de colesterol pelo <i>M. smegmatis</i> durante o crescimento em diferentes fontes definidas de carbono.....	46
Figura 12. Análise do acúmulo de colesterol pelo <i>M. smegmatis</i>	47
Figura 13. Perfil de PIMs em <i>Mycobacterium smegmatis</i>	49
Figura 14. Perfil de LAM e LM de <i>M. smegmatis</i> após consumo de diferentes fontes nutricionais.....	51
Figura 15. Densitometria do perfil de migração de LM/LAM em gel de SDS-PAGE.....	52

Figura 16. Análise das características físico-químicas pela coloração de Ziehl-Neelsen.....	55
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Arabinogalactano
AraLAM	LAM não capeado
ATP	Adenosina trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
CG	Ciclo do Glioxilato
CMC	Ciclo do Metilcitrato
D.O	Densidade Ótica
DC	Suplemento catalase e dextrose (glicose)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
<i>Igr</i>	Operon de crescimento intracelular
INF-γ	Interferon-gama
Ino	Inositol
iNOS ou NOS2	Isoforma induzida da óxido nítrico sintase
LAM	Lipoarabinomanana
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (LDL)
LM	Lipomanana
AM	Ácidos micólicos
Man-LAM	Lipoarabinomanana capeado com manose
MM	Meio Mínimo

MSMEG_4241	Enzima de alongamento
MSMEG_4247	Enzima de ramificação
NO	Óxido Nítrico
NOS3	Isoforma endotelial da óxido nítrico sintase
PBS	Tampão Fosfato Salina
PG	Peptidoglicano (PG)
pH	Potencial hidrogeniônico
PI	Fosfatidilinositol
PI-LAM	LAM capeado com fosfoinositol
PIM	Fosfatidilmioinositol Manosídeo
PPD	Derivado de proteína purificada
RNI	Intermediário reativo de nitrogênio
ROI	Intermediário reativo de oxigênio
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio – Gel de Poliacrilamida
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
TB	Tuberculose
TB-MDR	Tuberculose multirresistente a drogas
TB-XDR	Tuberculose extensivamente resistente a drogas
TNF	Fator de Necrose Tumoral
Tris	<i>2-Amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde
TCA	Ácido tricloracético
UFC	Unidade Formadora de Colônia

MOI Multiplicidade de infecção

SFB Soro Fetal Bovino

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angstrom
cm	Centímetros
C°	Grau Celsius
g	Gramma
<i>g</i>	Força centrífuga relativa
<i>kDa</i>	Kilodalton
mA	Miliampère
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
V	Volt
v/v	porcentagem por volume
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
M	Molar(Mol.L ⁻¹)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. GÊNERO <i>Mycobacterium</i>	17
2.2. TUBERCULOSE: A PRINCIPAL PATOLOGIA CAUSADA POR MICOBACTÉRIAS.....	17
2.2.1. Infecção e formação do granuloma.....	21
2.3. O USO DO COLESTEROL NA SOBREVIVÊNCIA DAS MICOBACTÉRIAS.....	26
2.3.1. Colesterol como fonte nutricional alternativa.....	26
2.3.2. Catabolismo do colesterol pelas Micobactérias.....	27
2.4. PAREDE CELULAR DO GÊNERO <i>Mycobacterium</i>	29
2.4.1. Via de biossíntese de LM e LAM.....	30
2.4.2. Mecanismos de modulação da via de LM e LAM.....	33
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO GERAL.....	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4. METODOLOGIA.....	38
4.1. CULTIVO E TRATAMENTO DO <i>Mycobacterium smegmatis</i>	38
4.2. ANÁLISE DO ACÚMULO DE COLESTEROL.....	39
4.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE LM/LAM EM SDS-PAGE SEGUIDO DE MARCAÇÃO ESPECÍFICA PARA GLICOCONJUGADOS.....	39
4.4. PURIFICAÇÃO DE PIMs E ANÁLISE POR CCD.....	41
4.5. ANÁLISE DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN.....	42
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CRESCIMENTO DE <i>Mycobacterium smegmatis</i> EM FONTES DEFINIDAS DE CARBONO.....	43
5.2. ACÚMULO DE COLESTEROL POR <i>Mycobacterium smegmatis</i>	45
5.3. PERFIS DE LM/LAM E PIMs EM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTE E CARBONO.....	48
5.4. AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN.....	53

6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Micobactérias são bacilos que podem infectar muitos animais, incluindo mamíferos, aves e peixes. Em humanos, permanecem como um problema de saúde mundial em decorrência da atuação de três patógenos principais, o *Mycobacterium tuberculosis* (causador da tuberculose), *Mycobacterium leprae* (causador da hanseníase) e o *Mycobacterium avium* (causador de micobacteriose em pacientes imunodeprimidos, como os soro-positivos para o vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)) (ALLEN, 2010).

Atualmente, a tuberculose é considerada um problema de saúde em todo mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2014) mostram que no ano de 2013 foram reportados 9,0 milhões de novos casos, reforçando que a tuberculose ainda causa a morte de milhões de pessoas todos os anos, apresentando-se, dentre as patologias infecciosas, na segunda colocação na causa de mortes. Estes dados alarmantes também são relacionados com a maior causa de morte mundial, a infecção pelo vírus HIV, causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), que imunossuprime os pacientes, deixando-os vulneráveis a infecções oportunistas.

Durante a tuberculose latente, o bacilo permanece no seu hospedeiro em um estado de “dormência” sem causar a doença propriamente dita, podendo a proliferação bacteriana ser reativada após anos de infecção assintomática, questionando a natureza do estado fisiológico dessas bactérias durante esses períodos distintos da infecção (PARRISH *et al.*, 1998).

A parede celular bacteriana tem sido foco principal dos temas voltados para os aspectos adaptativos das micobactérias para seu crescimento intracelular, conferindo papel crucial na adesão a macrófagos alveolares (célula hospedeira), barreira contra a entrada de antibióticos, via para aquisição de nutrientes e imunomodulação da célula infectada, através da inibição de propriedades microbicidas do hospedeiro (RASTOGI, 1993).

Dentre os componentes bioativos mais abundantes da parede celular das micobactérias, podemos citar glicoconjugados de característica lipídica (glicolipídios): Fosfatidilmioinositol Manosídeos (PIMs), Lipomanana (LM) e Lipoarabinomanana (LAM). Todos esses são originários de um fosfolipídio precursor

comum, o fosfatidilinositol (PI). Moléculas de PI são encontradas na membrana plasmática de muitos tipos celulares, oriundos das mais diferentes ordens filogênicas. Estes glicoconjugados possuem papel importante no processo de infecção e modulação da resposta imune, favorecendo a sobrevivência e crescimento da bactéria no organismo infectado (MORITA *et al.*, 2011).

Devido a complexidade da parede celular e sua importância na patogenia do micobactério, muitas drogas anti-micobacterianas disponíveis para uso possuem como alvo a via de biossíntese desses glicolipídios (OUELLET *et al.*, 2011). Esta via de biossíntese ainda possui aspectos desconhecidos, e a resistência crescente das micobactérias a drogas usuais tem incentivado esforços para o melhor entendimento da parede celular do bacilo, em especial, no interior da célula hospedeira, no qual o bacilo deverá se adaptar para permanecer vivo. Dessa forma, a busca por possíveis alternativas de controle da infecção permanecem necessárias frente ao crescente número de pacientes resistentes às drogas usuais.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. GÊNERO *Mycobacterium*

A classificação das micobactérias teve início em 1896, quando o gênero *Mycobacterium* foi proposto pela primeira vez por Lehmann e Neumann, incluindo as espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae*, devido apresentarem as mesmas características morfológicas e de coloração, ou seja, este gênero é caracterizado por uma resistência específica no processo de descoloração da fucsina por solução de álcool ácido, sendo então classificados como bacilos álcool-ácido resistentes (COLLINS *et al.*, 1997).

O gênero *Mycobacterium* pertence a classe *Actinobacteria* e família *Mycobacteriaceae*. Atualmente na “*List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature*” há citação de 169 espécies e 13 subespécies (BRENNER *et al.*, 2005; EUZÉBY, 2014).

As micobactérias são geralmente separadas em dois grupos principais com base na sua taxa de crescimento. Um grupo inclui espécies de crescimento lento, representadas pelas bactérias patogênicas (ex: *M. tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*) e outro grupo que possui crescimento rápido, representado pelas bactérias não-patogênicas, tendo como um dos principais representantes o *Mycobacterium smegmatis* (NIEMANN *et al.*, 2000; BROSCHE *et al.*, 2002). Apresentam-se com forma de bacilos que variam de 0,2µm a 0,6µm de largura e 1µm a 10µm de comprimento. Essas formas bacilares podem ser delgadas, retas ou ligeiramente curvas. São aeróbios ou microaerófilos, imóveis e incapazes de formar esporos (LEÃO *et al.*, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.2. TUBERCULOSE: A PRINCIPAL PATOLOGIA CAUSADA POR MICOBACTÉRIAS

A tuberculose é uma doença infectocontagiosa, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium tuberculosis* (GUTIERREZ *et al.*, 2005). A transmissão ocorre através do ar, a partir do indivíduo doente que elimina os bacilos para o exterior (bacilífero). A chance que o indivíduo infectado possui para evoluir para doença,

depende de múltiplas causas, incluindo a competência do sistema imune, sendo que o diagnóstico da maior parte dos casos novos acontece em torno de 12 meses após a infecção inicial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

A evolução do quadro clínico do paciente também dependerá da ocorrência da infecção: primo-infecção (que está ocorrendo pela primeira vez) ou reinfecção exógena (que está ocorrendo a reinfecção). Na primo-infecção pode ocorrer a doença dependendo da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas dos indivíduos infectados. Quando o indivíduo sofre um novo contato, após uma infecção natural ou induzida pela BCG, a resistência dependerá da resposta imunológica (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Uma vez infectado, o hospedeiro pode desenvolver TB em qualquer fase da vida. Esse fato ocorre quando o sistema imune não pode mais controlar a multiplicação do bacilo, promovendo a rápida disseminação, onde todos os órgãos podem ser acometidos pelo bacilo da tuberculose, porém, a doença ocorre com mais frequência nos seguintes sítios: pulmões, gânglios, rins, pleura, cérebro e ossos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Em 1882, através de seus postulados, Robert Koch caracterizou o bacilo da TB como um agente infeccioso. Ele também desenvolveu a tuberculina, um extrato de glicerina obtido através de culturas puras de *M. tuberculosis* que, teria como uma proposta inicial ser uma nova terapia. Devido a uma falha no seu uso, ela foi utilizada para detectar infecções latentes, através da medição de reações cutâneas no local da injeção com essa substância. A tuberculina foi substituída pelo derivado de proteína purificada (PPD), que consiste num precipitado de cultura de *M. tuberculosis* esterilizado e filtrado, que ainda são utilizados para testes (KOCH, 1932; SAKAMOTO, 2012).

Uma epidemia de TB devastou grande parte da Europa e América do Norte no início de 1800, resultando em 800 a 1000 mortes por 100.000 habitantes por ano (KRAUSE, 1928). Um dos grandes avanços no combate contra a TB ocorreu entre 1906 e 1919, quando foi desenvolvida a estirpe de vacina atenuada, através de múltiplas passagens da espécie *Mycobacterium bovis* em bile de boi e fatias de batata encharcadas com glicerol, dando origem ao Bacilo de Calmette-Guérin (BCG) (CALMETTE *et al.*, 1921). A vacina BCG, embora altamente eficaz na prevenção da forma infantil da tuberculose, apresenta eficácia variável em adultos (FINE, 1995). Outro grande avanço foi a descoberta das drogas anti-micobacterianas como:

estreptomicina (1944), isoniazida (1952), as rifampicinas (1957) e pirazinamida (1980). Estas descobertas levaram a uma nova era na prevenção da TB, pesquisa e tratamento (VAN & WILKOWSKE, 1999).

Sobretudo, com o surgimento em 1981 da Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA), foi observado que, tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, havia um crescente número de casos notificados de tuberculose em pessoas infectadas pelo vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Esta associação (HIV/TB) constitui, atualmente, um problema de saúde pública, podendo levar ao aumento da morbidade e mortalidade pela tuberculose em muitos países. No Brasil, a TB é um problema de saúde prioritário, somado com 22 países em desenvolvimento, temos cerca de 80% dos casos mundiais desta doença. A incidência no Brasil em 2013 apresentou aproximadamente 70.000 casos, e no mundo a incidência chegou a 9,0 milhões de casos (Figura 1) (WHO, 2014).

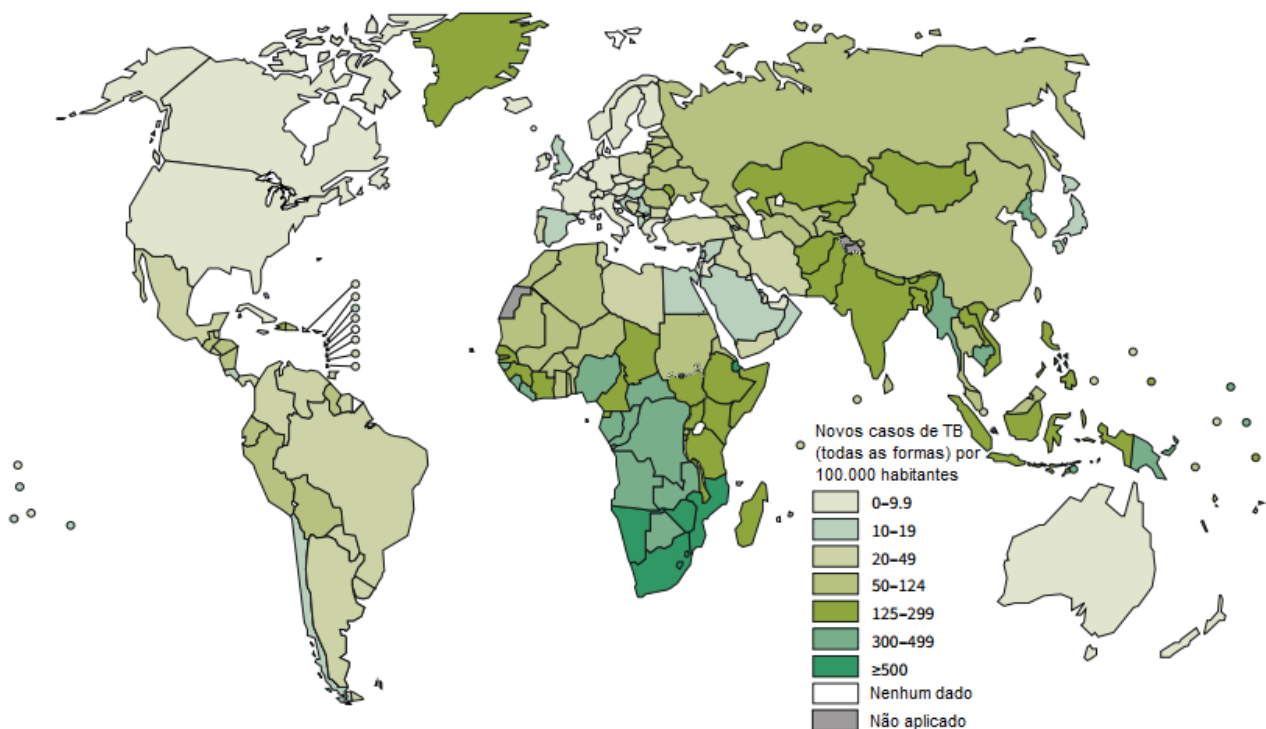


Figura 1. Número de novos casos estimados de TB no mundo em 2013(Adaptado de WHO, 2014).

Atualmente, o tratamento recomendado para a TB, no caso de cepas sensíveis aos antibióticos, tem duração de 6 meses, administrando quatro drogas de primeira- linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. Normalmente a

taxa de sucesso desse ciclo de drogas é de mais de 85% de cura. Com os casos de resistência dessas bactérias, os pacientes são submetidos ao tratamento da tuberculose multirresistente a drogas (TB-MDR) (Figura 2). Para este grupo, são agregados os casos que apresentam resistência primária à rifampicina, isoniazida e a outras drogas utilizadas, geralmente a estreptomicina e/ou etambutol, sendo assim o tempo do tratamento é maior, cerca de 20 meses, e as chances de sucesso são diminuídas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002).

Existe ainda o tratamento para tuberculose extensivamente resistente a drogas (TB-XDR), que além de ser TB-MDR é resistente a qualquer uma das fluoroquinolonas e, pelo menos, a uma das três drogas injetáveis de segunda-linha (capreomicina, canamicina, e amicacina). Essas cepas que possuem uma resistência a várias classes de antimicrobianos, aumentam ainda mais o período de recuperação dos pacientes e muitas vezes são a causa do aumento dos casos de óbitos (WHO, 2014).

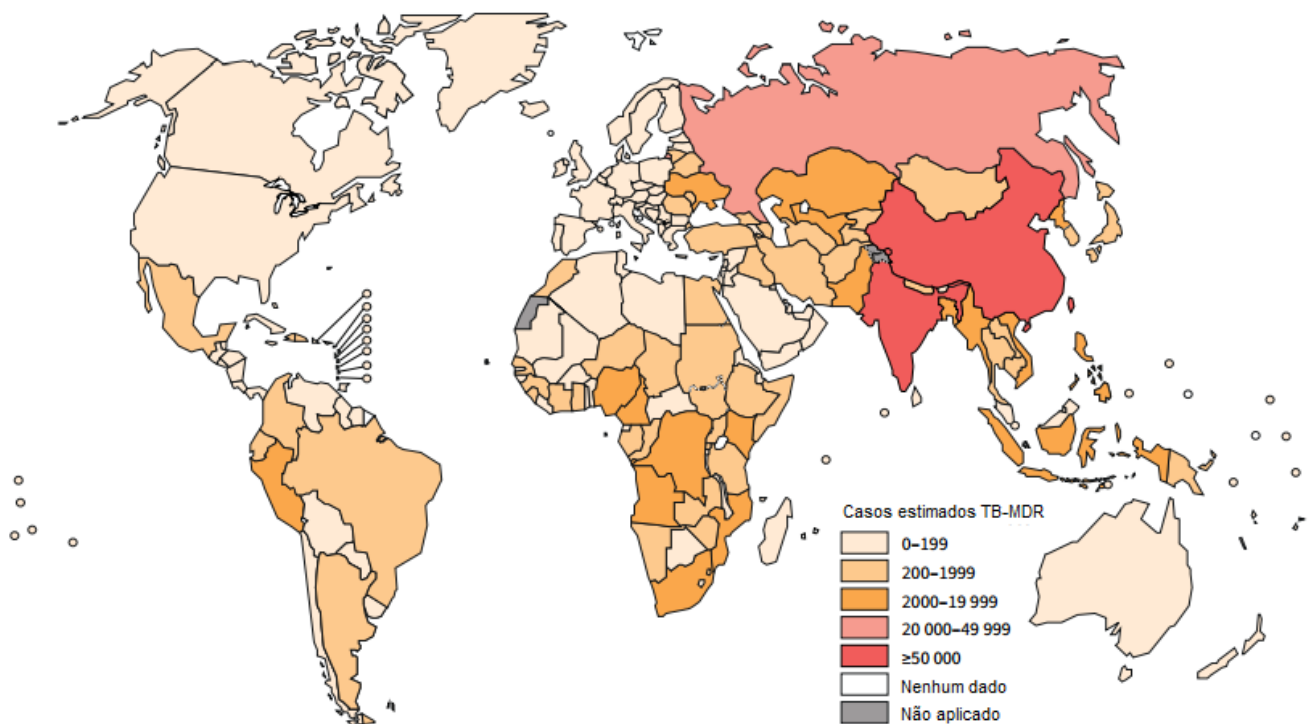


Figura 2. Número de casos TB-MDR estimados para ocorrer entre os casos notificados de TB pulmonar em 2013 (Adaptado de WHO, 2014).

2.2.1. Infecção e a formação do granuloma

Para a micobactéria adentrar no macrófago e sobreviver ao seu poder microbicida, o bacilo necessita se abrigar em um fagossomo e inibir a maturação do mesmo para fagolisossomo, induzindo a latência da célula hospedeira e favorecendo a evolução da doença para uma fase ativa que culmina na disseminação do bacilo (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; NIGOU *et al.*, 2002).

A infecção pelas micobactérias ocorre pela inalação do bacilo. Uma vez no interior do pulmão, eles são internalizados por macrófagos alveolares e logo em seguida se organizam em reservatórios chamados de granulomas, tentando restringir a proliferação bacteriana (NIGOU *et al.*, 2002). Os granulomas constituem um acúmulo de macrófagos infectados (principal célula hospedeira), envoltos por outras células, como macrófagos com característica “espumosa” e epitelióides, monócitos e células gigantes multinucleares que são contidos por uma cápsula de fibrose produzida por fibroblastos acumulados na periferia do granuloma (RUSSELL, 2007).

A transmissão da tuberculose ocorre por via aérea pelo contato com um paciente com a doença ativa (bacilífero). Os bacilos inalados infectam macrófagos alveolares e inibem a maturação do fagolisossoma. O sistema, na tentativa de isolar a inflamação, produz um granuloma sólido, que evolui para um granuloma necrótico com um centro de morte de células infectadas. Com a morte celular intensa, o granuloma evolui para o granuloma caseoso, com grande quantidade de corpos lipídicos, com o aumento da quantidade de bactérias ele se rompe, eliminando novos bacilos no ar, que possibilitará a disseminação dos patógenos novamente na atmosfera, causando um novo ciclo dessas micobactérias (Figura 3) (GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012).

Em suma, com a progressão da tuberculose latente, o granuloma desenvolvido com um centro de morte de macrófagos infectados, liquefaz seu interior pelo aumento de necrose, o que induz futuramente a ruptura desta estrutura e libera bacilos viáveis a partir das vias aéreas respiratórias do hospedeiro, possibilitando novos casos da doença (RUSSELL, 2007; DANNENBERG, 1994).

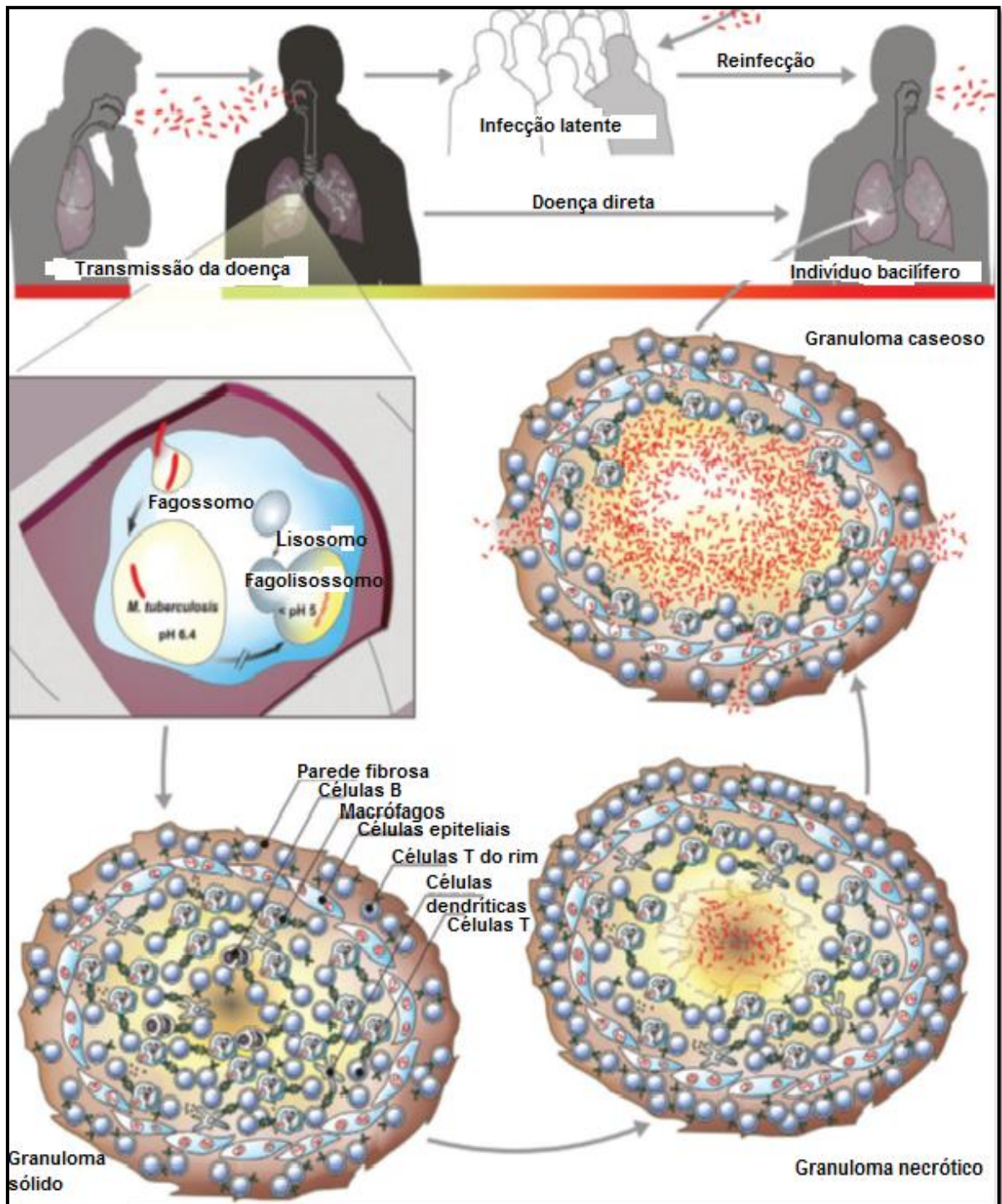


Figura 3. Ciclo de infecção da TB. A transmissão ocorre por via aérea, os bacilos inalados infectam macrófagos alveolares e inibem a maturação do fagolisossoma, ocorre a formação do granuloma sólido, que evolui para o granuloma necrótico e depois para o caseoso, que se rompe, eliminando novos bacilos viáveis no ar. (Adaptado de GENGENBACHER & KAUFMANN, 2012).

Como demonstrado por Dhillon *et al.*, (1996), lesões pulmonares em camundongos infectados com *M. tuberculosis* que assemelham-se a pneumonia lipídica são caracterizadas com infiltrado alveolar compostos de macrófagos “espumosos”, encontrados no interior do granuloma, e foram caracterizadas como as células que contém predominantemente o bacilo. A caracterização espumosa desses macrófagos que contém corpos lipídicos em seu interior, ocorre pela desregulação entre o influxo e efluxo da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e são internalizados através de um processo mediado por receptores específicos (GALKINA & LEY, 2009).

As partículas de LDL possuem em sua estrutura o colesterol, triacilglicerol e fosfolipídeos, porém, após a quebra do LDL, o triacilglicerol e o fosfolipídio são metabolizados e somente o colesterol é retido pelo macrófago após importação para o citoplasma, formando gotículas lipídicas no retículo endoplasmático, sendo o seu excesso bombeado para o meio extracelular através de transportadores dependentes de ATP (RUSSELL *et al.*, 2009; MAXFIELD & TABAS, 2010).

Estes macrófagos “espumosos” são também capazes de amplificar a resposta inflamatória pela produção de outros componentes lipídicos ativos, como prostaglandina E₂ e leucotrienos que influenciam na secreção de citocinas pro-inflamatórias, entre elas o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Interferon-gama (INF- γ), ajudando na persistência da infecção por mecanismos ainda não bem esclarecidos (RUSSELL *et al.*, 2009; PANDEY & SASSETTI, 2008).

Com a evolução do granuloma, e a ativação dos macrófagos pelo INF- γ ocorre a atuação de 2 enzimas, a NADPH oxidase fagocítica (NOX2 / gp91^{phox}) e a isoforma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS ou NOS2), que participam da produção de intermediários reativos de oxigênio (ROI) como também os intermediários reativos de nitrogênio (RNI), gerando um ambiente ácido para o bacilo. Como consequência, a sequência de eventos será com o bacilo residindo num compartimento levemente ácido sendo exposto a ROI oriundas da ação da NADPH oxidase fagocítica (NOX2). Após a ativação imunológica com IFN- γ o fagossomo amadurecido se funde com os lisossomos. Isso expõe o bacilo a prótons da ATPase vacuolar, RNI, iNOS e ROI de NOX2, assim este desenvolve

mecanismos para combater estas formas de estresse e permite a sua sobrevivência dentro de macrófagos ativados. (BEDARD & KRAUSE, 2007) (Figura 4).

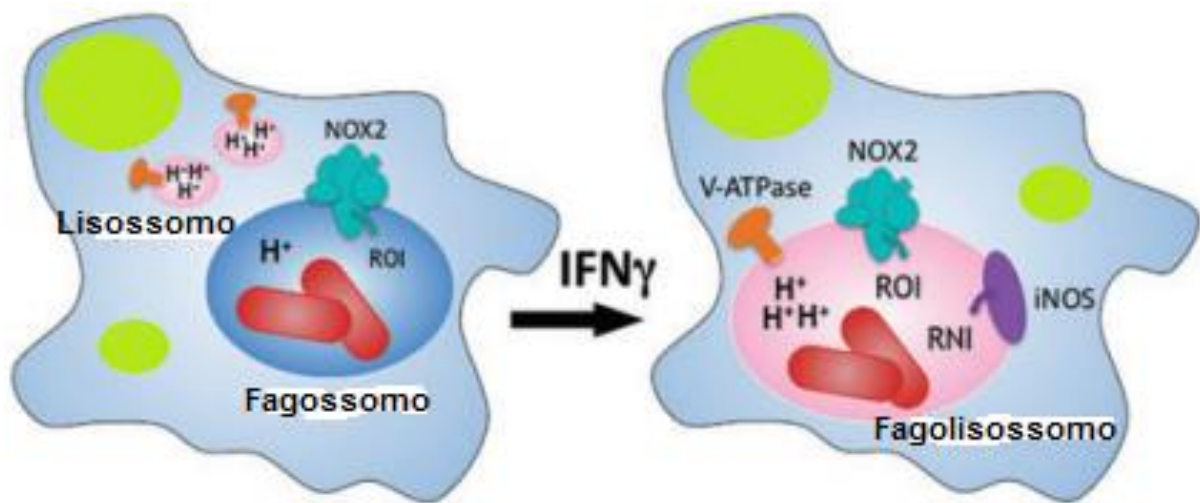


Figura 4. Esquema do *M. tuberculosis* no interior do macrófago. Primeiro o macrófago inativo e a bactéria inibindo a fusão do fagossomo e lisossomo, com isso ocorre a exposição ao estresse oxidativo, e o bacilo desenvolve mecanismos para se manter vivo. Em verde estão representadas as gotículas de colesterol, importante para manutenção do metabolismo (Adaptado de BEDARD & KRAUSE ,2007).

Um estudo realizado com macrófagos humanos melhorou a compreensão do potencial de macrófagos humanos primários para produzir NO (Óxido Nítrico), demonstrando que o nível de RNIS produzidos em resposta ao IFN- γ *in vitro*, não é suficiente para limitar o crescimento intracelular de micobactérias, e sugerem um modelo onde as micobactérias podem utilizar RNI para melhorar a sua sobrevivência em macrófagos humanos. Esse processo ocorre através do tratamento com IFN- γ que aumenta a atividade enzimática de NOS2 (induzida) NOS3 (endotelial). Estes macrófagos produzem óxido nítrico que conduz a disponibilidade de nitrito e nitrato. Nitrato pode ser adquirido por micobactérias através do transportador NarK2, a qual é regulada pelos níveis de NO e hipóxia em macrófagos humanos. O nitrato pode ser reduzido a nitrito, e este é transportado para fora pelo NarK2 (Figura 5) (JUNG *et al.*, 2013).

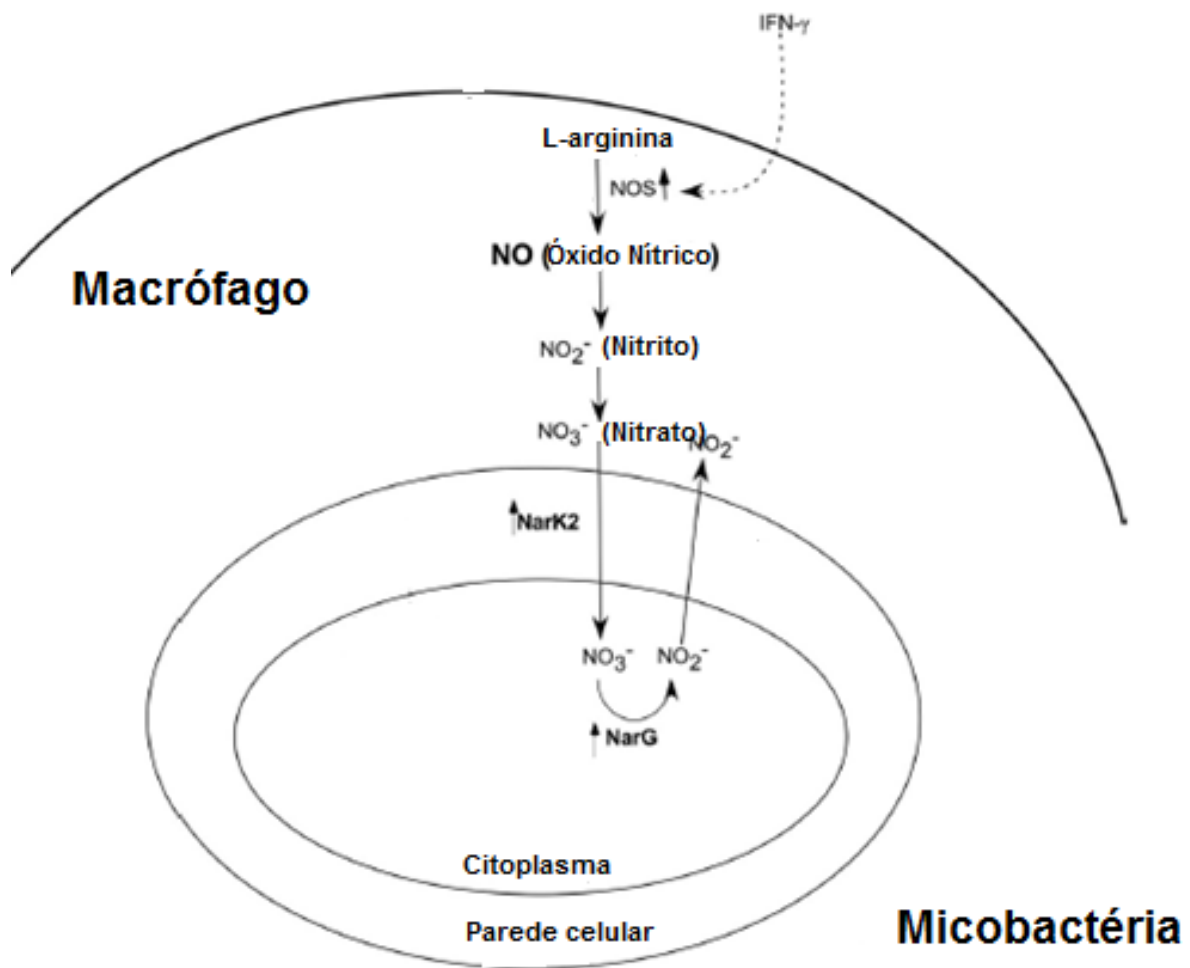


Figura 5. Modelo hipotético para o papel do IFN- γ na produção de NO em macrófagos humanos infectados por micobactérias. Segundo o estudo, IFN- γ aumenta a atividade enzimática de NOS2 (induzida) NOS3 (endotelial). Nos macrófagos o óxido nítrico que conduz a disponibilidade de nitrito e nitrato. O transportador NarK2, regula os níveis de nitrito (Adaptado, JUNG *et al.*, 2013).

Com isso, os “macrófagos espumosos” são um ambiente hostil para o bacilo, mas ele possui o colesterol como uma vantagem nutricional, sustentando a persistência do *M. tuberculosis*, em estado fisiológico de “dormência”. Análise de microscopia eletrônica revelam os bacilos próximos a gotículas lipídicas do hospedeiro, o que facilitaria seu acesso para compor o metabolismo, porém os

processos gerais deste contexto ainda estão sendo elucidados (PEYRON *et al.*, 2008).

2.3. O USO DO COLESTEROL NA SOBREVIVÊNCIA DAS MICOBACTÉRIAS

2.3.1. Colesterol como fonte nutricional alternativa

Muitos estudos tem demonstrado que o acúmulo de corpos lipídios, em especial o colesterol, na célula hospedeira infectada (macrófagos “espumosos”) é utilizado pelas próprias micobactérias como uma fonte de nutriente (PANDEY & SASSETTI, 2008; PEYRON *et al.*, 2008; THOMAS *et al.*, 2011; OUELLET *et al.*, 2011). A busca por genes relacionados com a virulência desse gênero levou a descoberta do “*loci mce*” em *M. tuberculosis*, constituído de quatro genes homólogos em 8 – 13 operons, *mce1 – mce4* (JOSHI *et al.*, 2006).

Dentre os genes *mce* estudados, o *mce4* codifica um sistema de importação de colesterol que possibilita o *M. tuberculosis* obter carbono e energia da célula hospedeira durante a infecção, relacionando sua função diretamente com a evolução da doença para o estágio crônico, além de ser significativamente expresso durante o crescimento do bacilo em macrófagos ativados por IFN- γ (PANDEY & SASSETTI, 2008). Isso levantou outra hipótese para a participação do INF- γ , como um indutor de maturação do fagolisossoma que normalmente é inibido pelas micobactérias, excluindo a reciclagem de endossomos, e assim cancelando a maior fonte de acesso a carbonos para a bactéria, forçando o bacilo a buscar alternativas nutricionais como o colesterol. Estes achados apontam o IFN- γ como um sequestrador de patógenos em um compartimento desprovido de nutrientes comuns, induzindo o bacilo a procurar vias nutricionais alternativas como o colesterol (PANDEY & SASSETTI, 2008; BRZOSTEK *et al.*, 2009).

O cultivo de *M. tuberculosis* em meio de cultura contendo colesterol como fonte primária de carboidratos, demonstrou que o bacilo é capaz de se manter viável, acumular colesterol em sua parede celular, diminuir a permeabilidade para drogas antimicobacterianas como a rifampicina, e parcialmente mascarar antígenos superficiais bacterianos (BRZOSTEK *et al.*, 2009).

Genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos desse patógeno são regulados positivamente durante infecção, e o Ciclo de Metilcitrato é conhecido por ser usado nesse metabolismo adaptativo propiciando o fornecimento de energia, carbono e derivados, suficiente para preservar a integridade bacteriana e promover o seu crescimento (SCHNAPPINGER *et al.*, 2003; MUÑOZ-ELÍAS *et al.*, 2006; GEIZE *et al.*, 2007).

Recentemente, He *et al.*, (2015) estudando cepas modificadas de *M. smegmatis* para a captação de colesterol, cultivadas *in vitro* com o colesterol como fonte definida de carbono e energia, mostrou induzir alterações significativas na resposta microbida da célula hospedeira, mostrando que o colesterol é de importância fundamental para a regulação e progresso da tuberculose.

2.3.2. Catabolismo do colesterol pelas Micobactérias

Patógenos intracelulares devem normalmente adquirir nutrientes oriundos da própria célula hospedeira, com finalidade de garantir sua replicação e o sucesso da infecção. Os substratos e os caminhos metabólicos que são utilizados por microorganismos patogênicos durante a infecção ainda não foram bem identificados, com raras exceções conhecidas (SMITH, 2000). Diferentemente dos demais patógenos microbianos, o *M. tuberculosis* reside num ambiente bioquimicamente rigoroso no interior dos macrófagos, necessitando designar enzimas metabólicas do bacilo como fatores determinantes da sua patogenicidade, interligando uma rede de vias metabólicas para agir na fisiologia desse patógeno (RHEE *et al.*, 2011; RUSSELL *et al.*, 2010).

O crescimento de bactérias e fungos em substratos de ácidos graxos requer o ciclo catabólico da β -oxidação e o ciclo anaplerótico do Glioxilato. O propionil-CoA, produto gerado pela β -oxidação de ácidos graxos de cadeia ímpar, é metabolizado através do ciclo do metilcitrato (CMC), onde é oxidado até o piruvato (Figura 6).

É nesse contexto que o bacilo se replica no fagossomo de macrófagos, que possui nutrientes limitados, baixo pH, e abundante radicais oxidativos. Griffin *et al.*, (2012) descreveram um número de vias metabólicas centrais que têm sido utilizadas na adaptação do bacilo, e foram identificados alguns metabólitos, especificamente

alterados pelo consumo de colesterol durante o crescimento. Os mais significativos metabólitos foram os intermediários do CMC, produzidos durante o catabolismo de propionil-CoA a partir de derivados dos carbonos terminais da cadeia lateral de colesterol. Outros metabólitos importantes que apresentaram alterações durante o consumo de colesterol foram açúcares, dentre eles a manose, principal constituinte de componentes glicolipídicos da parede celular do bacilo.

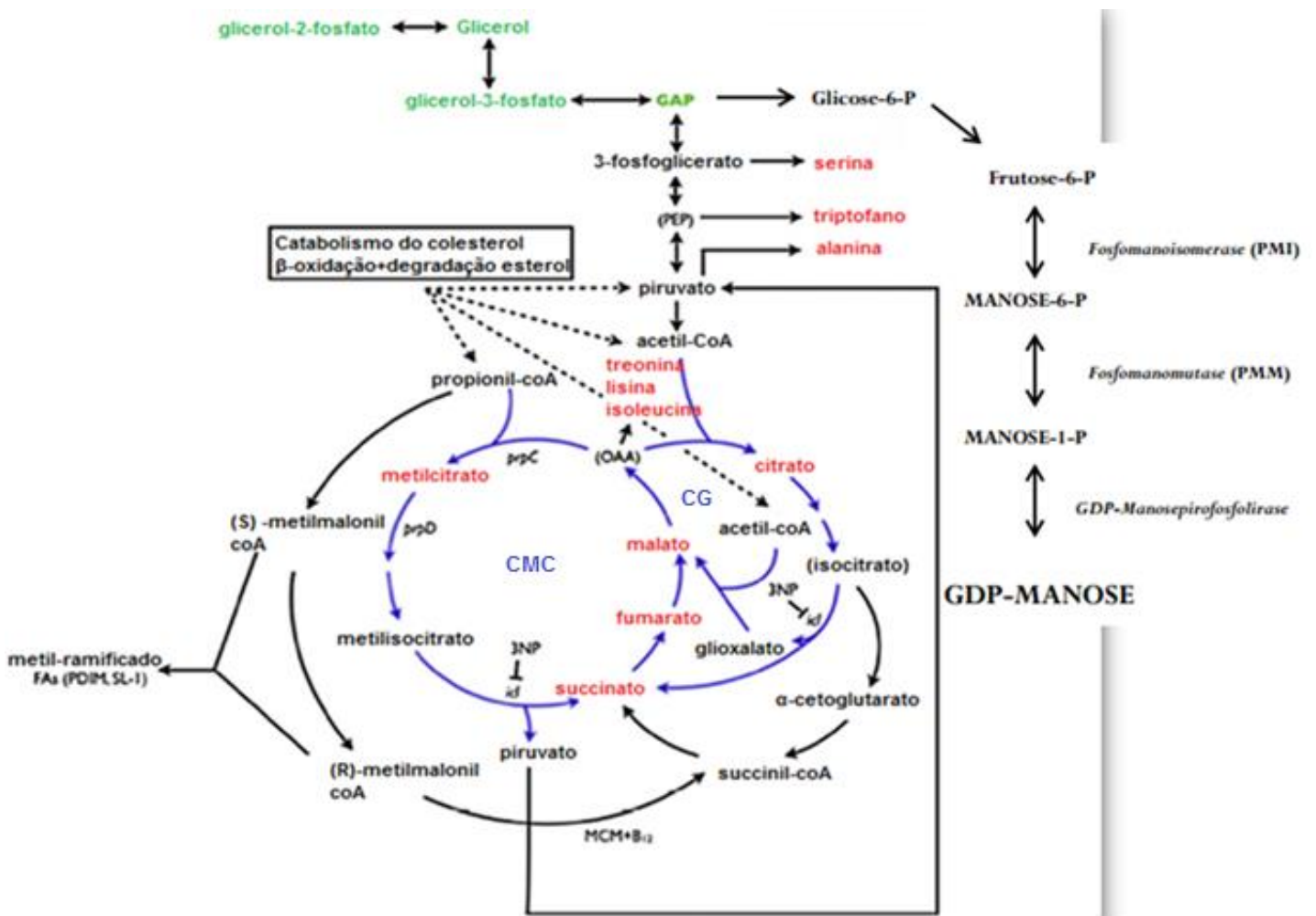


Figura 6. Representação da via metabólica e seus produtos durante o crescimento *in vitro* em meio contendo colesterol como fonte principal de carbono e energia. Representação das vias metabólicas do ciclo do metilcitrato (CMC) e do ciclo do glioxalato (CG) destacadas em azul. O catabolismo do colesterol em acetil-CoA, propionil-CoA, até o piruvato é mostrado. (Adaptado de GRIFFIN *et al.*, 2012).

2.4. PAREDE CELULAR DO GÊNERO *Mycobacterium*

A composição da parede celular é responsável pelo crescimento característico das micobactérias, com colônias hidrofóbicas em meio sólido ou como películas em meio líquido. Isso ocorre nesses patógenos devido ao alto conteúdo de lipídios, que também dificulta a coloração das células micobacterianas pelas técnicas convencionais como a coloração de Gram. Elas possuem alta resistência à descoloração com 95% de etanol e 3% de ácido clorídrico (álcool ácido), e por isso são chamados de bacilos álcool-ácido resistentes. Essa propriedade de resistência à descoloração com uso de álcool é a base da técnica da coloração de Ziehl-Neelsen, nela as células são coradas com fucsina de Ziehl, descoradas com álcool ácido e coradas novamente com azul de metileno, gerando o contraste necessário para revelar as células micobacterianas que aparecem coradas de vermelho (BUTLER & GUTHERTZ, 2001).

Micobactérias possuem uma parede celular incomum que contribui para sua sobrevivência em ambientes inóspitos e são essenciais na infecção. Essa parede celular possui uma estrutura rica em lipídios e açúcares, apresentando-se associada a membrana plasmática do bacilo. Enzimas envolvidas na síntese da parede celular são alvos de ação de drogas utilizadas no tratamento de tuberculose, incluindo a isoniazida, etambutol e pirazinamida. (BRENNAN & NIKAIDO, 1995; MORITA *et al.*, 2011).

Essa parede consiste em uma camada interna e um compartimento interno e externo que é formado por lipídios e proteínas. O compartimento interior consiste de peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG), e ácidos micólicos (AM) covalentemente ligados entre si para formar um complexo conhecido como o AM-AG-PG, que se estende a partir da membrana plasmática para o exterior em camadas, começando com PG e terminando com AMs (Figura 7). Este complexo é insolúvel, sendo essencial para as peculiaridades da parede celular das micobactérias (BRENNAN, 2003). Os lipídios estão frequentemente associados com a parede da célula, com alguns ácidos graxos de cadeia curta e longa complementando a camada interna. Os polissacarídeos ligados aos lipídios

presentes na parede celular consistem em: Lipoarabinomanana (LAM), Lipomanana (LM), Ácidos micólicos (AM) e o Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs).

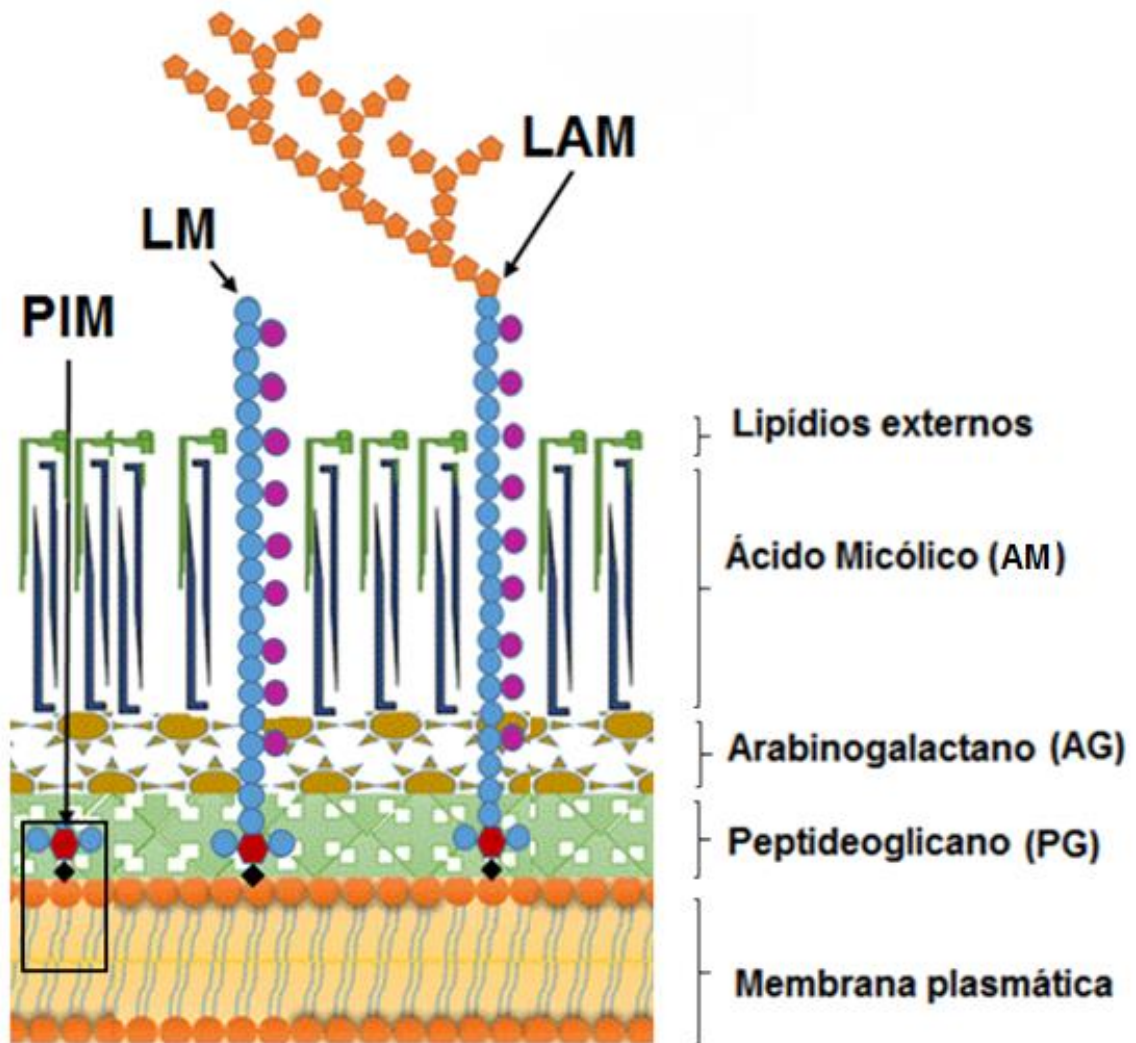


Figura 7. Diagrama dos componentes básicos da parede celular micobacteriana. Esta é subdividida em camadas, composta na porção mais inferior pela membrana plasmática, seguida pelo peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) e na parte superior ácido micólicos (AM) e lipídios externos, inseridos nesse contexto estão LM e LAM e o seu precursor comum PIM. (Adaptado SENA *et al.*, 2010).

2.4.1. Via de biossíntese de LM e LAM

O fosfatidilinositol (PI) é o principal componente da membrana plasmática do *Mycobacterium* e serve como âncora para uma família de Fosfatidilinositol

manosídeos (PIMs), compondo glicolípídios da membrana plasmática. Podemos encontrar PIMs diacetilados e triacetilados, sendo detentores de uma (1) a seis (6) moléculas de manose (AcPIM1 – AcPIM6), sendo AcPIM2 e AcPIM6 os mais abundantes. PIMs ainda podem ser hipermodificados pela adição de manoses e arabinoses, compondo estruturas hiperglicosiladas conhecidas como LM e LAM, que compõem a parede celular do bacilo (Figura 8) (MORITA *et al.*, 2011).

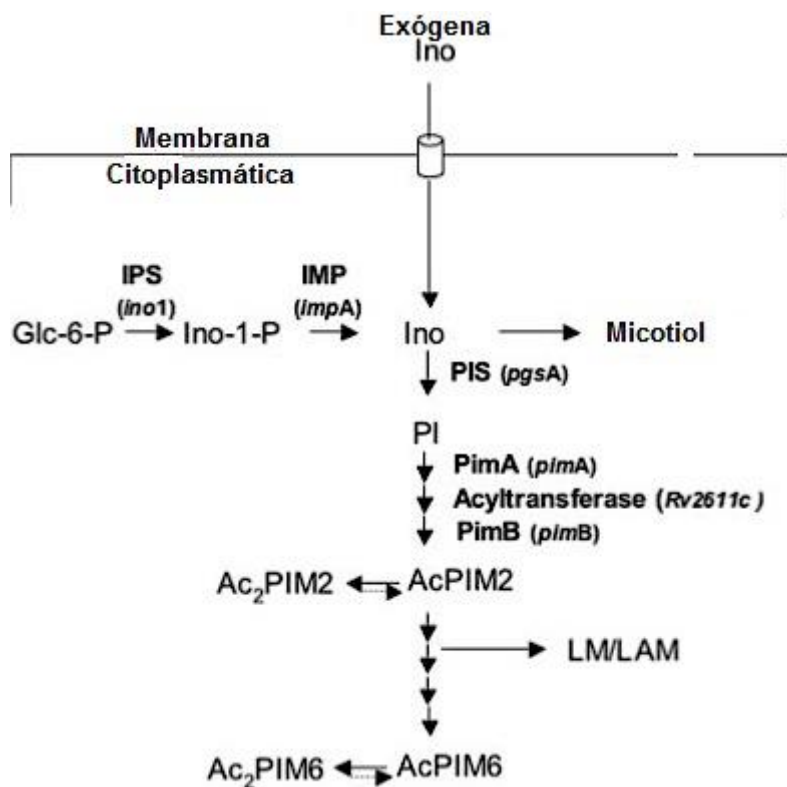


Figura 8. O metabolismo de inositol em micobactérias. Inositol (Ino) pode ser obtido do meio ambiente ou sintetizado *de novo* a partir de D-glicose-6-fosfato (Glc 6-P), podendo ser incorporado em PI ou em micotiol intracelular. O PI pode acumular-se e dar origem a PIMs, LM e LAM (Adaptado de HAITES *et al.*, 2005).

A molécula AcPIM4 é conhecida por ser o ponto de ramificação para a produção de AcPIM6 ou LAM e LM. Caso o alongamento de resíduos de manoses da molécula de AcPIM4 adquirir um resíduo de α 1,2-manose, esta dará origem a AcPIM6, caso contrário o alongamento continuará, podendo originar moléculas de

LAM e LM (MORITA *et al.*, 2006; MORITA *et al.*, 2011). Dessa forma, a estrutura de LM é composta por uma âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) localizada na membrana plasmática, além de um esqueleto de carboidrato com uma longa cadeia de α 1,6-manose com ramificações de unidades de α 1,2-manose (Figura 10). A estrutura de LAM é formada basicamente de uma molécula de LM modificada por um domínio de D-arabinose que pode ser “encapado” por resíduos de manose ou fosfoinosítídeos, classificando LAMs em duas classes: Man-LAMs e PI-LAMs (NIGOU *et al.*, 2002; MORITA *et al.*, 2011).

Em crescimento lento, micobactérias patogênicas, como *M. tuberculosis* e *M. leprae*, as LAMs possuem um resíduo na porção terminal de manose, e são chamadas como Man-LAMs com massa molecular equivalente a 42 kDa, enquanto micobactérias de crescimento rápido, como *M. smegmatis* e *M. fortuitum*, tem LAMs cobertas de fosfoinositol, sendo conhecidos como PI-LAMs, de massa molecular equivalente a 30 kDa, já o *M. chelonae* possui LAMs que são desprovidos de capa e são denominadas como AraLAMs (Figura 09) (NIGOU *et al.*, 2003).

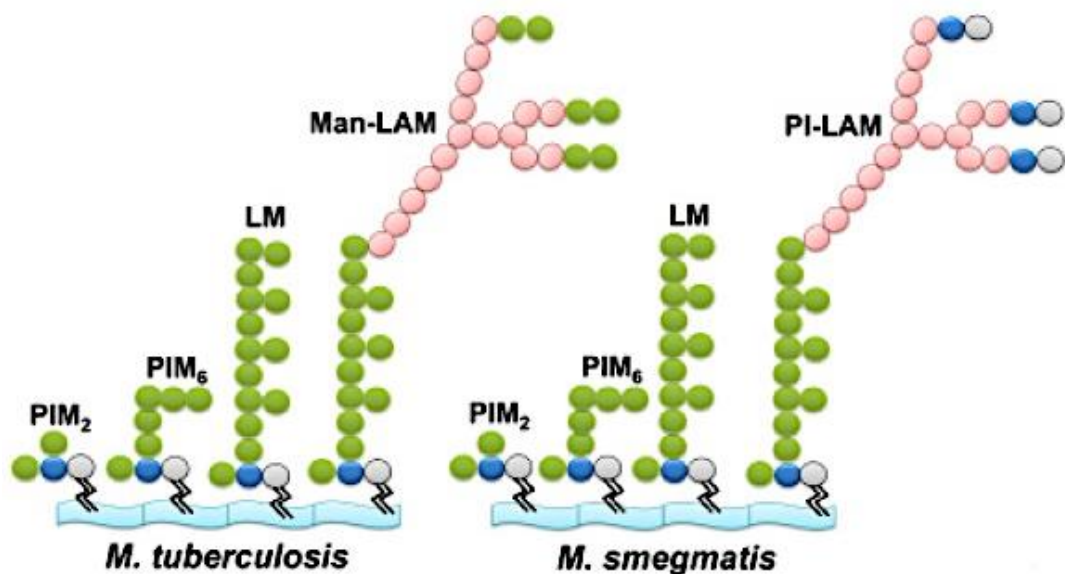


Figura 09. Diferenças estruturais das capas de LAM em *M. tuberculosis* e *M. smegmatis*. O desenho esquemático mostra moléculas de LAM de espécies patogênicas (*M. tuberculosis*), modificadas pela capa terminal de manose (Man-LAM), e de espécies saprofíticas (*M. smegmatis*), modificadas pela capa terminal de fosfoinositol (PI-LAM). São mostradas em verde as moléculas de manose e em azul e branco, as moléculas de fosfoinositol. (Adaptado, MISHRA *et al.*, 2011).

2.4.2. Mecanismos de modulação da via de LM e LAM

O esqueleto de manose das moléculas de LM/LAM é constituído de 21 a 34 resíduos de manose. Existem mecanismos para modular a biossíntese dessas moléculas, dentre eles manosiltransferases e arabinosiltransferases, as principais já descobertas são: PimA, uma manosiltransferase que catalisa a transferência da primeira manose no PI originando o PIM₁, seguida pela ação de PimB' que transfere a segunda manose gerando PIM₂. Nesse ponto a arabinosiltransferase AcilT pode atuar em PIM₂ de duas formas, dando origem direta para AcPIM₂, ou gerando AcPIM₁ que sofre a ação de PimB' e origina AcPIM₂. A partir dessa estrutura a próxima manose é mediada por uma enzima ainda em estudo a PimC?, seguindo o caminho biossintético, a manosiltransferase PimE atua entre AcPIM₄ e AcPIM₆, os glicoconjugados LM e LAM são o próximos constituintes a serem modulados, sofrendo a atuação de manosiltransferases (MSMEG_4241, MSMEG_3120 e MSMEG_4247) e arabinosiltransferases (AftD, AftC e EmbC) (MORITA *et al.*, 2011).

Sena *et al.*, (2010), demonstraram que o alongamento do esqueleto de manose é regulado por uma competição entre as enzimas de alongamento e ramificação (MSMEG_4241 e MSMEG_4247, respectivamente). A hipótese corrente levantada, é que quando a ramificação (adição de α 1,2-manose) ocorre próximo ou no sítio de alongamento (adição de α 1,4-manose) a molécula de LM/LAM não consegue continuar alongando o esqueleto de manose, produzindo prematuramente LMs/LAMs menores que também induzem a diminuição da adição de arabinose (Figura 10 e 11) (SENA *et al.*, 2010; MORITA *et al.*, 2011).

Dentre as moléculas imunoreguladoras das micobactérias, LAM tem sido bem estudada por contribuir para a patogênese do *M. leprae* e *M. tuberculosis*, suprimindo a resposta imune, impedindo a ativação de células T, ativando macrófagos por INF- γ e inibindo proteínas Cinases que são essenciais para a maturação de fagócitos (BRENNAN & KIKAIDO, 1995; CHUA *et al.*, 2004). Como mencionado anteriormente, micobactérias possuem diferentes classes de LAM, porém somente a forma que contém uma capa de manose (ManLAM), presente nas espécies patogênicas, tem sido descrita com atividade imunossupressora por diferentes grupos, participando dos dois pontos principais da patogênese do bacilo:

(1) inibição da fusão do fagossomo e lisossomo e (2) supressão da resposta imune medida por célula após a infecção (FRATTI *et al.*, 2003; HMAMA *et al.*, 2004).

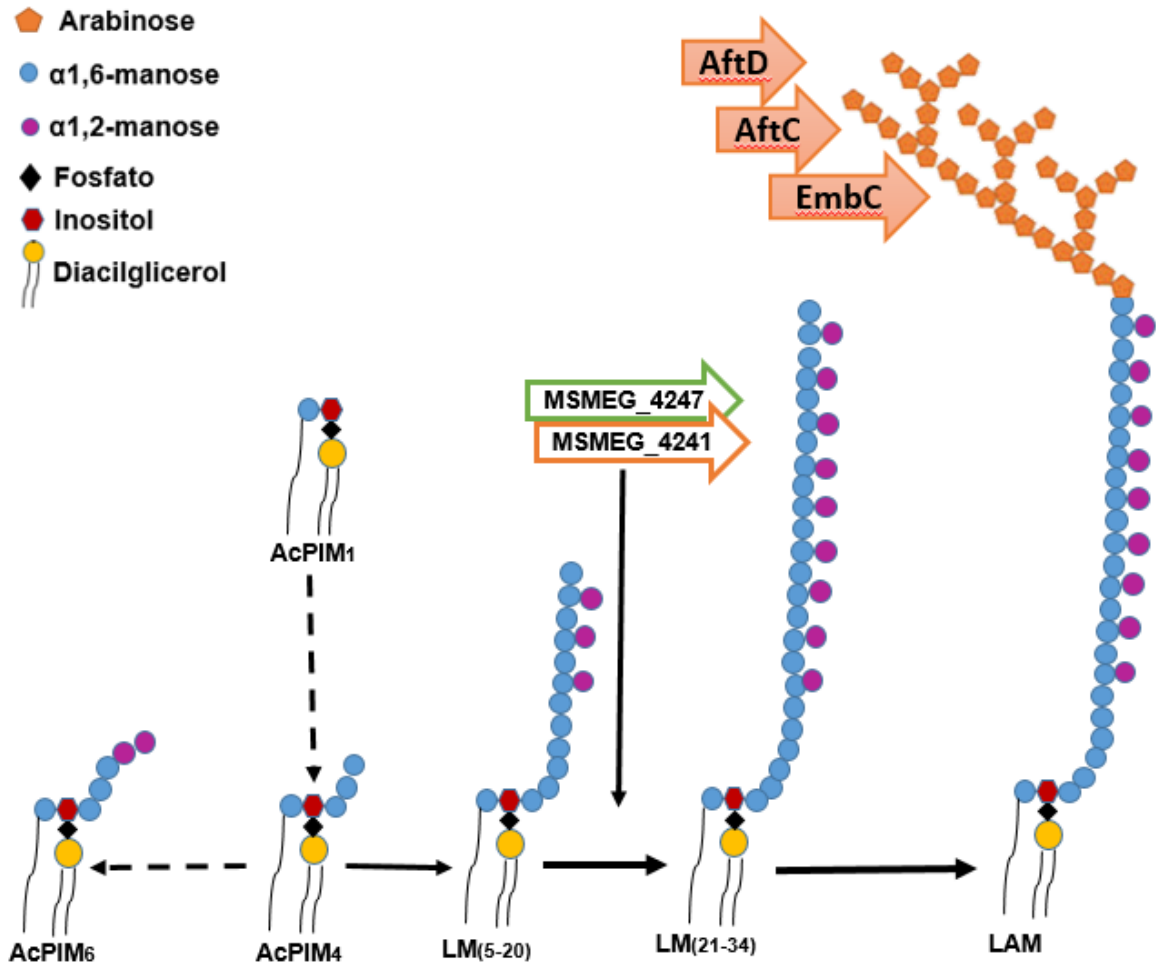


Figura 10. Esquema dos mecanismos de modulação da biossíntese de PIM, LM e LAM. Via de biossíntese de PIMs e LM/LAM tendo AcPIM₄ como ponto de ramificação para a produção de AcPIM₆ ou LM/LAM. Atuação de manosiltransferases de alongamento (MSMEG_4241) e ramificação (MSMEG_4247) para a síntese do esqueleto de manose, que pode ser modificado pela atividade de arabinosiltransferases (AftD, AftC e EmbC), formando LAM. (Adaptado MORITA *et al.*, 2011).

A interação molecular com ManLAM que culmina na imunossupressão da célula hospedeira tem sido atribuída a presença das lectinas DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) em células

dendríticas e receptor de manose em macrófagos (WIELAND *et al.*, 2007). A participação dessas lectinas para o reconhecimento e atividade de ManLAM deixa claro o papel da manose no bloqueio da resposta imune.

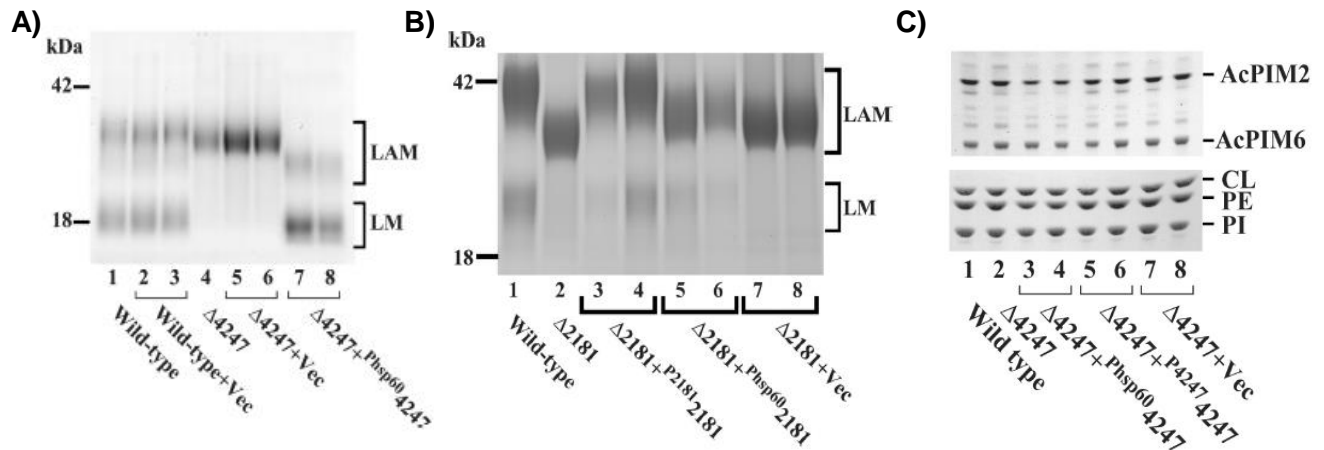


Figura 11: Perfil lipídico e de glicoconjugados de cepas deficientes em manosiltransferases. Conteúdo da parede celular de cepas de *M. smegmatis* (A e C) e *M. tuberculosis* (B) selvagens (*wild-type*) e deficientes em manosiltransferases de ramificação ($\Delta 4247$ ou $\Delta 2181$), demonstram modulações na biossíntese de LM/LAM visualizadas após separação em SDS-PAGE e coloração específica para carboidratos (A e B). PIMs e fosfolípidios sem alterações são visualizados após separação por cromatografia de camada delgada (CCD) e colorações específicas. Nota-se a diferença da migração de LM/LAM (cepas selvagens) em SDS-PAGE entre as cepas saprofítica (PIM-LAM em A) e patogênica (Man-LAM em B), mostrando que Man-LAM possui uma massa molecular maior quando comparada com espécies não patogênicas. CL: cardiolipina, PE: fosfatidiletanolamida e PI: fosfatidilinositol (Sena *et al.*, 2010).

Um trabalho que veio colocar em dúvida o papel da capa de manose (Man-LAM) como indutor de imunossupressão, foi publicado por Appelmelk *et al.*, (2008), utilizando *M. marinum* e *M. bovis* BCG deficientes do homólogo de Rv1635c que codifica uma manosiltransferase responsável pela adição da capa de manose.

Neste trabalho, os autores observaram uma discreta diminuição da captura de bacilos mutantes e também um discreto aumento da fusão de fagossomos pelos bacilos mutantes, porém a perda da capa de manose não induziu diminuição da

sobrevida da bactéria *in vitro* ou *in vivo* no modelo de peixe-zebra (*zebrafish*), assim como não alterou a produção da interleucina imunossupressora IL-10, dentre outras citocinas envolvidas na patogênese da doença, como IFN- γ , IL-12, TNF e IL-6. Os autores justificam seus resultados contraditórios aos da literatura anterior por utilizarem nesse trabalho *Mycobacterium sp.* viável, diferentemente dos demais trabalhos que utilizaram purificados de Man-LAM extraído do bacilo. Com este trabalho, os autores concluem que Man-LAM e PI-LAM diferem mais do que a capa de manose, sugerindo uma modulação secundária dessas moléculas após o início da infecção que não teve como ser observado quando utilizados Man-LAM extraídos diretamente de bacilos cultivados em meio de cultura.

Como o papel de receptores de manose é indispensável na infecção por micobactérias e a capa de manose demonstrou não ser a detentora da atividade biológica de LAM, isso nos encoraja a verificar a possível modulação dessa molécula após o consumo de colesterol como ocorrido durante a infecção da célula hospedeira.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel do colesterol como fonte principal de energia e carboidratos na modulação da síntese de Lipoarabinomanana (LAM) e Lipomanana (LM) em *Mycobacterium smegmatis* como uma possível alternativa de controle da ação imunomoduladora desses glicolipídios.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o perfil de crescimento *in vitro* de *Mycobacterium smegmatis* em meio de cultivo rico (7H9) e pobre (MM) de nutrientes, suplementado com glicerol e/ou colesterol como fonte principal de energia e carbono;
- Avaliar a captação do colesterol pelo acúmulo intracelular após a privação de nutrientes;
- Avaliar possíveis mudanças na biossíntese de PIMs, LM e LAM durante a oferta do colesterol como alternativa nutricional;
- Relacionar o perfil de PIMs, LM e LAM após o consumo de colesterol com possíveis mudanças nas propriedades físico-químicas da parede celular micobacteriana.

4. METODOLOGIA

4.1. CULTIVO E TRATAMENTO DO *Mycobacterium smegmatis*

A cepa de *M. smegmatis* (INCQS 00061, Fundação Nacional de Controle de Qualidade em Saúde - Fundação Oswaldo Cruz) foi cultivada em meio ágar Middlebrook 7H10 ou caldo 7H9, suplementados com 10% DC (Glicose e NaCl) e 0,05% de Tween80. O cultivo inicial foi realizado por um período de três dias em placas de petri contendo meio ágar Middlebrook 7H10, utilizando estufa bacteriológica com temperatura de 37°C. Após o crescimento satisfatório, uma colônia desta placa foi inoculada em um *erlenmeyer* contendo 20 ml de caldo 7H9 para cultivo com agitação contínua a 150 rpm, respeitando as mesmas condições de tempo e temperatura descrita anteriormente.

O padrão de crescimento bacteriano foi acompanhado por espectrofotometria em microplaca de 96 poços, utilizando comprimento de onda de 600 nm. Seguindo protocolo descrito por Griffin *et al.*, (2012), 200 µl da bactéria em cultivo na fase estacionária (volume equivalente a densidade ótica - D.O._{600nm} = 0,05) foi inoculado em um novo *erlenmeyer* para o início do experimento em caldo 7H9 ou Meio Mínimo (MM), suplementado com 0,1% de glicerol ou 0,01% de colesterol diluídos em solução contendo tiloxapol e etanol (1:1, v/v).

O meio 7H9 é composto de (NH₄)₂SO₄ (0,5 g/l), L-glutâmico (0,5 g/l), Na₃C₆H₅O₇ (0,1 g/l), Vitamina B6 (1 mg/l), Biotina (0,5 mg/l), Na₂HPO₄ (0,5 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), C₆H₈O₇.xFe₃⁺,yNH₃ (0,04 g/l), MgSO₄ (0,05 g/l), CaCl₂ (0,5 mg/l), ZnSO₄ (1 mg/l) e CuSO₄ (1 mg/l), enquanto o MM é composto de asparagina (0,5 g/l), KH₂PO₄ (1 g/l), Na₂HPO₄ (2,5 g/l), NH₄Fe(SO₄)₂ · 12H₂O (50 mg/l), MgSO₄.7H₂O (0,5 g/l), CaCl₂ (0,5 g/l), ZnSO₄ (0,1 mg/l).

No presente trabalho, analisamos quatro grupos experimentais divididos conforme as condições de cultivo: (1) 7H9+Glicerol; (2) MM+Glicerol; (3) MM+Glicerol+Colesterol; (4) MM+Colesterol.

4.2. ANÁLISE DO ACÚMULO DE COLESTEROL

Para confirmar o acúmulo de colesterol pelo bacilo, utilizamos o *Filipin* (Sigma), um marcador fluorescente específico para colesterol. Como descrito por

Brzostek *et al.*, (2009), alíquotas de cada amostra correspondentes ao volume de 10 unidades de D.O. ($D.O_{600nm} = 10$), foram centrifugadas a $16.000 \times g$ por 15 minutos. O precipitado celular foi lavado com Tampão Fosfato Salina (PBS) para retirada de colesterol extracelular. As amostras foram fixadas com 3% de paraformaldeído por uma hora e permeabilizadas com 1,5 mg/ml de glicina por 10 minutos. O precipitado celular foi devidamente fixado e permeabilizado foi incubado por 45 minutos com 0,05 mg/ml de Filipin protegido de luz, seguidos de três lavagens com PBS, para retirada do corante extracelular. A fluorescência relativa ao acúmulo de colesterol é quantificada por espectrofluometria (Victor X3, PerkinElmer), com filtro de excitação de 340nm e emissão de 380nm. O experimento foi realizado em triplicata, os dados obtidos para cada meio de cultivo foram gerados estatisticamente no *Microsoft Excel* e *BioEstat 5.0*. As células marcadas com *Filipin* foram visualizadas por microscopia de fluorescência (ZEISS Scope.A1), com filtro de 480 nm.

4.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE LM E LAM

As células obtidas de cada cultura líquida foram coletadas nas fases de crescimento logarítmico (fase *log*) e estacionário, através da análise espectrofotométrica do padrão de crescimento, descrito anteriormente. Para a extração, seguimos o protocolo descrito por Sena *et al.*, (2010). O volume de cada amostra em cultivo foi coletado e transferido para tubos de 15 ml previamente pesados. As amostras foram submetidas a centrifugação (3500 rpm por 15 minutos a 4°C) para obtenção do precipitado de células após descarte do sobrenadante. Os tubos contendo somente o precipitado celular foram pesados novamente, para obtenção do peso equivalente a massa celular, fundamental para o processo de extração que utiliza os volumes de solventes correspondentes ao peso de cada amostra. O precipitado celular, quando necessário, foi mantido em freezer -20°C até a obtenção de todas as amostras.

A primeira fase da extração consistiu na retirada do conteúdo lipídico da parede celular bacteriana, incubando sequencialmente os precipitados celulares por 2 horas em temperatura ambiente com 20 volumes de solução contendo clorofórmio e metanol (2:1; v/v), seguida de 10 volumes de clorofórmio e metanol (2:1; v/v), e por

último 5 volumes de solução contendo clorofórmio, metanol e água (1:2:0,8; v/v/v). Cada extração foi precedida e finalizada com centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos, para obtenção do conteúdo lipídico nos sobrenadantes, que foram utilizados para a obtenção de PIMs, e do precipitado de células que foi utilizado nesse estudo para extração dos glicoconjugados.

O precipitado celular delipidado (sem a camada lipídica) foi resuspenso em 2,5 volumes de solução contendo tampão Tris-EDTA (pH 6,6) saturado com fenol e 2,5 volumes de água destilada para a extração dos glicoconjugados LM e LAM. A extração ocorreu durante um período de 2 horas de incubação em temperatura de 55°C em banho-maria. Terminado o período de extração, o conteúdo foi homogeneizado em *Vortex* e centrifugado (1500 rpm por 2 minutos a temperatura ambiente) para partição do conteúdo protéico (interfase) e de glicoconjugados (fase superior aquosa). O sobrenadante contendo LM/LAM foi transferido para tubos de 1,5 ml e acrescentado 2,5 volumes de clorofórmio para remoção da contaminação por fenol, homogeneizados e centrifugados nas mesmas condições descritas anteriormente.

Desse sobrenadante final, contendo os glicoconjugados, foram utilizados 15 µl de cada amostra, misturadas com 5 µl de tampão de amostra (Tris-HCl pH 6,8; Glicerol; azul de bromofenol; 2-mercaptoetanol, 4x concentrado) que foram utilizados no Dodecil Sulfato de Sódio – Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE). Depois foram transferidos para novos tubos e condicionados a 4°C até a análise de LM/LAM. As amostras em tampão e 10 µl do padrão de massa molecular (Full-Range Rainbow Molecular Weight, Amersham RPN800) foram aquecidas em banho-seco por três minutos a 100°C para então serem separadas por eletroforese (100 V, 25 mA por 1 hora e trinta minutos) utilizando gel de SDS-PAGE com 15% de acrilamida.

Após a separação das amostras, o gel foi submetido a coloração específica para carboidratos seguindo o protocolo adaptado de Moller & Poulsen (2002), seguindo as respectivas etapas com contínua agitação:

- a) Fixação: 12,5% de ácido tricloracético (TCA) por 30 minutos, seguido por uma lavagem rápida com água destilada.
- b) Sensibilização: 1% de ácido periódico por 50 minutos, seguido de 6 lavagens com água destilada (10 minutos cada lavagem).

- c) Coloração: solução de fucsina sulfito por 50 minutos, seguido de três lavagens com solução de 0,5% de metabisulfito de potássio.
- d) Visualização: retirada do excesso de corante com lavagens frequentes do gel com água destilada, seguida de digitalização da imagem corada utilizando *scanner* convencional.

Após a digitalização do gel devidamente corado, o conteúdo de cada amostra separado por eletroforese foi analisada por densitometria utilizando o programa *Image-J*.

4.4. PURIFICAÇÃO DE PIMS E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

Para a purificação de PIMs foi utilizada a fração de lipídios obtida durante a delipidação do bacilo (fração de clorofórmio : metanol : água), conforme descrito por Sena *et al.*, (2010). Alíquotas de 1200 µl de cada amostra foram secas em corrente de gás nitrogênio (N₂) a 70°C e os lipídios foram purificados por partição bifásica usando solução de 1-butanol : água (2:1, v/v). Após a partição, a fase final de 1-butanol foi concentrada por centrifugação a vácuo e o conteúdo restituído em 40 µl de 1-butanol : água (2:1, v/v) para então ser aplicado em folhas de alumínio revestidas com sílica gel-60 para CCD utilizando como fase líquida a solução de clorofórmio : metanol : amônia (13M) : acetato de amônia (1M) : água (180:140:9:9:23, v/v/v/v/v). Por fim, PIMs foram visualizados usando solução de Orcinol em ácido sulfúrico que foi borrifado em toda a extensão da placa.

4.5. ANÁLISE DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

O método consiste na capacidade que micobactérias possuem de reter o corante fucsina básica (de coloração vermelha), mesmo após ser submetido a descoloração por solução a base álcool e ácido. A retenção do corante é decorrente da alta concentração de ácido micólico na parede celular do bacilo, e foi usado na

pesquisa para avaliar as propriedades físico-químicas da parede celular micobacteriana (Shoub, 1923).

Seguindo o protocolo descrito por Shoub (1923), com pequenas modificações, uma alíquota de 50µl de cada cultura foi seca na superfície de lâminas de vidro para microscopia de luz e então sensibilizadas com solução de fucsina aquecida em chama para induzir a incorporação do corante por 5 minutos. Após este período a solução de fucsina foi removida da superfície das lâminas e as células foram submetidas a descoloração pela adição de gotas da solução de álcool-ácido. Após a descoloração, as amostras foram sensibilizadas com azul de metileno por 30 segundos, para uma coloração diferencial, a obtida por micobactérias. As amostras devidamente coradas foram visualizadas em microscopia de luz, utilizando lente de imersão (aumento de 100X).

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando necessário, os dados foram expressos em média e desvio padrão das triplicatas usando o programa *Microsoft Excel (2007)*. Para análise estatística utilizou-se o programa *BioEstat 5.0*, verificando a análise de variância ANOVA, seguido do teste de *Tukey*. Todos os testes estatísticos consideraram probabilidade (p-valor) significativa quando $\leq 0,05$. E para visualização gráfica dos dados obtidos da massa molecular dos glicoconjugados utilizamos o programa *ImageJ*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE CRESCIMENTO DE *M. smegmatis* EM FONTES DEFINIDAS DE CARBONO

Como demonstrado no gráfico 1, a análise da curva de crescimento em 7H9 apresentou o padrão característico para o bacilo, observando-se uma fase inicial sem crescimento (fase *lag*) durante as primeiras horas de cultivo, seguida de um crescimento exponencial (fase *log*) até completar o primeiro dia de cultivo, atingindo o crescimento estacionário inicial após 28 horas e finalmente a real fase estacionária somente após 48 horas de cultivo (D.O._{600nm}: 0,8 – 1,0), permanecendo sem grandes alterações ao longo dos dias restantes de análise (total de 5 dias).

Nos demais grupos, a escassez nutricional induzida pelo cultivo em Meio Mínimo (MM) pobre em nutrientes, observamos a ausência das fases *lag* e *log*, quando comparadas com o cultivo em condições ótimas de crescimento (grupo 7H9 suplementado com glicerol). Estes grupos também apresentaram crescimento moderado, sendo que somente aqueles suplementados com glicerol (MM+Gli e MM+Gli+Col) atingiram crescimento na fase estacionária a níveis compatíveis aos observados no grupo 7H9+Gli, diferentemente do grupo cultivado em MM suplementado com colesterol (MM+Col), que apresentou fase estacionária com densidade de bacilos bastante reduzida (D.O._{600nm}: 0,17 – 0,19). O moderado crescimento pelo cultivo em MM induziu os grupos suplementados com glicerol a atingirem a fase estacionária somente após o terceiro dia de cultivo, enquanto que o grupo MM+Col atingiu sua fase estacionária comprometida em período semelhante ao obtido pelo grupo 7H9.

Estes dados mostram que a suplementação do MM com glicerol, estando sozinho ou em conjunto com colesterol, foi suficiente para disponibilizar condições nutricionais suficientes para atingir padrões de crescimento semelhante aos obtidos em cultivo 7H9, porém com velocidade de crescimento comprometida.

Dessa forma, ficam evidentes os efeitos da carência nutricional e da ausência do glicerol, como fonte preferencial de energia e carbono pelo *M. smegmatis*, que é forçado a adaptar-se às novas condições nutricionais para permanecer viável nesse ambiente, tendo apenas o colesterol como fonte principal de carbono e energia.

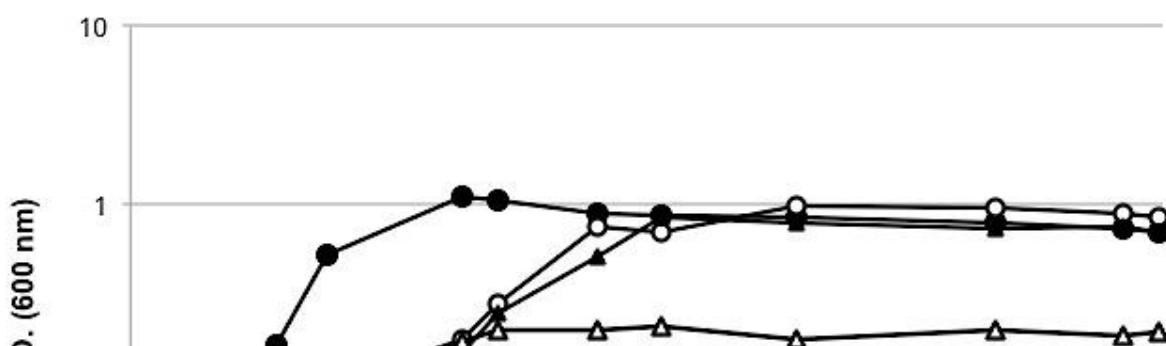


Gráfico 1. Curva de crescimento do *M. smegmatis* em meio rico e pobre de nutriente. As bactérias foram cultivadas em meio líquido rico e pobre de nutrientes (7H9 e MM, respectivamente), suplementado com glicerol(Gli) e/ou colesterol(Col) como indicado. O crescimento bacteriano foi acompanhado pela densidade ótica em espectrofotômetro (D.O._{600nm}) durante 144 horas de cultivo.

O cultivo do *M. smegmatis* em meio MM suplementado somente com colesterol (MM+Col), remonta de forma experimental condições adversas semelhantes às encontradas pelos bacilos micobacterianos durante a fagocitose pelos macrófagos alveolares na TB, como proposto por Pandey & Sasseti (2008). O ambiente inóspito dos macrófagos é também depósito lipídico oriundos do hospedeiro, em especial o colesterol, que foi escolhido nesse trabalho como fonte nutricional alternativa para o micobactério obter energia e carbono suficiente para manter a sua integridade.

O sistema de importação de colesterol é bem descrito na literatura, e um dos principais genes dessa maquinaria de transporte é o *mce4*, que possibilita a captação de nutrientes provenientes da célula hospedeira durante a infecção pelo *M. tuberculosis*, relacionando sua função diretamente com a evolução da doença para o estágio crônico (PANDEY & SASSETTI, 2008). Dessa forma, nota-se com os dados apresentados na curva de crescimento, a provável ação gerada pelo consumo do colesterol na célula hospedeira, que pode influenciar nas etapas posteriores à endocitose, como a proliferação intracelular do bacilo em sua célula hospedeira.

Em 1956, Bloch H., afirmava que o *M. tuberculosis* isolado dentro de um granuloma pode persistir por décadas, e que o sucesso desse agente patogênico é atribuível, pelo menos em parte, a capacidade da bactéria utilizar os nutrientes derivados do hospedeiro disponíveis durante todas as fases da infecção. Dentre estes derivados, o colesterol é um forte candidato a induzir mudanças fundamentais no metabolismo do bacilo, necessárias para a persistência da infecção.

5.2. ACÚMULO DE COLESTEROL POR *Mycobacterium smegmatis*

Buscando confirmar a captação de colesterol pelo *M. smegmatis*, a quantificação espectrofluorimétrica (Gráfico 2) e microscopia de fluorescência (Figura 12) de células marcadas com *Filipin* nos mostraram que somente o grupo MM+Col apresentou acúmulo significativo de colesterol, quando comparados com os demais grupos que foram suplementados com glicerol. Desta forma, foi comprovada a capacidade do bacilo de acumular colesterol na ausência de outras fontes de nutrientes, como por exemplo, o glicerol, sugerindo mudanças fisiológicas necessárias para o bacilo se adaptar a um ambiente hostil para manter a sua sobrevivência e proliferação.

Supomos que não conseguimos evidenciar o acúmulo de colesterol por espectrofluorimetria no grupo contendo MM+Gli+Col, em decorrência do glicerol ainda poder manter níveis metabólicos suficientes que não possam induzir a utilização do colesterol pelo bacilo, diferentemente do grupo MM+Col, que visivelmente possui um metabolismo bem comprometido pela carência nutricional, suplementada somente por colesterol.

A comprovação do acúmulo de colesterol por micobactérias nos confirma a problemática envolvida na complexa relação existente entre o bacilo e suas células hospedeiras: o metabolismo. Como mostrado por Griffin *et al.*, (2012), vias bioquímicas utilizadas durante o crescimento do bacilo em meio rico em colesterol, promoveu alterações na produção de diversos metabólitos primários, com predomínio de Propionil-CoA que participa do Ciclo do Metilcitrato. Ainda foram identificados 29 metabólitos acumulados em meio líquido de cultura rico em colesterol. Dentre estes metabólitos podemos citar componentes participantes do Ciclo do Metilcitrato (Succinato, Malato e 2-Metilcitrato), açúcares e derivados

(Manose, Manose-1-fosfato e Trealose 6-fosfato), caracterizando a via de gliconeogênese para obtenção de energia a partir do colesterol. Em um ambiente que mimetiza as condições intracelulares na célula hospedeira.

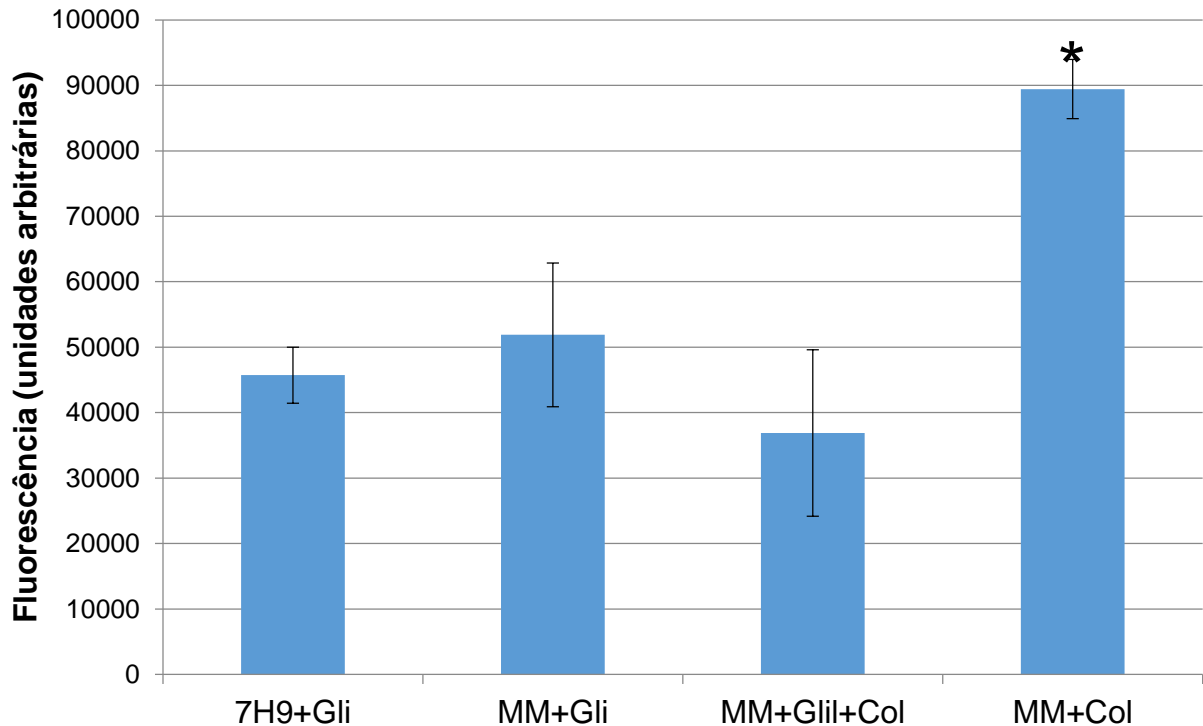


Gráfico 2. Acúmulo de colesterol pelo *M. smegmatis* durante o crescimento em diferentes fontes definidas de carbono. As células em crescimento na fase estacionária foram marcadas com *Filipin* e a intensidade de marcação, diretamente proporcional ao acúmulo de colesterol, foi quantificada por espectrofluorimetria, usando filtro de excitação de 340nm e emissão de 380nm. Os valores foram expressos em média e desvio padrão com significância estatística (*) $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (ANOVA-Teste de *Tukey*).

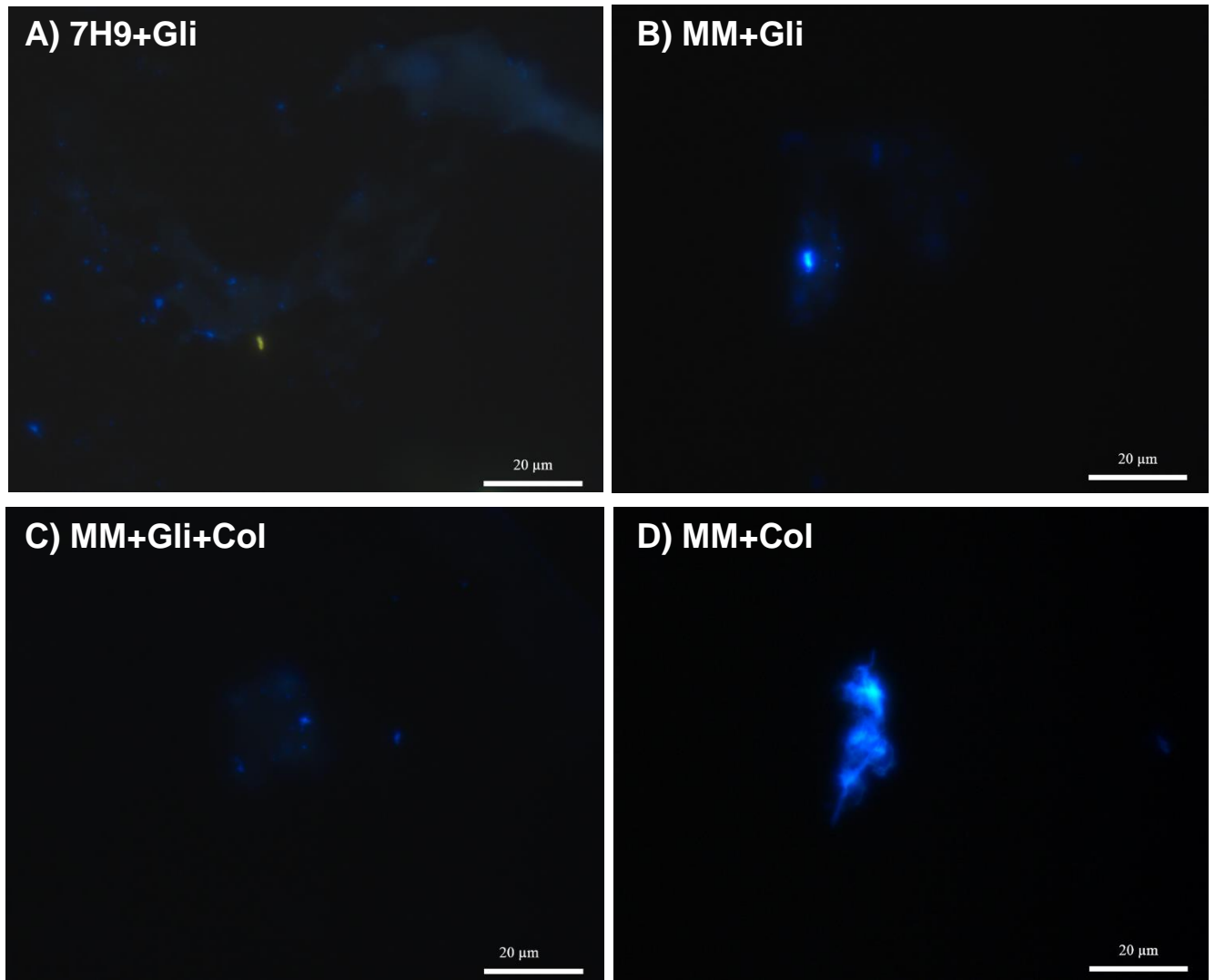


Figura 12. Análise do acúmulo de colesterol pelo *M. smegmatis*. As células em crescimento na fase estacionária foram marcadas com *Filipin* e visualizadas por microscópio de fluorescência usando filtro de 480 nm. A) 7H9+Gli, B) MM suplementado com Glicerol (MM+Gli), C) MM suplementado com glicerol e colesterol (MM+Glicerol+Colesterol), D) MM suplementado somente colesterol (MM+Col). Barra de 20 µm.

A obtenção de energia pelo *M. tuberculosis* é composta de várias etapas. Os produtos derivados da β -oxidação de ácidos graxos são as unidades de acetil-CoA

primeiramente assimiladas no ciclo do glioxilato, porém o produto adicional derivado da β -oxidação de cadeias laterais, o propionil-CoA, passa por mais uma etapa metabólica, o ciclo do metilcitrato (CMC), que promove a oxidação do propionil-CoA em piruvato (HORSWILL & ESCALANTE-SEMERENA, 1999; TEXTOR, 1997).

A elucidação do catabolismo e as enzimas que catalisam os metabólitos derivados do colesterol ainda não foram totalmente compreendidas. Já é conhecido, que o *M. tuberculosis* importa e metaboliza o colesterol do hospedeiro durante a infecção, capacitando o bacilo para a fase crônica da TB, porém existem lacunas a serem resolvidas como o *operon* de crescimento intracelular (*IGR*), o *operon igr* codifica as enzimas que catalisam as três etapas finais da degradação da cadeia lateral do colesterol (THOMAS *et al.*, 2011).

Uma breve investigação sobre trabalhos relacionados a esse contexto nos revela a importância dos nossos resultados para melhor esclarecer questões complexas do uso do colesterol. Mediante a diferença do substrato fornecido para a bactéria, conseguimos detectar diferenças significativas, que vem para reforçar a busca por novas teorias relacionadas a adaptação do bacilo. Dessa forma, quando o nutriente torna-se escasso, o colesterol passa a ser a fonte de carbono e energia, promovendo por um longo período a sobrevivência do bacilo que modifica seu padrão metabólico podendo alterar não somente o fluxo de carbono na bactéria, mas também de outros componentes interdependentes, como açúcares (ex: manose) extremamente importantes para a biossíntese de constituintes da complexa parede celular.

5.3. PERFIS DE LM/LAM E PIMs EM DIFERENTES FONTES DE NUTRIENTE E CARBONO

Como mostrado na figura 13, os resultados obtidos com a cromatografia de camada delgada (CCD) para PIMs revelaram que as mudanças nutricionais específicas de cada grupo estudado não apresentaram alterações no acúmulo dessas moléculas durante o período de crescimento que seria representativo da fase *log* (figura 13 A), mostrando perfis de marcações similares entre os grupos com diferentes fontes nutricionais estudadas. Também notamos que as moléculas de AcPIM₂ e AcPIM₆, mais abundantes na parede celular, continuam sendo de fácil

identificação, sem mudanças significativas entre os grupos que possuíam o glicerol e/ou colesterol como suplemento.

Por outro lado, nota-se uma reduzida marcação em PIMs durante a fase estacionária de crescimento quando o bacilo é cultivado em MM suplementado somente com colesterol (grupo MM+Col, Figura 13 B). Estes dados sugerem que nessas condições de escassez nutricional o *M. smegmatis*, diferentemente dos demais grupos que obtiveram o glicerol durante o cultivo, apresenta deficiência para acumular PIMs em sua parede celular.

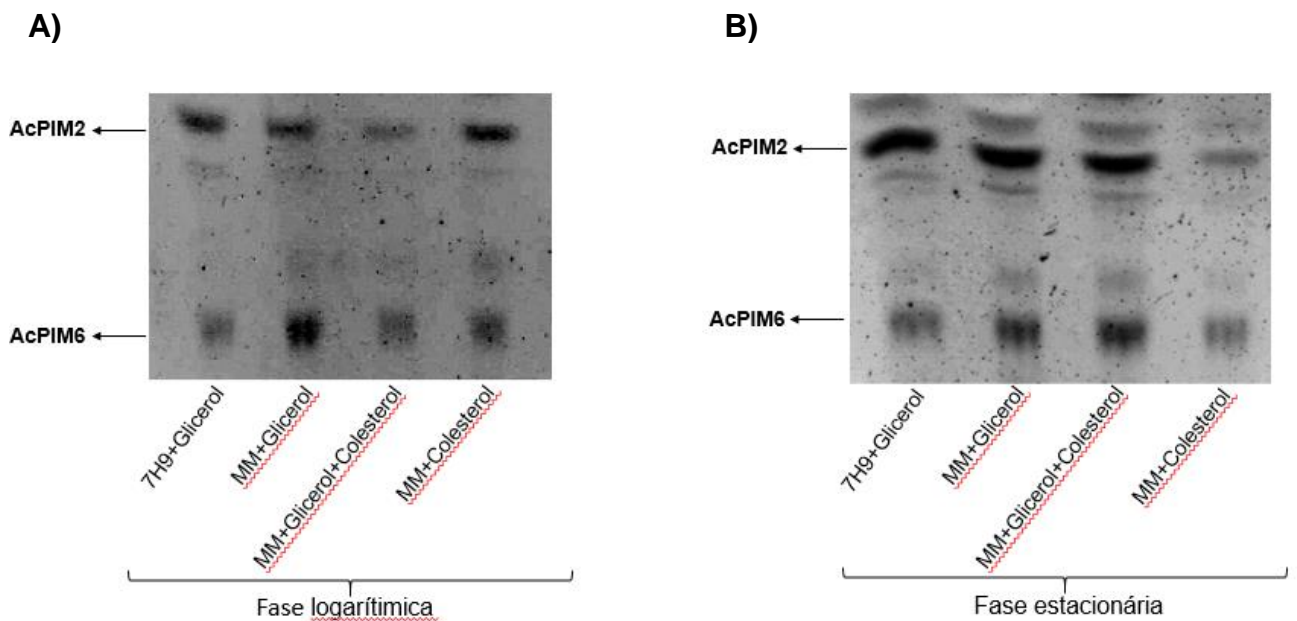


Figura 13. Perfil de PIMs em *Mycobacterium smegmatis*. Frações lipídicas de cada grupo experimental, oriundas do cultivo na fase de crescimento *log* (A) e fase estacionária (B), foram purificadas da parede celular, e separadas por CCD. O acúmulo de PIMs (AcPIM₂ e AcPIM₆) foi visualizado após reação específica para açúcares, utilizando solução de orcinol.

PIMs são precursores da via de biossíntese dos glicoconjugados LM e LAM. Morita *et al.*, (2006), ao estudar cepas de *M. smegmatis* deficientes na biossíntese de PIMs de grande ordem (PIM₅ – PIM₆), mostrou que estas moléculas possuem um papel na integridade da membrana celular e na regulação da septação e divisão celular, porém sem alterações na biossíntese de LM/LAM, que dependem do acúmulo de PIM₄. Este trabalho mostrou claramente a importância dessas estruturas para a complexa parede celular micobacteriana.

Com a separação por SDS-PAGE dos glicoconjugados da parede celular, como observado na figura 13 A) e B), as amostras estudadas no presente trabalho apresentaram um curioso perfil de LM e LAM. Surpreendentemente, observamos padrões de migrações distintos principalmente para a molécula de LAM. Nos grupos contendo colesterol (MM+Gli+Col e MM+Col), tanto na fase *log* quanto na estacionária, o padrão de migração de LAM foi representativo de uma molécula maior, conferindo uma massa molecular semelhante ao observado em cepas patogênicas (30 – 50 kDa), quando comparado com os demais grupos sem colesterol (25 – 30 kDa). Outro ponto observado foi que esta mudança na biossíntese de LAM em *M. smegmatis* independe da presença do glicerol em meio MM. Isso sugere que, independente do acúmulo de colesterol visualizado anteriormente no grupo contendo somente este lipídio (Gráfico 2 e figura 12), o *M. smegmatis* parece conseguir capturar e catabolizar o colesterol fornecido pelo meio de cultura pobre em nutrientes, porém mudanças significativas na parede celular surgem somente durante a fase estacionária de crescimento.

Buscando melhorar a interpretação da variação do padrão de migração das moléculas de LM/LAM em eletroforese, realizamos a densitometria do caminho percorrido por cada amostra no gel de SDS-PAGE (Figura 15). Dessa forma podemos confirmar com clareza que na fase *log* de crescimento somente o grupo cultivado em MM suplementado com glicerol e colesterol (MM+Gli+Col) apresentou marcação de LAM correspondendo a proteínas de massa molecular que variam entre 30 e 50 KDa, quando comparadas com o grupo controle (7H9) (Figura 15 A). Mudanças no padrão de migração de LAM durante a fase estacionária de crescimento também foram confirmadas pela densitometria nas amostras cultivadas em MM suplementadas somente colesterol (MM+Col), que também passaram a apresentar moléculas de massa molecular entre 30 - 50 KDa (Figura 15 B).

Como mostrado por Sena *et al.*, (2010), a atividade de manosiltransferases altera a biossíntese de LAM, modificando seu esqueleto de manose e arabinose. Assim, podemos sugerir que a utilização de fontes alternativas de carbono e energia cultivados em MM possibilitou modificações fisiológicas significativas na parede celular do bacilo, e desta forma, influenciou as vias de biossíntese dos glicoconjugados, que por sua vez podem estar diretamente ligados com a sobrevivência do bacilo no hospedeiro, demonstrado em fases distintas do crescimento micobacteriano.

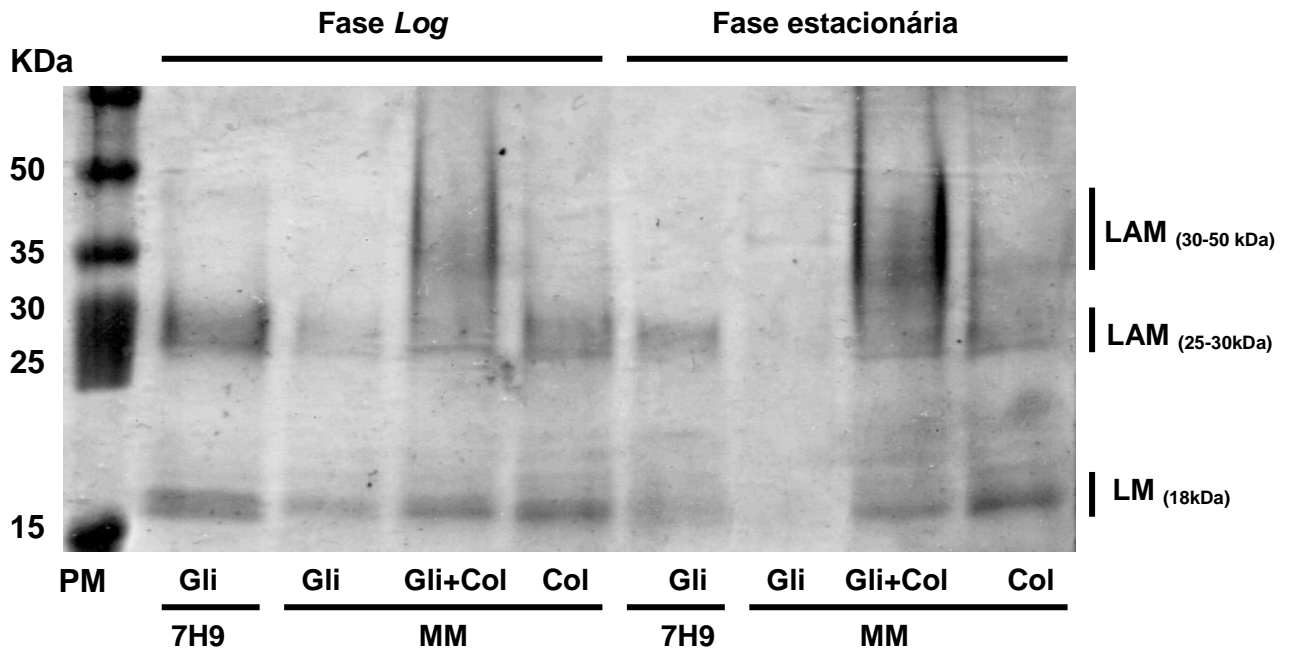


Figura 14. Perfil de LAM e LM de *M. smegmatis* após consumo de diferentes fontes nutricionais. As moléculas de LAM e LM foram extraídas durante a fase *log* e fase estacionária de crescimento, separadas em SDS-PAGE, e submetidas a coloração para glicoconjugados: (PM) padrão de massa molecular; (7H9) meio com condições ótimas para o crescimento bacteriano; (MM) meio mínimo pobre em nutriente; suplementados com glicerol (Gli) ou colesterol (Col).

A fase estacionária, caracterizada pelo número elevado de bacilos com reduzido crescimento, em condições de consumo do colesterol como única fonte nutricional, pode ser associada ao período crônico da TB, onde a bactéria encontra-se superpopulosa no interior dos granulomas que podem eclodir liberando bacilos viáveis para iniciar um novo ciclo de infecção em outro hospedeiro.

A progressão da doença para uma forma de tuberculose ativa pode ser caracterizada como uma falha na contenção do bacilo que manipula a resposta do hospedeiro localmente, causando a indução dos danos necessários para fornecer o colesterol como alternativa de nutriente e assim completar o ciclo de disseminação.

A)

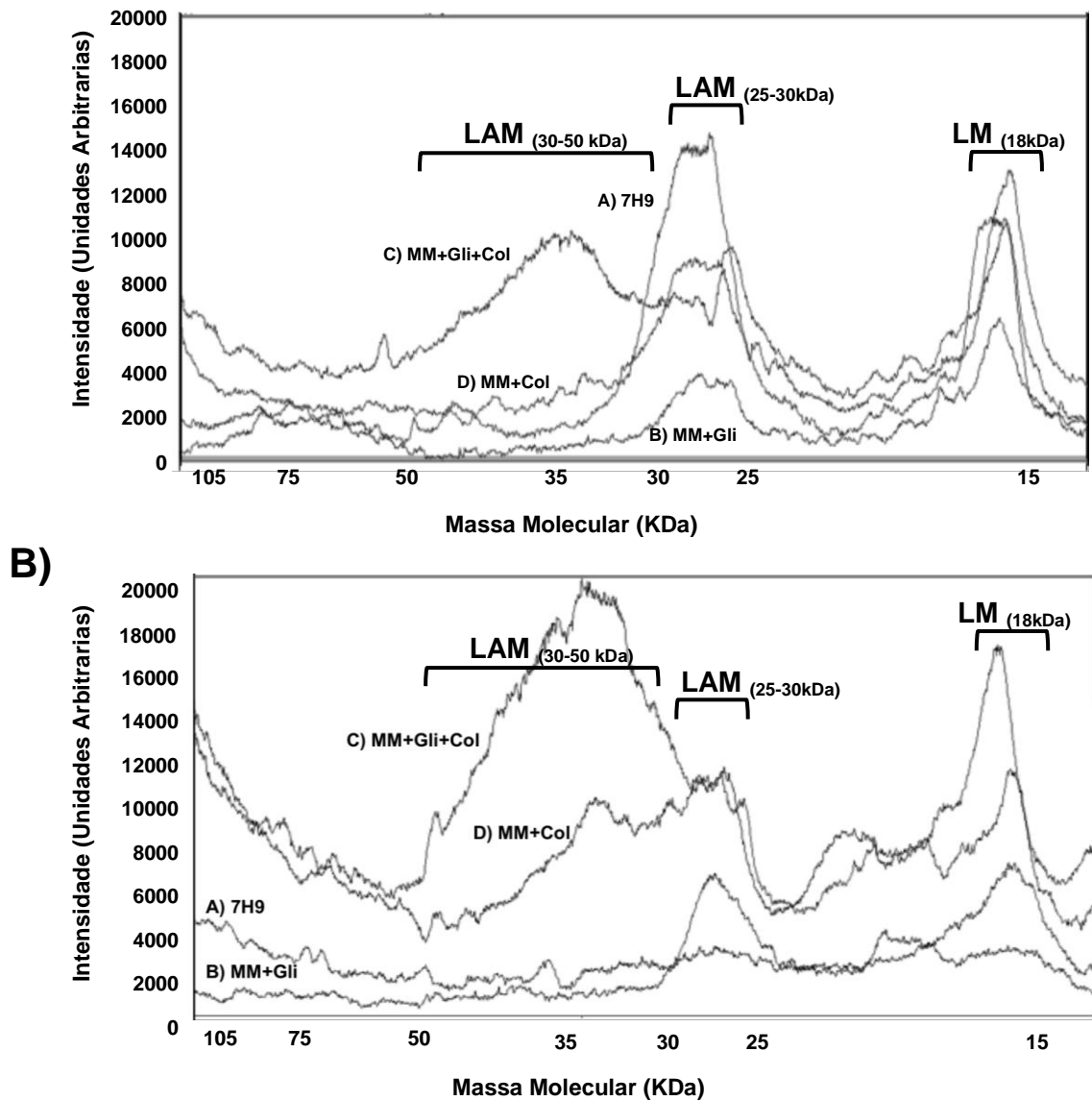


Figura 15. Densitometria do perfil de migração de LM/LAM em gel de SDS-PAGE. A intensidade das marcações provenientes do gel de SDS-PAGE da figura 13 foram avaliadas por densitometria utilizando o programa *ImageJ*. Os valores de massa molecular (abscissa) foram determinados conforme densitometria do padrão de massa molecular correspondente a área analisada de cada amostra (7H9, MM+Gli, MM+Gli+Col, e MM+Col). A intensidade de marcação de cada amostra na fase *log* (A) e estacionária (B) foi quantificada em unidades arbitrárias (ordenada).

Nossos dados demonstram que a modificação do principal substrato para obtenção de energia e carbono está associada com a regulação da síntese de

LM/LAM, como evidenciado pela mudança do perfil de migração de LAM, que variou de tamanho de acordo com a disponibilidade de carboidratos no meio de cultura líquido.

Este dado nos encoraja a verificar alguma modulação da atividade desses componentes bioativos perante condições adversas de nutrientes, como possivelmente deve ocorrer durante a infecção, em condições adversas de nutrientes, onde o bacilo necessitará se adaptar a um novo ambiente com condições hostis à sua sobrevivência.

Dados da literatura atual demonstram a variação das moléculas de LM e LAM através da manipulação genética, visando estudar melhor a atuação bioquímica no contexto celular entre o bacilo e o hospedeiro (HE *et al.*, 2015). Aqui nós reforçamos a ideia dessa interação relacionada diretamente com a fonte nutricional mediante ao ambiente adverso, que assim modifica o perfil dos gliconjugados tornando-os ferramentas potentes para a modulação do sistema imune do hospedeiro.

As funções de LM/LAM no contexto da integridade da parede celular não estão totalmente esclarecidas, e estamos apenas começando a entender como essas moléculas contribuem para todo o processo de montagem da parede celular e interações patógeno-hospedeiro. É fundamental a compreensão do organismo a nível molecular, possibilitando o entendimento da patogênese das micobactérias. Assim esforços futuros são necessários para a melhor compreensão desse metabolismo fascinante.

5.4 AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO DE ZIEHL-NEELSEN

A resistência a descoloração por soluções ácidas é uma característica marcante do gênero *Mycobacterium*. Nos nossos grupos de estudos em fontes rica e pobre em nutrientes foi realizada a coloração de Ziehl-Neelsen que confere essa característica ao bacilo.

Como demonstrado na figura 16, todos os grupos analisados conseguiram manter a integridade da parede celular após descoloração por álcool e ácido, preservando a característica do bacilo de ser considerado álcool-ácido resistente.

Nosso grupo controle, 7H9 suplementado com glicerol (7H9+Gli, rico em nutrientes), manteve os padrões de morfologia característicos do bacilo, apresentando-se álcool-ácido resistente, com tamanho e forma característico da espécie (Figura 16 A). Por outro lado, os grupos que foram cultivados em MM (Figura 16 B – D) apresentaram mudanças significativas na morfologia e associação das bactérias, demonstrando bacilos com variação em tamanho e formando aglomerados mais compactos, quando comparados ao grupo controle 7H9+Gli.

O cultivo em MM suplementado com glicerol, somente (MM+Gli, Figura 16 B) ou acompanhado de colesterol (MM+Gli+Col, Figura 16 C), apresentou bacilos menores, diferentemente do grupo suplementado somente com colesterol (MM+Col, Figura 16 D), que demonstrou estruturas pleomórficas, ou seja com tamanho e forma diferentes, porém com compactação mais acentuada daquelas cultivadas em MM suplementado com glicerol e/ou colesterol, e grupo controle em 7H9.

Esses dados colaboram com os resultados anteriores, mostrando que as diferenças nutricionais estão alterando a fisiologia do micobactério (GRIFFIN *et al.*, 2012). Os dados atuais da literatura científica mostram diferenças significativas da morfologia dessa bactéria após modificações genótípicas, envolvidas no ambiente nutricional do bacilo, decorrentes de uma tentativa de se adaptar fisiologicamente ao novo padrão nutricional (FUKUDA *et al.*, 2013).

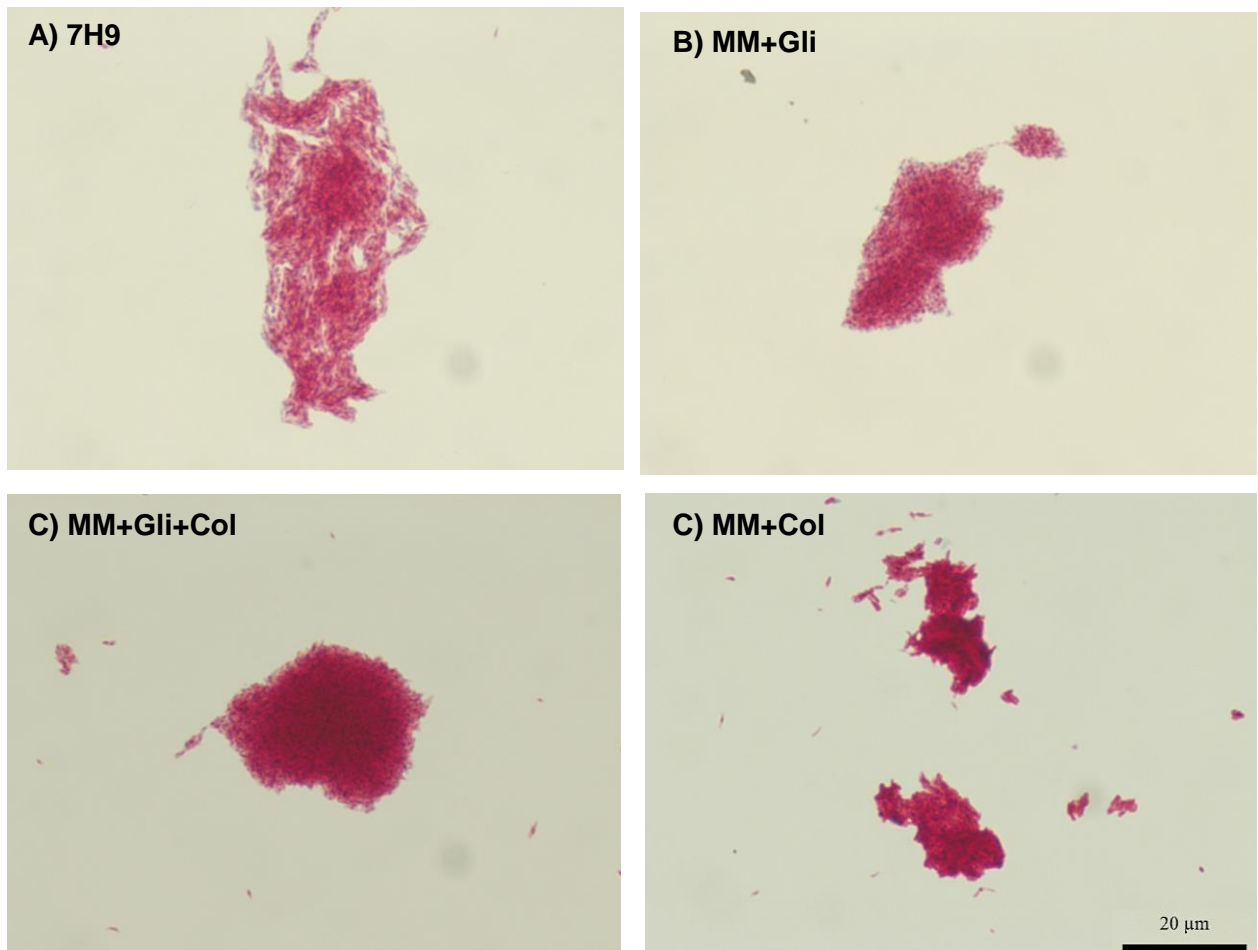


Figura 16. Análise das características físico-químicas pela coloração de Ziehl-Neelsen. Os bacilos em crescimento na fase estacionária foram corados pelo método de Ziehl-Neelsen, demonstrando a característica físico-química da parede celular de cada grupo de estudo: A) 7H9+Gli, B) MM+Gli, C) MM+Gli+Col e D) MM+Col. Barra de 20 μm.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, verificamos que o *M. smegmatis*, mesmo sendo saprofítico, consegue acumular e catabolizar colesterol *in vitro*, quando este passa a ser a principal fonte para obter energia e carbono, como ocorre no interior de macrófagos infectados por espécies patogênicas. O acúmulo de colesterol favoreceu mudanças estruturais nas moléculas de LAM, tornando-se aparentemente mais longa, correspondendo ao peso molecular sintetizado em bactérias patogênicas. Estes dados sugerem como o consumo de colesterol ocorre em condições de escassez de nutriente no interior de células infectadas. A resistência a descoloração por soluções ácidas, característica marcante do gênero *Mycobacterium* foi mantida em todos os grupos, porém a fisiologia do bacilo foi alterada nos grupos com o meio Mínimo(MM), pobre em nutrientes, com alterações morfológicas evidentes.

7. REFERÊNCIAS

ALLEN B.W. *Mycobacteria: General Culture Methodology and Safety Considerations*. Parish T & Stoker NG. *Methods in Molecular Biology: Mycobacteria Protocols*. Humana Press, 2010.

APPELMELK B.J., DEN DUNNEN J., DRIESSEN N.N., UMMELS R., PAK M., et al. The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the *Mycobacterium*–host interaction. **Cellular Microbiology** 10: 930–944, 2008.

BEDARD, K., KRAUSE, K.H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiol Rev** 87 : 245 – 313, 2007.

BLOCH, H., SEGAL, W. Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown in vivo and *in vitro*. **J. Bacteriol.** 72, 132–141, 1956.

BRENNAN P. J., NIKAIDO H. The Envelope of *Mycobacteria*. **Annual Review of Biochemistry**, Vol. 64: 29 -63, June 1995.

BRENNAN, P. J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis** (Edinburgh) 83:91–97, 2003.

BRENNER, J.D., KRIEG, R.N, STALEY, T.J. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The proteobacteria: introductory essays**, v.2. 2ed. New York, Springer, 2005.

BROSCH R, GORDON SV, MARMIESSE M, BRODIN P, BUCHRIESER C, et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci U S A** 99: 3684–3689, 2002.

BRZOSTEK A., PAWELCZYK J., RUMIJOWSKA-GALEWICZ A., DZIADEK B., DZIADEK J. *Mycobacterium tuberculosis* Is Able To Accumulate and Utilize Cholesterol. **Journal of Bacteriology**, 191 (21): 6584–6591, 2009.

BUTLER W. R., GUTHERTZ L. S. Mycolic Acid Analysis by High-Performance Liquid Chromatography for Identification of *Mycobacterium* Species **Clin. Microbiol. Rev.** October, vol. 14 no. 4 704-726, 2001.

CALMETTE A., BOQUET A., NEGRE L. Contribution a` l'e´tude du bacilletuberculeux bilie´. **Ann Inst Pasteur**; 35: 561–570, 1921.

CHUA J; VERNE I; MASTER S; DERETIC V. A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. **Current Opinion in Microbiology**, 7: 71 – 77, 2004.

COLLINS, C.H.; GRANGE, J.M.; YATES, M.D. Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice. **Butter Worth-Heinemann, Oxford, 2nd edition**. 139 p, 1997.

DANNENBERG A.M. JR. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. **Immunobiology**, 191(4-5): 461-473, 1994.

DHILLON J., DICKINSON J.M., SOLE K., MITCHISON D.A. Preventive Chemotherapy of Tuberculosis in Cornell Model Mice with Combinations of Rifampin, Isoniazid, and Pyrazinamide. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 40 (3): 552–555, 1996.

EUZÉBY, J.P. **List of bacterial names with standing in nomenclature**. Disponível em: (<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.htm>) Acesso em 23 mar 2014.

FINE P.E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. **Lancet**; 346: 1339–1345, 1995.

FRATTI RA, CHUA J, VERGNE I, DERETIC V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2003.

FUKUDA T., *et al.* Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of Mycobacteria and Pathogenesis of Tuberculosis. **mBio**, 4(1):e00472-12. doi:10.1128/mBio.00472-12, 2013.

GALKINA E., LEY K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. **Annu Rev Immunol**, 27:165–97, 2009.

GEIZE R.V., YAM K., HEUSER T., WILBRINK M.H., HARA H., ANDERTON M.C., SIM E., DIJKHUIZEN L., DAVIES J.E., MOHN W.W., ELTIS L.D. A gene cluster encoding cholesterol catabolism in a soil actinomycete provides insight into *Mycobacterium tuberculosis* survival in macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104(6): 1947–1952, 2007.

GENGENBACHER M., KAUFMANN S. H. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiol. Rev.** 36:514–532, 2012.

GRIFFIN J.E., PANDEY A.K., GILMORE S.A., MIZRAHI V., MCKINNEY J.D., BERTOZZI C.R., SASSETTI C.M. Cholesterol catabolism by *Mycobacterium tuberculosis* requires transcriptional and metabolic adaptations. **Chemistry & Biology**, 19(2):218-27. 2012.

GUTIERREZ MC, BRISSE S, BROSCHE R, et al. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog**, 2005.

HAITES, R. E., MORITA, Y. S., MCCONVILLE, M. J., and BILLMAN-JACOB, H. Function of Phosphatidylinositol in Mycobacteria. **J. Biol. Chem.** 280, 10981–10987, 2005.

HE L., et al. Comparative Study of the Growth and Survival of Recombinant *Mycobacterium smegmatis* Expressing Mce4A and Mce4E from *Mycobacterium bovis*. **DNA and Cell Biology**. 34(2), 2015.

HMAMA, Z., SENDIDE, K., TALAL, A., GARCIA, R., DOBOS, K., AND REINER, N.E. Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃-phosphoinositide 3-kinase pathway. **Journal of Cell Science**. 117: 2131–2140, 2004.

HORSWILL A.R., ESCALANTE-SEMERENA J.C. *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. **J. Bacteriol**, 1999.

JOSHI S.M., PANDEY A.K., CAPITE N., FORTUNE S.M., RUBIN E.J., SASSETTI C.M. Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 103 (31), 2006.

JUNG J-Y., MADAN-LALA R., GEORGIEVA M., RENGARAJAN J., SOHASKEY, C. D., BANGE F-C., ROBINSON C. M. The Intracellular Environment of Human

Macrophages That Produce Nitric Oxide Promotes Growth of Mycobacteria. **Infection and Immunity**, p. 3198–3209 2013.

KOCH R. Die aetiologie der tuberculose, a translation by Berna Pinner and Max Pinner with an introduction by Allen K Krause. **Am Rev Tuberc** 25: 285-323, 1932.

KRAUSE A. Tuberculosis and public health. **Am Rev Tuberc**, 18: 271–322, 1928.

LEÃO S.C., MARTIN A., MEJIA G.I., PALOMINO J.C., ROBLEDO J., TELLES M.A.S., PORTAELS F. **Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria**. Brugges, Vanden BROELLE, 2004, 164 p., 2004.

MAXFIELD F.R., TABAS I. Role of cholesterol and lipid organization in Disease. Parish T & Stoker NG. *Methods in Molecular Biology: Mycobacteria Protocols*. **Humana Press**, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids. **Manual TELELAB. 2001. Tuberculose – Diagnóstico Laboratorial – Baciloscopia**. Brasília. 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 1ª Edição. Assessoria de Comunicação e Educação em Saúde (Ascom), Brasília, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005.

MISHRA A. K., DRIESSEN N. N., APPELMELK B. J., BESRA G. S. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host pathogen interaction. **FEMS Microbiol Rev** 35, 1126–1157, 2011.

MOLLER, HOLGER J.; POULSEN, JORGEN H. **The Protein Protocols Handbook: Staining glycoproteins/proteoglycans on SDS-gels**. Walker, J. M.. University of Hertfordshire: Humana Press, 627-631, 2002.

MORITA Y.S., FUKUDA T., SENA C.B.C., YAMARYO-BOTTE Y., MCCONVILLE M.J., KINOSHITA T. Inositol lipid metabolism in mycobacteria: biosynthesis and regulatory mechanisms. **Biochim Biophys Acta**. 1810(6):630-41, 2011.

MORITA Y.S., SENA C.B., WALLER R.F., KUOKAWA K., SERNEE M.F., NAKATANI F., HAITES R.E., BILLMAN-JACOB E. H., MCCONVILLE M.J., MAEDA Y., KINOSHITA T. PimE is a polyprenol-phosphate-mannose-dependent mannosyltransferase that transfers the fifth mannose of phosphatidylinositol mannoside in mycobacteria. **J Biol Chem** 281(35):25143–25155, 2006.

MUÑOZ-ELÍAS E.J., UPTON A.M., CHERIAN J., MCKINNEY J.D. Role of the methylcitrate cycle in *Mycobacterium tuberculosis* metabolism, intracellular growth, and virulence. **Molecular Microbiology**, 60 (5), 1109–1122, 2006.

NIEMANN S, HARMSSEN D, RÜSCH-GERDES S, RICHTER E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. **J Clin Microbiol** 38: 3231-3234, 2000.

NIGOU J., GILLERON M., ROJAS M., GARCIA L.F., THURNHER M., PUZO G. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. **Microbes and Infection** 4: 945 – 953; 2002.

NIGOU, J., GILLERON M., PUZO G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. **Biochimie** 85:153–166, 2003.

OUELLET H, JOHNSTON JB, DE MONTELLANO PR. Cholesterol catabolism as a therapeutic target in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol.** 19:530–539, 2011.

PANDEY A.K., SASSETTI C.M. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 105 (11), 2008.

PARRISH, N.M., J. D. DICK and W.R. BISHAI. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends in Microbiology**. 6: 107-112, 1998

PEYRON P., VAUBOURGEIX J., POQUET Y., LEVILLAIN F., BOTANCH C., BARDOU F., DAFFE M., EMILE J.F., MARCHOU B., CARDONA P.J., CHASTELLIER C., ALTARE F. Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* Persistence. **PLoS Pathogens**, 4(11), 2008.

RASTOGI N. Mycobacteria as intracellular pathogens: current notions of pathogenicity, virulence, and drug resistance and their relationship to effective therapy. In **Antimicrobial agents and intracellular pathogens** (D. Raoult, ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 245-300, 1993.

RHEE K.Y., *et al.* Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. **Trends Microbiol** 19 (7): 307 – 314, 2011.

RUSSELL D. G., BARRY E.C., FLYNN J.L. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. **Science** 328 (5980): 852 – 856, 2010.

RUSSELL D.G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nature Review in Microbiology**, 5: 39 – 47, 2007.

RUSSELL D.G., CARDONA P.J., KIM M.J., ALLAIN S., ALTARE F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. **Nature Immunology**, 2009.

SAKAMOTO, K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Vet Pathol**, vol. 49, 3: pp. 423-439. May, 2012.

SCHNAPPINGER D., EHRT S., VOSKUIL M.I, LIU Y., MANGAN J.A., MONAHAN I.M., DOLGANOV G., EFRON B., BUTCHER P.D., NATHAN C., SCHOOLNIK J.K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. **Journal of Experimental Medicine**, 198 (5), 2003.

SENA CB, FUKUDA T, MIYANAGI K, MATSUMOTO S, KOBAYASHI K, MURAKAMI Y, MAEDA Y, KINOSHITA T, MORITA YS. Controlled Expression of Branch-forming Mannosyltransferase Is Critical for Mycobacterial Lipoarabinomannan Biosynthesis. **Journal of Biological Chemistry**, 285(18):13326-36, 2010.

SHOUB H.L. A comparison of the Ziehl-Neelsen and Schulte-Tigges methods of staining tubercle bacilli. **J. Bacteriol.** 8:121–126, 1923.

SMITH, H. Questions about the behaviour of bacterial pathogens in vivo. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 355: 551–564, 2000.

TEXTOR S., WENDISCH V. F., DE GRAAF A.A., MULLER U., LINDER D., BUCKEL W. Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. **Arch Microbiol**, 1997.

THOMAS S.T., VANDERVEN B.C., SHERMAN D.R., RUSSELL D.G., SAMPSON N.S. Pathway Profiling in *Mycobacterium tuberculosis*: elucidation of cholesterol-derived catabolite and enzymes that catalyze its metabolism. **The Journal of Biological Chemistry**, 286 (51): 43668–43678, 2011.

VAN SCOY RE, WILKOWSKE CJ. Antimycobacterial therapy. **Mayo Clin Proc**; 74: 1038–1048, 1999.

WHO. Global tuberculosis report 2014. **World Health Organization**, 2014.

WIELAND C.W., KOPPEL E.A., DEN DUNNEN J, FLORQUIN S, MCKENZIE A.N, VAN KOOYK Y. Mice lacking SIGNR1 have stronger T helper 1 responses to *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infection**, 9: 134–141, 2007.