



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

VICTOR HUGO DE SOUZA MARINHO

**O PAPEL DO COLESTEROL NA BIOSÍNTESE DA PAREDE CELULAR DE**  
*Mycobacterium smegmatis*

BELÉM

2015

**O PAPEL DO COLESTEROL NA BIOSÍNTESE DA PAREDE CELULAR DE**  
*Mycobacterium smegmatis*

VICTOR HUGO DE SOUZA MARINHO

Dissertação submetida ao Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia  
da UFPA como requisito para  
obtenção do grau de Mestre em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. DR. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA

BELÉM

2015

**O PAPEL DO COLESTEROL NA BIODSSÍNTESE DA PAREDE CELULAR DE**  
*Mycobacterium smegmatis*

VICTOR HUGO DE SOUZA MARINHO

Data da avaliação: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Conceito: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. CHUBERT BERNARDO CASTRO DE SENA  
(PPGBIOTEC/ICB/ UFPA– Presidente da banca)

---

Prof. Dra. EDILENE O LIVEIRA DA SILVA  
(PPGBAIP/ICB/ UFPA– Membro)

---

Prof. Dra. BARBARELLA DE MATOS MACCHI  
(ICB/ UFPA– Membro)

---

Prof. Dr. MOYSÉS DOS SANTOS MIRANDA  
(PPGBIOTEC/ICB/ UFPA– Membro)

BELÉM

2015

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

---

Marinho, Victor Hugo de Souza, 1981-

O papel do colesterol na biossíntese da parede celular de *Mycobacterium smegmatis* / Victor Hugo de Souza Marinho. - 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. Micobactérias. 2. Tuberculose. 3. Colesterol. I. Título.

CDD 22. ed. 579.374

---

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter me acompanhado nesta caminhada com saúde, sabedoria, e por ter gerado oportunidades para atingir meus objetivos.

Aos meus pais **Altenir da Conceição Gomes** e **Zilma Oliveira de Souza** pelo apoio, amor, incentivo durante esta fase de minha vida.

Aos meus tios **Getúlio Favacho da Silva** e **Marizete Oliveira de Souza** por terem me criado e educado com muito carinho.

A minha sobrinha **Sheylla Gomes** que é a razão do meu viver.

Aos meus **queridos irmãos** por sempre estarem ao meu lado.

Ao Prof. Dr. **Chubert Bernardo Castro De Sena** pelos ensinamentos, companhia, confiança, sugestões, “paciência” e apoio no desenvolvimento deste trabalho e além de tudo, pela sua amizade que faz com que o convívio entre todos no laboratório (LBE) seja agradável.

A Profa. Dra. **Mara Arruda** pelo apoio prestado a nos oferecer o espaço da Central de Extração para realização de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. **José Luiz Martins do Nascimento** pelo apoio ao nos oferecer o espaço do Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular para realização de parte deste trabalho.

Ao meu amigo irmão **Rogério da Cunha Brito** que sempre me apoiou e topou encarar mais esse desafio comigo, sei que não foi nada fácil mais agora ao final de mais uma etapa de nossa vida acadêmica, só tenho a agradecer sua parceria e dizer que tudo valeu a pena.

Aos **amigos** Ana Cristina Doria, Raimundo Cristovão Pereira, Orlando Santos Neto, Laís da Conceição Tavares, pela amizade, companheirismo e por viverem comigo tantos momentos bons de lazer.

Aos **amigos** do Laboratório de Biologia Estrutural: Jéssica Batista, Pedro Aviz, Roberto Morais, Aldanete Rosário, Vanessa Miranda, Giselle Brasil, Dhara Yasmim e Jaqueline Batista, obrigado pelo apoio e amizade de todos.

As técnicas **Neidiane e Fernanda**, por terem colaborado para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos **Funcionários e Professores** do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFPA pelo apoio técnico, amizade e por contribuírem com seus conhecimentos para nossa formação.

Aos **colegas do laboratório da Central de Extração**: Kyouk Portilho, Wandson Bracamp, Jesiel Cardoso, Lene Carneiro, Ivoneide Barra pela ajuda e amizade.

Aos **colegas** do curso de Pós-Graduação em Biotecnologia: Viviane Santos, Laiza Mendes, Adriana Loureiro, Kenny Pinheiro, Jhon Eric, pela convivência e amizade.

## RESUMO

Diferentes espécies de micobactérias são agentes causadores de significativas doenças em seres humanos como, por exemplo, a tuberculose. Todas as micobactérias possuem uma complexa e distinta parede celular, conferindo características físico-químicas exclusivas ao gênero *Mycobacterium*, protegendo-o contra o sistema imune e entrada de muitos antibióticos. Durante a infecção, o bacilo é capaz de se adaptar ao ambiente inóspito, nutrindo-se de fontes lipídicas alternativas, principalmente o colesterol, da própria célula hospedeira (macrófagos). Este perfil nutricional tem sido considerado essencial para a divisão bacilar e consecutivamente progressão da doença. Diante disso, o presente trabalho tem por objetivo avaliar em *Mycobacterium smegmatis* (espécie saprofítica) a modulação *in vitro* da biossíntese de constituintes bioativos da parede celular após o consumo de colesterol. Como resultado, verificamos por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) que a adaptação do bacilo ao microambiente de escassez nutricional (cultivo em Meio Mínimo – MM) conseguiu manter a biossíntese e o acúmulo dos principais constituintes da parede celular, quando o cultivo ocorre na presença de alguma fonte definida de carbono e energia (glicerol e/ou colesterol). Dentre estes constituintes essenciais sem alterações, verificamos o Trealose de dimicolato (TDM) e os fosfolipídios Fosfatidilinositol (PI), Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), Cardiolipina (CL) e Fosfatidiletanolamina (PE). Diferentemente a esse resultado, o ácido micólico apresentou acúmulo representativo ao cultivo em meio 7H9 somente quando o MM estava igualmente suplementado com glicerol. Este resultado foi confirmado pela marcação álcool-ácido resistente com o marcador fluorescente auroamina, sugerindo alterações nas propriedades físico-químicas da parede celular. Por outro lado, o cultivo em MM favoreceu o acúmulo de Glicopeptídeolipídios (GPLs), independente da suplementação por glicerol e/ou colesterol. Esta perturbação na biossíntese da parede celular alterou o perfil hidrofóbico do bacilo, independentemente da fonte de carbono e energia, porém não alterou a resistência ou sensibilidade a antibióticos. Estes resultados mostram claramente que a biossíntese da parede celular pode sofrer modulações em condições de escassez nutricional, e que a presença ou ausência de colesterol, como ocorrido durante a infecção, não altera significativamente a fisiologia do bacilo a ponto de torna-lo mais vulnerável a ação de antibióticos, sugerindo que tais modificações possam também ocorrer durante a infecção, mantendo o bacilo viável, até o desenvolvimento da doença propriamente dita.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium smegmatis*; Tuberculose; Colesterol; Parede celular.

## ABSTRACT

Different *Mycobacterium* species are causative agents of disease in humans, for example, the tuberculosis. All mycobacteria have a complex cell wall, distinct of others bacteria, conferring specific physico-chemical characteristic to *Mycobacterium* genus, due to protect against immune system and waterproofing against the intake of much antibiotics. During infection, the bacillus is able to adapt to harsh environment, due to consumption of cholesterol from its host cell (macrophages) as alternative carbon and energy source. That nutritional aspect has been considered as essential for division of bacilli and consecutive progress of tuberculosis disease. The present study has as objective to evaluate *in vitro* the modulation of saprophytic *Mycobacterium smegmatis* cell wall biosynthesis after cholesterol consumption as primordial energy and carbon source. As results, we are found by Thin Layer Chromatography (TLC) that bacillary adaptation to microenvironment with poor nutrient (minimal media – MM) maintained the biosynthesis and accumulation of essential cell wall components, when the growth occurs in presence of someone defined carbon and energy source (glycerol and/or cholesterol). Among them without changes, we analyzed Trehalose Dimicolate (TDM) and the phospholipids (phosphatidylinositol (PI), phosphatidylinositol manosides (PIMs), Cardiolipin (CL) and phosphatidylethanolamine (PE)). Differently of these results, the mycolic acid showed representative accumulation, comparing with 7H9 culture, only when the MM was supplemented with glycerol. This result was confirmed by alcohol-acid staining using fluorescent auramine dye, suggesting some changes in physico-chemistry cell wall properties. On the other hand, the MM culture induced the accumulation of glycopeptidolipids (GPLs), independently of glycerol/cholesterol supplementation. Such disturbance in cell wall biosynthesis also changed the bacillary hydrophobicity in all MM groups, but does not change the resistance and sensibility to antibiotics. Those results clearly show that cell wall biosynthesis might be modulate during nutritional shortage, and such presence or absence of cholesterol, as occurs during infection, does not significantly change the bacillary physiology to become vulnerable for antibiotics. It suggests that such modulations might also occur during infection, maintaining the bacilli available to develop the tuberculosis diseases.

**Keywords:** *Mycobacterium smegmatis*; Tuberculosis; Cholesterol; Cell wall.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 01</b>	Número de novos casos estimados de TB no mundo no ano de 2012.....	18
<b>Figura 02</b>	Estimativa de morte por tuberculose no ano de 2012.....	18
<b>Figura 03</b>	Vias metabólicas do <i>Mycobacterium</i> durante o crescimento <i>in vitro</i> em meio contendo colesterol como fonte principal de carbono e energia.....	21
<b>Figura 04</b>	Representação da parede celular de <i>Mycobacterium</i> .....	23
<b>Figura 05</b>	Estrutura química do mio- inositol.....	24
<b>Figura 06</b>	Via metabólica que utiliza o inositol em <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	27
<b>Figura 07</b>	Via de biossíntese de LM e LAM.....	28
<b>Figura 08</b>	Biossíntese de LM/LAM.....	30
<b>Figura 09</b>	Perfil de fosfolipídios de <i>M. smegmatis</i> .....	31
<b>Figura 10</b>	Estrutura química de GPLs de <i>Mycobacterium</i> .....	32
<b>Figura 11</b>	Estruturas químicas dos ácidos micólicos.....	33
<b>Figura 12</b>	Modelo comparativo de biossíntese de ácidos graxos em actinomicetos.....	35
<b>Figura 13</b>	Estrutura química de Trealose.....	36
<b>Figura 14</b>	Estrutura do glicolipídio Trealose dimicolato (TDM).....	37
<b>Esquema 1</b>	Cultivo e análise do perfil cromatográfico dos lipídios da parede celular de <i>M. Smegmatis</i> .....	43
<b>Esquema 2</b>	Análise das propriedades físico-químicas da parede celular de <i>M. smegmatis</i> .....	46
<b>Figura 15</b>	Perfil de Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs) e Fosfolipídios.....	49
<b>Figura 16</b>	Perfis de ácidos micólicos livres oriundos da parede celular de <i>M. smegmatis</i> .....	51
<b>Figura 17</b>	Perfis de glicopeptideolipídios (GPLs) e trealose de dimicolato (TDM) oriundos da parede celular de <i>M. smegmatis</i> .....	52
<b>Figura 18</b>	Análise das características físico-químicas pela marcação fluorescente com auramina fenólica.....	54
<b>Gráfico 1</b>	Partição de haxadecano para determinação da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana.....	55
<b>Gráfico 2</b>	Sensibilidade e resistência a antibióticos.....	57
<b>Figura 19</b>	Perfil da parede celular de <i>M. smegmatis</i> , após consumo de colesterol como fonte alternativa de carbono e energia.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACP</b>	Proteína Transportadora de Acila
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BCG</b>	Bacilo Calmette-Guérin
<b>°C</b>	Graus Celsius
<b>CG</b>	Ciclo do glioxilato
<b>MCC</b>	Ciclo do metil citrato
<b>CL</b>	Cardiolipina
<b>CO</b>	Monóxido de carbono
<b>CCD</b>	Cromatografia de Camada Delgada
<b>D.O</b>	Densidade ótica
<b>FAS</b>	Síntese de Ácidos Graxos
<b>G</b>	Gramas
<b>GDP</b>	Guanosildifosfato
<b>GPLs</b>	Glicopeptideolipídios
<b>H<sup>+</sup></b>	Próton
<b>HIV</b>	Vírus da Imunodeficiência Humana
<b>Ins</b>	Inositol
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gama
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanano
<b>LM</b>	Lipomanano
<b>L</b>	Litros
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitros
<b>mL</b>	Mililitros
<b>Mce4</b>	Mamalian Cell Entry 4
<b>MDR</b>	Multi-droga Resistente
<b>MTb</b>	<i>Mycobacterium Tuberculosis</i>
<b>MM</b>	Meio Mínimo
<b>MSMEG</b>	<i>Mycobacterium Smegmatis</i>
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
<b>NO</b>	Monóxido de Nitrogênio
<b>nm</b>	Nanometros
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PEP</b>	Fosfoenolpiruvato
<b>PI</b>	Fosfatidilinositol
<b>PIM</b>	Fosfatidilinositol manosídeo
<b>PDIMs</b>	Fitiocerol Dimicocerosato
<b>PIS</b>	Fosfatidilinositol Sintetase
<b>PI3P</b>	Fosfatidilinositol-3-fosfato
<b>rpm</b>	Rotação por minuto
<b>SIDA</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida

<b>TB</b>	Tuberculose
<b>TDM</b>	Trealose Dimicolato
<b>TMM</b>	Trealose Monomicolato
<b>UFC</b>	Unidade Formadora de Colônia
<b>VAS</b>	Vanilina - Ácido Sulfúrico

## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1.</b>	Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	16
<b>2.2.</b>	TUBERCULOSE: Infecção, Transmissão e Epidemiologia.....	16
<b>2.3.</b>	Patogenicidade do <i>Mycobacterium</i> é dependente do consumo de colesterol da célula hospedeira.....	19
<b>2.4.</b>	Catabolismo do colesterol por <i>Mycobacterium</i> .....	20
<b>2.5.</b>	<b>CONSTITUIÇÃO DA PAREDE CELULAR DE <i>Mycobacterium</i>.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.1.</b>	<b>BIOSSÍNTESE E FUNÇÕES DE LIPÍDIOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE MICOBACTÉRIA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.5.1.1.</b>	Inositol.....	24
<b>2.5.1.2.</b>	Fosfatidilinositol.....	24
<b>2.5.1.3.</b>	Fosfatidilinositol Manosídeos.....	25
<b>2.5.1.4.</b>	Lipomanana e Lipoarabinomanana.....	28
<b>2.5.1.5.</b>	Fosfolipídios.....	30
<b>2.5.1.6.</b>	Glicopeptideolipídios.....	32
<b>2.5.1.7.</b>	Ácido Micólico.....	32
<b>2.5.1.8.</b>	<b>BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS.....</b>	<b>34</b>
<b>2.5.1.9.</b>	Trealose Dimicolato.....	36
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>39</b>
<b>4.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1.</b>	CULTIVO E TRATAMENTO DO <i>Mycobacterium smegmatis</i> .....	40
<b>4.2.</b>	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DE <i>M. smegmatis</i> .....	41
<b>4.2.1.</b>	ANÁLISE DE FOSFATIDILINOSITOL MANOSÍDEOS (PIMs) E FOSFOLIPÍDIOS.....	42
<b>4.2.2.</b>	ANÁLISE DE GLICOPEPTIDEOLIPÍDIOS (GPLs) E TREALOSE DIMICOLATO (TDM).....	42
<b>4.2.3.</b>	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDO MICÓLICO.....	42
<b>4.3.</b>	ANÁLISE DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DE AURAMINA.....	44
<b>4.4.</b>	ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DA PAREDE CELULAR (PARTIÇÃO COM HEXADECANO).....	44
<b>4.5.</b>	ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	44
<b>4.6.</b>	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.</b>	PERFIS DE PIMs E FOSFOLIPÍDIOS EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA.....	48
<b>5.2.</b>	PERFIS DE ÁCIDO MICÓLICO EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA.....	50

<b>5.3.</b>	<b>PERFIS DE TREALOSE DIMICOLATO (TDM) E GLICOPEPTIDEOLIPÍDIOS (GPLs) EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA.....</b>	<b>51</b>
<b>5.4.</b>	<b>AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO POR AURAMINA FENÓLICA.....</b>	<b>53</b>
<b>5.5.</b>	<b>AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DA PAREDE CELULAR DE <i>Mycobacterium smegmatis</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>5.6.</b>	<b>AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....</b>	<b>56</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mycobacterium* é composto por organismos bacilares que apresentam uma parede celular distinta das demais bactérias, com propriedades físico-químicas específicas do gênero. Estas propriedades conferem a estes bacilos um princípio de coloração específico ao gênero, denominado álcool-ácido resistente. Essa propriedade deve-se à presença de lipídios singulares na superfície da célula, denominados ácidos micólicos, encontrados somente nesse gênero. Essa propriedade de coloração permitiu que Robert Koch, durante seus estudos pioneiros referentes à tuberculose, pudesse identificar o organismo em lesões tuberculosas. Subsequentemente, revelou grande valor taxonômico na definição do gênero *Mycobacterium* (MANDIGAN *et al.*, 2010).

O estudo da composição da parede celular de micobactéria foi iniciado pela Universidade de Osaka no Japão e no CNRS (Centro Nacional de Pesquisa Científica) na França, por Yamamura, Kato, Azuma, Lederer e colaboradores entre os anos de 1960 e 1970. Através do desenvolvimento de técnicas analíticas, combinadas com o sequenciamento do genoma do *Mycobacterium tuberculosis*, o entendimento, não somente da estrutura lipídica da parede celular, mas também da genética básica, tornou-se bem mais coerente o entendimento da biossíntese desses lipídios para a constituição da parede celular (BRENNAN, 2003).

A parede celular das micobactérias é extremamente complexa, sendo que sua constituição se dá principalmente por peptidoglicano, arabinogalactano (polissacarídeo) e ácidos micólicos. A parede celular contém ainda, alguns tipos de lipídios e proteínas livres, muitos desses lipídios estão conjugados com glicídeos, formando lipopolisacarídeos anfifílicos. Os fosfolipídios ligados ao inositol (fosfatidilinositol - PI) podem também se ligar a manoses, constituindo moléculas de fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), também características das espécies micobacterianas e, estes por sua vez podem conter sucessivas adições de resíduos de manoses ou arabinose, formando assim moléculas mais complexas como o Lipomanano (LM) e o Lipoarabinomanano (LAM), cuja localização na parede celular ainda não está precisa (LOPEZ-MARIN, 2012).

Muito desses constituintes possuem atividade biológica na célula hospedeira durante a infecção, conferindo a parede celular da micobactéria um componente essencial e bioativo, podendo imunodeprimir a resposta contra o bacilo, protegendo a micobactéria contra os mecanismos microbicidas dos macrófagos (PITARQUE *et al.*, 2008).

O alto teor de lipídios, principalmente de ácidos micólicos, confere a hidrofobicidade da parede celular da micobactéria e ainda uma baixa permeabilidade a antibióticos e resistência à desidratação (GLICKMAN & JACOBS, 2001). Estudos com a parede celular mostrou que PIMs, LM, LAM e ácidos micólicos são solúveis em uma mistura de solventes, permanecendo como resíduos insolúveis arabinogalactanos e peptidoglicanos. Entretanto, pode-se considerar que esses lipídios, proteínas e lipoglicanos são sinalizadores dos efeitos moleculares no processo da doença. No entanto o núcleo insolúvel é essencial para a viabilidade celular e devem está inseridos no contexto do desenvolvimento de novas drogas contra a tuberculose (BRENNAN, 2003).

Estudos anteriores já demonstraram que este bacilo é apto em captar colesterol da célula hospedeira com a finalidade de obter carbono e energia, a fim de se manter viável durante o estágio crônico da infecção em um microambiente desfavorável à sua sobrevivência. A busca por genes relacionados com a virulência deste patógeno levou a descoberta do gene *mce4* que é mostrado por alguns destes estudos como sendo o gene responsável pelo transporte de colesterol da célula hospedeira para o bacilo (PANDEY & SASSETTI, 2008). Além disso, o patógeno faz uso de várias vias metabólicas para sua adaptação no interior da célula hospedeira.

Esses mecanismos utilizados pela micobactéria levanta a possibilidade de alterações na biossíntese da parede celular durante o crescimento bacteriano ao longo da infecção, como por exemplo, os constituintes de glicolipídios contendo manose. Recentemente, nosso grupo de estudo demonstrou que *Mycobacterium smegmatis* após o cultivo, *in vitro*, em meio pobre de nutriente (Meio Mínimo), porém rico em colesterol, é capaz de transportar e acumular colesterol no seu interior, induzindo diminuição da taxa de crescimento celular, e modificações na biossíntese de Lipoarabinomanana (LAM), molécula imunomoduladora da parede celular de micobactérias (SANTOS, 2015). Essa modificação na parede celular está sendo relacionada com a interação parasito-hospedeiro e a sobrevivência do bacilo durante a infecção.

Diante disso, o presente trabalho objetiva estudar as demais modulações da parede celular de *Mycobacterium*, em especial a biossíntese de constituintes lipídicos, durante o crescimento *in vitro*, após o consumo do colesterol como principal fonte de carbono e energia, como ocorrida durante a infecção por este bacilo.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Gênero *Mycobacterium*

As micobactérias pertencem ao gênero *Mycobacterium*, o único dentro da família Micobacteriaceae, a qual faz parte da ordem Actinomycetales. O nome *Mycobacterium* foi utilizado para designar, no passado, micro-organismos que cresciam sob a forma de película em meio líquido e cujas principais características incluíam ausência de mobilidade, células levemente curvadas em formas de bastonetes e resistência a descoloração por álcool-ácido, segundo o método de coloração Ziehl-Neelsen (RASTOGI *et al.*, 2001). Outras características gerais das micobactérias são o metabolismo tipicamente aeróbio (embora ocorram espécies e linhagens microaerofílicas) e alto teor de G+C no genoma (que pode variar de 58% a 70%).

*Mycobacterium smegmatis*, a bactéria utilizada neste estudo é uma espécie não patogênica oportunista de crescimento rápido que tem sido utilizada como importante ferramenta para análise molecular de infecções causadas por micobactérias, em especial *Mycobacterium tuberculosis* (FUJIWARA *et al.*, 2012).

### 2.2. TUBERCULOSE: Infecção, Transmissão e Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecto contagiosa causada, principalmente, pelo agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Estima-se que, em 2012, 8,6 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,3 milhões morreram da doença (OMS, 2013) (Figuras 01, 02).

A principal forma de transmissão do agente etiológico desta enfermidade é através do ar e acontece de pessoa para pessoa através das vias aéreas, ou seja, por meio de gotículas que contêm o bacilo, expelidas por um indivíduo infectado com TB ativa, a forma da doença na qual a micobactéria multiplica-se levando o paciente a desenvolver o quadro clínico mais contagioso (HARI *et al.*, 2010).

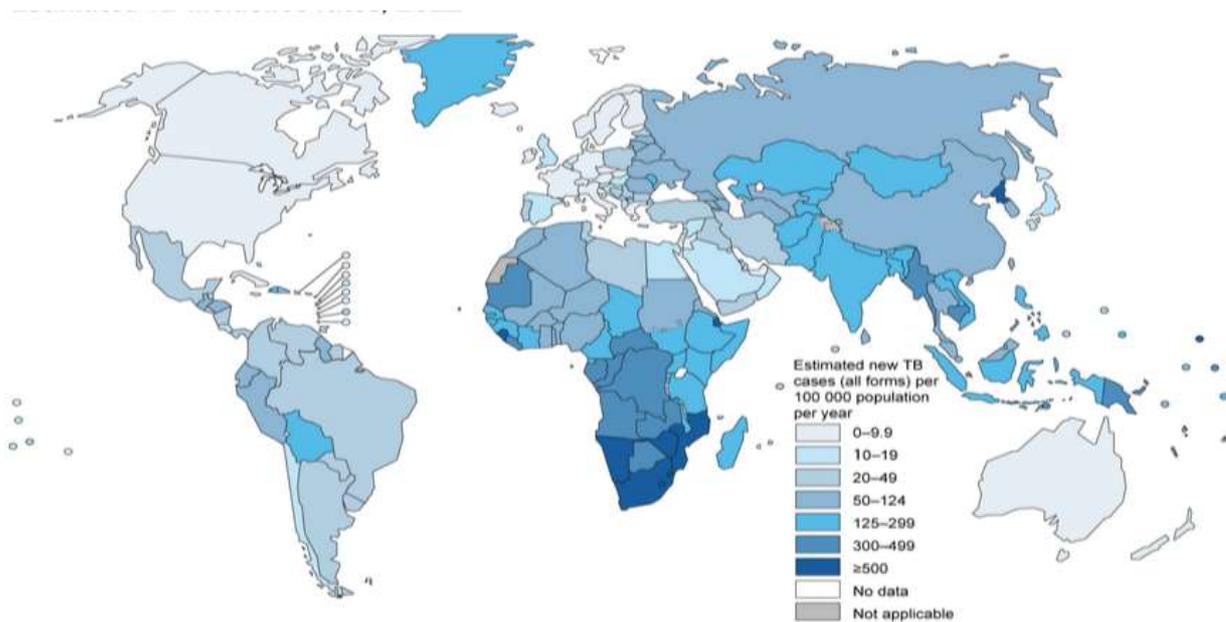
A profilaxia da TB se dá através da vacina produzida com uma cepa viva, porém atenuada, do *Mycobacterium bovis*, conhecida atualmente como Bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Apesar de o tratamento atual ser eficaz, a tuberculose permanece como um dos principais problemas de saúde à escala global (JORDÃO & VIEIRA, 2011). Segundo a

OMS, a tuberculose é a segunda causa de óbito por doença infecciosa, seguida pela SIDA (Síndrome da imunodeficiência adquirida).

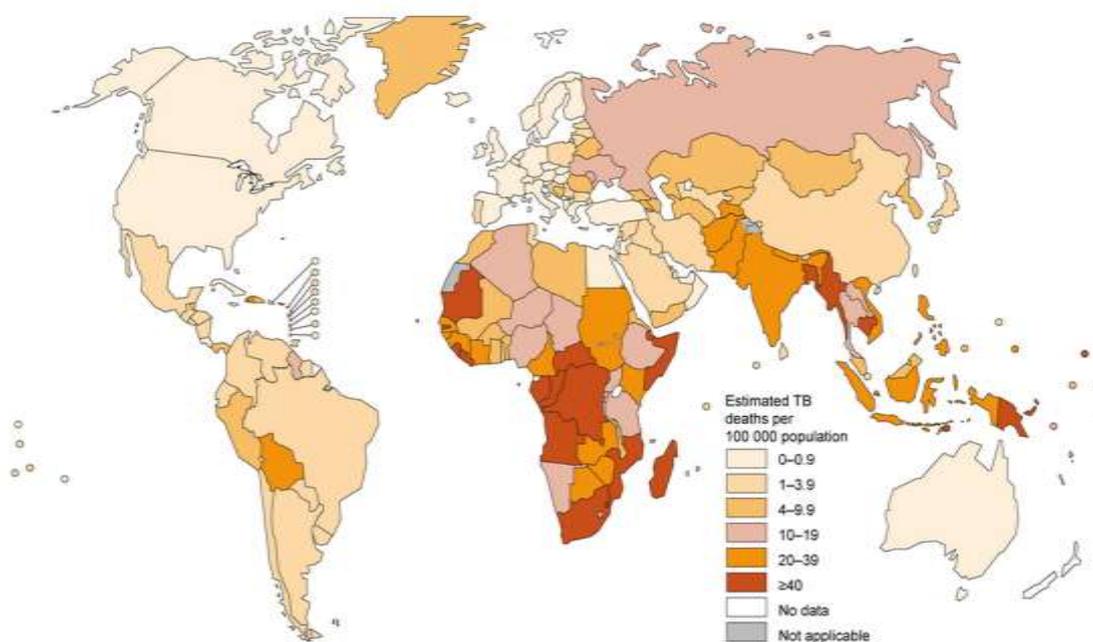
A situação é particularmente complicada nos países em desenvolvimento, devido aos sistemas de saúde serem deficitários, ao fato do aparecimento de cepas do *M. tuberculosis* multi-droga resistentes (MDR) e extensivamente resistentes (XDR) aos fármacos usados contra essa patologia e, principalmente, pela elevada incidência do HIV (CHAISSON & MARTINSON, 2008).

A co-infecção TB/HIV apresenta uma interação sinérgica, pois cada uma acelera a progressão da outra (MARIANI *et al.*, 2001). Nos doentes HIV positivos, a TB é a infecção oportunista mais comum e a principal causa de morte (CHAKROBORTY, 2011). Além disso, o tratamento da TB em populações infetadas pelo HIV é complicado pela possibilidade de interações graves entre os fármacos antituberculosos e alguns antirretrovirais (LIENHARDT *et al.*, 2010).

A terapia padrão atual para o tratamento da TB consiste na administração oral diária de doses elevadas de rifampicina, isoniazida e pirazinamida em combinação com etambutol, durante dois meses. A necessidade de um tratamento extenso com vários fármacos em concentrações elevadas e frequência diária podem levar a muitos efeitos adversos e, conseqüentemente ao abandono do tratamento. Sem tratamento, a doença pode se disseminar e levar ao aparecimento de resistência aos vários agentes terapêuticos (OMS, 2011).



**Figura 01** – Número de novos casos estimados de TB no mundo no ano de 2012 (adaptado de OMS, 2013).



**Figura 02** – Estimativa de morte por tuberculose no ano de 2012 (adaptado de OMS, 2013).

### 2.3. Patogenicidade do *Mycobacterium* é dependente do consumo de colesterol da célula hospedeira

Estudos têm demonstrado que algumas micobactérias, como *M. bovis*, *M. tuberculosis* e *M. leprae*, são dependentes de moléculas lipídicas oriundas do hospedeiro para o seu sucesso como patógeno. Estes achados foram descritos ao se estudar o conteúdo intracelular dos macrófagos infectados que apresentavam um aspecto de “células espumosas” (macrófagos “espumosos”) pelo depósito de partículas lipídicas, dentre eles o colesterol é o mais abundante (D’AVILA *et al.*, 2006; PANDEY & SASSETTI, 2008; ALMEIDA *et al.*, 2009). Dentre vários lipídios o colesterol mostrou ser essencial durante a infecção por *M. tuberculosis*, sendo o bacilo capaz de capturar e catabolizar o colesterol da célula hospedeira, usando-o como principal fonte de carbono e energia (PANDEY & SASSETTI, 2008).

O estudo com operons intimamente ligados à virulência do bacilo levou Joshi e colaboradores (2006) a descrever um sistema denominado *Mammalian Cell Entry (mce)*, que parece ser essencial para a infectabilidade do *M. tuberculosis*. Sendo este sistema constituído de quatro cópias de operons (*mce 1-4*), dentre estes o operon *mce4*, descrito por Pandey & Sasseti (2008), mostrou codificar um sistema de importação de colesterol que permite que o bacilo da tuberculose obtenha carbono e energia deste componente reservado no citoplasma da célula hospedeira.

A expressão de *mce4* mostrou ser essencial para a persistência deste patógeno durante a fase crônica da infecção, favorecendo o crescimento dentro dos macrófagos ativado por interferon gama (IFN- $\gamma$ ), citocina predominante nesta fase da infecção. Esta descoberta levou a hipótese de que o interferon gama, possa ser um indutor de maturação de fagossomo, que é normalmente inibido pelas micobactérias, comprometendo a reciclagem de endossomo, cancelando assim a maior fonte de acesso de carbonos para o bacilo, forçando este a buscar novos meios nutricionais como o colesterol (PANDEY & SASSETTI, 2008; BRZOSTEK *et al.*, 2009). Estes relatos mostram que o INF- $\gamma$  sequestra patógenos para um compartimento desprovido de nutrientes forçando-os a procurar vias nutricionais alternativas.

Essas evidências bioquímicas deixam claro que o *M. tuberculosis* é capaz de alterar sua fisiologia durante o processo de infecção, passando de um metabolismo tipicamente aeróbico, baseado em carboidratos, para um metabolismo anaeróbico, baseados em lipídios.

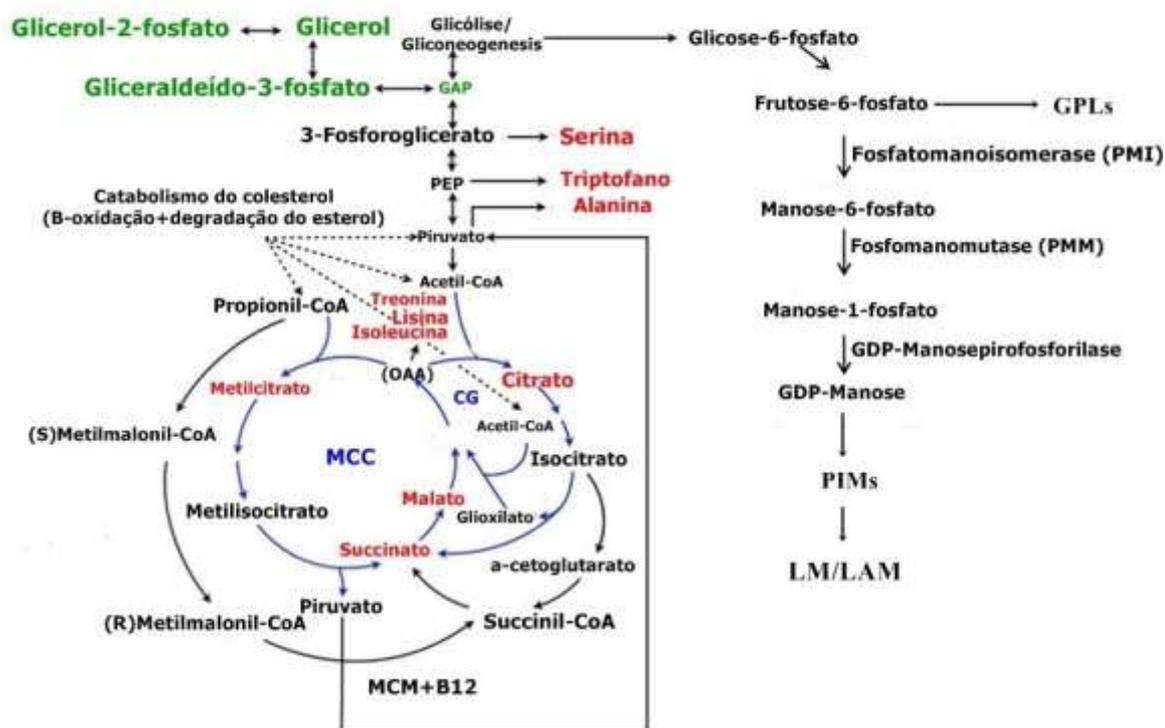
Na verdade, quando o bacilo cresce, *in vitro*, em geral usa carboidratos como fonte de carbono, enquanto que, *in vivo*, usa ácidos graxos (SMITH, 2003).

#### 2.4. Catabolismo do colesterol por *Mycobacterium*

O *M. tuberculosis* utiliza preferencialmente ácidos graxos como fonte de carbono, em vez de glicose, sugerindo que, *in vivo*, os bacilos possam ser lipolíticos. A isocitrato liase, enzima do Ciclo do Glioxilato (CG), que emprega acetato e ácidos graxos como fontes exclusivas de carbono, tem sua expressão e atividade aumentadas à medida que o *M. tuberculosis* atinge a fase estacionária e em condições anaeróbicas (GLICKMAN & JACOBS, 2001).

Patógenos intrafagossomais, como *M. tuberculosis*, devem adquirir nutrientes a partir do citoplasma da célula hospedeira (APPELBERG, 2006). O uso de carbono de fontes lipídicas por este patógeno, *in vivo*, foi inferido a partir da indução da transcrição de genes que codificam enzimas de degradação de ácidos graxos (SCHNAPPINGER *et al.*, 2003), e de vias específicas do metabolismo do carbono (MCKINNEY *et al.*, 2000; MARRERO *et al.*, 2010).

Como mostrado na figura 3, a degradação desses ácidos graxos é realizada pela  $\beta$ -oxidação, originando acetil-CoA e propionil-CoA, a partir de ácidos graxos de cadeia impar, prosseguindo sua degradação oxidativa através do Ciclo do Metil Citrato (MCC), para o propionil-CoA, ou Ciclo do Glioxalato (CG), para o acetil-CoA (KUNAU *et al.*, 1995; CLARK & CRONAN, 1996, TEXTOR *et al.*, 1997).



**Figura 03-** Representação das vias metabólicas do *Mycobacterium* e seus subprodutos durante o crescimento, *in vitro*, em meio contendo colesterol ou glicerol como fonte principal de carbono e energia. Os metabolitos em verde ou em vermelho são acumulados em ambas às culturas (contendo colesterol ou glicerol). O ciclo do metil citrato (MCC) e do glioxilato (CG) estão representadas em azul. Metabolitos diferenciados são representados em preto mostrando aumento no fluxo do Metil citrato (Adaptado de GRIFFIN *et al.*, 2012).

Estas observações indicam que fontes de carbono adicionais estão disponíveis, *in vivo*, para a bactéria, tais como ácidos graxos, açúcares e aminoácidos. Além disso, as condições ambientais encontradas durante a infecção, incluindo as alterações de  $O_2$ ,  $CO$ ,  $NO$  e as concentrações de  $H^+$ , podem contribuir para as alterações metabólicas do bacilo (CHAN *et al.*, 1995; KUMAR *et al.*, 2008; RHOADES *et al.*, 2007; VIA *et al.*, 2008).

O consumo do colesterol pela micobactéria altera a abundância de uma variedade de metabolitos primários, mais notavelmente os intermediários do MCC (GRIFFIN *et al.*, 2012). Dessa forma, utilizando o colesterol, micobactérias patogênicas são capazes de subsistir a uma variedade de substratos de carbono, incluindo carboidratos, lipídios, glicolipídios e aminoácidos. O catabolismo dessas fontes de carbono proporciona à célula bacteriana energia na forma de ATP e equivalentes de redução, como precursores biossintéticos essenciais, incluindo glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, 3-fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato (PEP), acetil-CoA, propionil-CoA, oxaloacetato e  $\alpha$ -cetoglutarato (GRIFFIN *et al.*, 2012, MUÑOZ-ELÍAS, 2005).

Estes fatos evidenciam que *M. Tuberculosis* emprega uma complexa maquinaria catabólica que, durante o processo de infecção, degrada os vários tipos estruturais de lipídios encontrados no hospedeiro (GLICKMAN & JACOBS, 2001).

Hexoses como a glicose é a fonte de carbono e energia de muitas micobactérias (FRAENKEL, 1996). Em algumas micobactérias a ativação e absorção de glicose estão ligadas a via PEP, através do sistema de fosfotransferase de glicose, porém em outras espécies micobacterianas os açúcares são importados por transportadores específicos e ativados pelas cinases de açúcar. As vias mais bem caracterizadas do catabolismo do açúcar nas micobactérias são a glicólise, via das pentoses fosfato e a via Entner-Doudoroff. As bactérias que possuem as enzimas para a via Entner-Doudoroff, podem metabolizar a glicose sem o auxílio da glicólise ou a via das pentoses fosfato. Essas vias são difundidas entre procariontes e são susceptíveis de desempenhar um papel importante na nutrição, *in vivo*, de diversas espécies patogênicas (RENESTO *et al.*, 2005). É importante notar, no entanto, que alguns bacilos intracelulares, aparentemente, não possuem todas as três vias e podem substituí-las pelo piruvato obtido a partir do citosol.

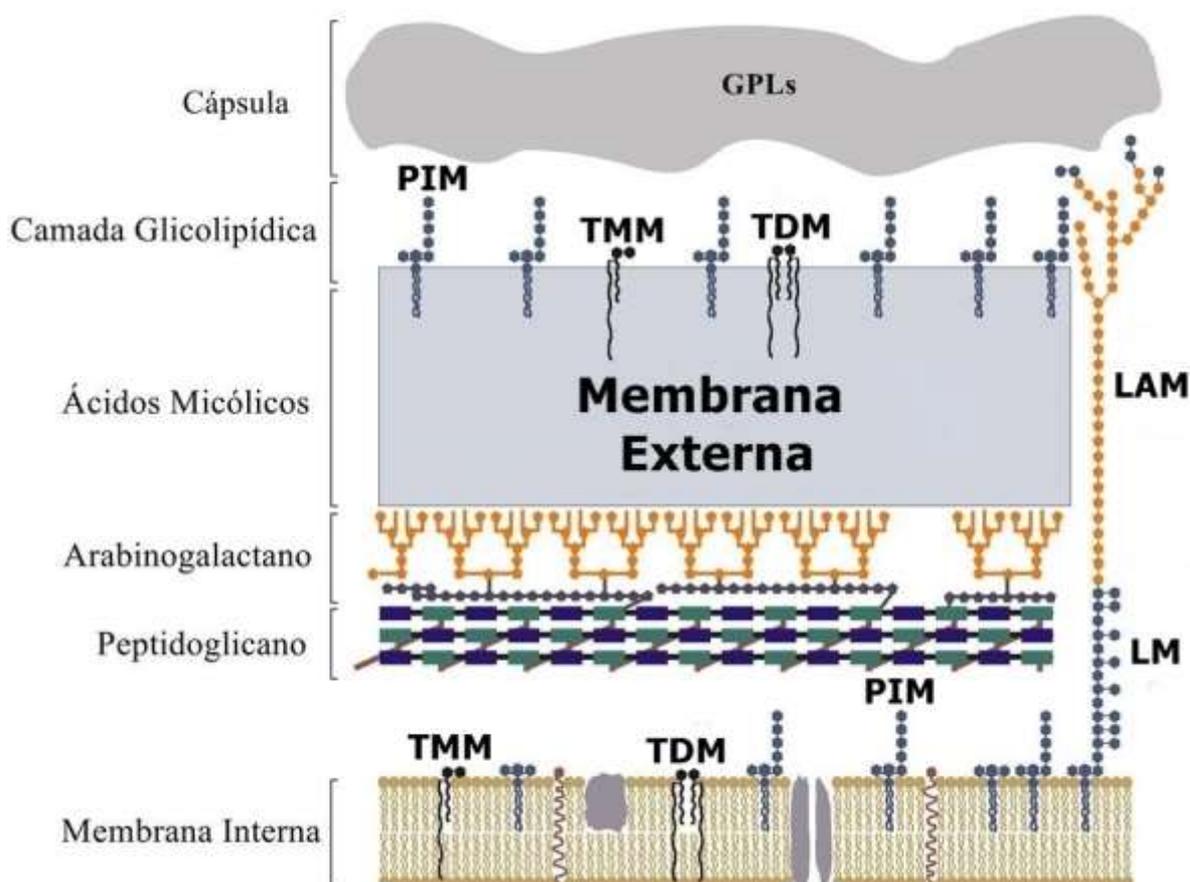
## 2.5. CONSTITUIÇÃO DA PAREDE CELULAR DE *Mycobacterium*

As micobactérias possuem uma característica em comum, uma distinta parede celular composta de peptideoglicanos, complexos polissacarídeos, ambos ligados covalentemente a lipídios livres. Além desses lipídios existem também ácidos micólicos que são marcadores dessas espécies, e que estão ligados covalentemente a uma camada de polissacarídeos (arabinogalactano) (Figura 04). Esta camada de ácido micólico é completada por uma camada de glicolipídios para formar a membrana externa, análoga à membrana externa de bactérias Gram-negativas (HOFFMANN, 2008).

A membrana externa de micobactérias é composta de uma variedade de lipídios, incluindo trealose Monomicolato e Dimicolato (TMM e TDM), glicopeptideolipídios (GPLs), sulfolipídios, e lipooligossacarídeos. Alguns desses lipídios são encontrados largamente distribuídos, enquanto outros são restritos a espécies particulares. Por exemplo, TDM e sua estrutura equivalente são encontradas tanto em micobactéria como em corinebactéria, entretanto (PDIMs) é restrito a alguns subtipos de micobactérias, como por exemplo, *M.leprae* (BARRY *et al.*, 1996; DAFJE *et al.*, 1998).

Dessa forma, a parede celular das micobactérias possui em sua constituição uma concentração significativa de lipídios (aproximadamente 40% de massa seca de células), que

confere uma propriedade físico-química específica do gênero, com alta hidrofobicidade, impermeabilizando a superfície da bactéria a vários agentes microbicidas, incluindo os antibióticos (DAFFE, 1998, COLE, 1998).



**Figura 04-** Representação da parede celular de *Mycobacterium*. A parede celular micobacteriana é uma estrutura composta por múltiplas camadas: (1) Cápsula e (2) camada Glicolípida composta principalmente por PIM (Fosfatidilinositol manosídeos), TMM e TDM (Trealose monomicolato e dimicolato), LAM (Lipoarabinomanana); (3) Camada de ácidos micólicos ligados covalentemente a (4) Camada de Arabinogalactano e peptidoglicano; e a camada mais interna sendo composta por constituintes atrelados a (5) Membrana Interna, contendo PIM (Fosfatidilinositol manosídeos), TMM e TDM (Trealose Monomicolato e Dimicolato) e LM (Lipomanana) (Adaptado de CRELLIN *et al.*, 2011).

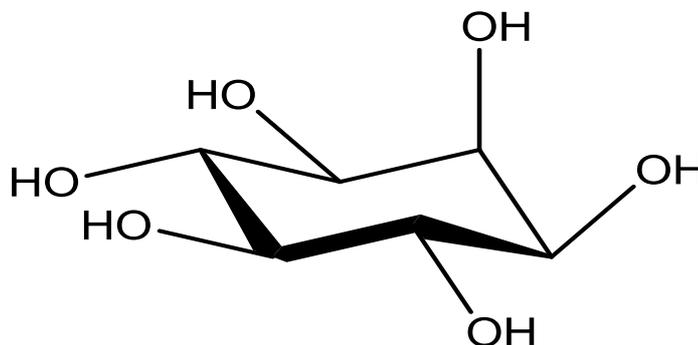
Os maiores componentes da membrana plasmática de micobactéria são os fosfolípidios como cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) e PI glicosilados: fosfatidilinositol manosídeos (PIM), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM). A proporção desses lipídios presentes na parede celular de micobactérias depende da espécie e das condições de crescimento (NANDEDKAR, 1983). O estudo de Jackson

(2000) mostrou que CL, PE, PI representam 37, 32 e 28%, respectivamente do total de fosfolípídios na membrana plasmática de *M. smegmatis*.

### 2.5.1. BIOSÍNTESE E FUNÇÕES DE LIPÍDIOS COMPONENTES DA PAREDE CELULAR DE MICOBACTÉRIA.

#### 2.5.1.1. Inositol

O inositol (Ins) é um poliálcool cíclico contendo um anel de seis átomos de carbono e seis grupos hidroxilas (cicloexanopoliol), sendo um importante constituinte celular, estando envolvido em diferentes processos bioquímicos (ALMEIDA, 2002). Em Micobactérias o Ins é um metabolito essencial, por ser a unidade construtora da síntese de glicolípídios e outros metabolitos da sua parede celular (CHATTERJEE, 2004). Dentre os isômeros do inositol, o mio-inositol é o mais abundante na natureza, sendo este produzido a partir da glicose (ALMEIDA, 2002).



**Figura 05-** Estrutura química do mio- inositol, o isômero do inositol mais abundante encontrado na natureza.

#### 2.5.1.2. Fosfatidilinositol

As actinobactérias compreendem uma das poucas classes de procariotos capazes de sintetizar fosfatidilinositol (PI) (BRENNAN, 1968). Essas bactérias podem conter um quarto do total de fosfolípídios, segundo Jackson (2000). Moléculas de PI são sintetizadas *de novo* a partir de Citidina difosfato-Diacilglicerol (CDP-DAG) e Ins em uma reação catalisada pela enzima PI sintetase (PIS) (SALMAN, 1999).

Ainda de acordo com Jackson (2000), o gene *pgsA*, que codifica a enzima PIS, mostrou ser essencial em *M. smegmatis*, sugerindo que PI ou a sua forma glicosilada (PIMs)

são requeridos para o crescimento normal desta micobactéria. Como PI é um precursor comum na via de biossíntese de PIMs, LM e LAM, é provável que a síntese de PI seja necessária para sustentar estas moléculas.

Morita e colaboradores (2010) sugeriram uma via alternativa para a biossíntese de PI. Nesta via, primeiramente, o Ins é fosforilado para forma D-myo-Ins-3-fosfato (I3P) o qual então é carregado após conjugação com a CDP-DAG para formar fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) (Figura 06). Conforme o mesmo grupo de pesquisa, foi proposto que o gene *pgsA* codifica PI3P sintetase ao invés de PIS e PI3P seria subsequentemente desfosforilado para tornar-se PI.

Em espécies patogênicas PI tem sido reportado como modulador da resposta imune do hospedeiro em favor do patógeno, através de inúmeros efeitos sobre os macrófagos incluindo a produção de citocinas, a inibição da maturação do fagossomo e apoptose (CHATTERJEE *et al.*, 1998; VERCELLONE *et al.*, 1998).

#### 2.5.1.3. Fosfatidilinositol Manosídeos

Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs) são um dos mais importantes componentes da parede celular de micobactérias. Moléculas de PIMs compreendem uma família de glicolipídios compostos por PI, com diferentes graus de glicosilação pelo açúcar manose (mono, di, tri, tetra, penta e hexamanosídeos) e diferente grau de acetilações. As moléculas dimanosídeos e hexamanosídeos (PIM<sub>2</sub> e PIM<sub>6</sub>, respectivamente) são as duas classes mais abundantes encontradas em *Micobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG), *M. tuberculosis* H37Rv e *M. smegmatis* 607 (GILLERON, 2003).

A presença de Ins e manose como açúcares constituintes de fosfolipídios de *M. tuberculosis* foi primeiramente reportada por Anderson (ANDERSON, 1930; 1939). Os trabalhos pioneiros de Ballou & Brennan (1968), delinearam a biossíntese de Monoacil Fosfatidilmanosídeo 2 (AcPIM<sub>2</sub>).

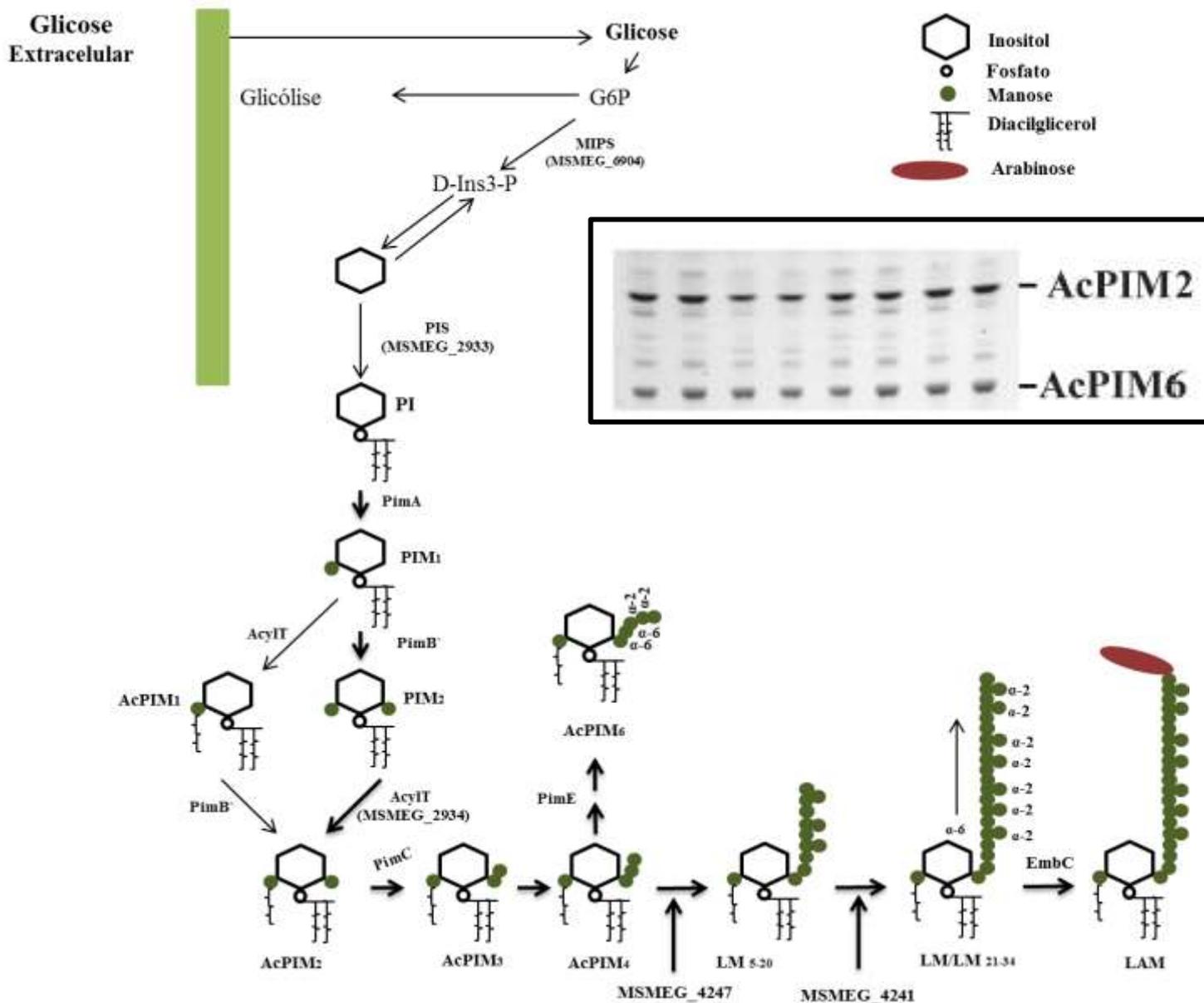
A biossíntese de PIM é iniciada pela atividade da enzima Manosiltransferase PimA que transfere a manose conjugada em uma molécula de Guanosildifosfato (GDP-Man) para a posição (2) do anel do Ins presente em PI, esta reação é mediada pela enzima PimA que é uma enzima essencial para o crescimento de *M. smegmatis*, este fato sugere que PIMs, LM e LAM, sejam molécula bioativas essenciais para viabilidade do bacilo (MORITA *et al.*, 2004).

O próximo passo na biossíntese de PIM também é sucedida por manosiltransferases como PIMB', que transfere a segunda manose para a posição (6) do anel de inositol, produzindo PIM<sub>2</sub>. Também pode ocorrer a transferência de um ácido graxo para a manose ligada na posição (2) do anel de inositol pela ação de uma Aciltransferase (AcylIT), constituindo a molécula AcPIM<sub>2</sub> (GUERIN, 2009; SMITH *et al.*, 2008).

Segundo Guerrin e colaboradores (2009), a adição do ácido graxo na biossíntese de AcPIM<sub>2</sub> em micobactérias ocorre pela ação das manosiltransferases PimA e PimB'. Esta biossíntese pode ocorrer de duas formas: (a) PI é duplamente manosilado para forma PIM<sub>1</sub> e PIM<sub>2</sub>, sucessivamente, e então PIM<sub>2</sub> seria acilado para forma AcPIM<sub>2</sub>; ou (b) PIM<sub>1</sub> é primeiramente acilado para forma AcPIM<sub>1</sub>, para então ser manosilado e forma AcPIM<sub>2</sub>. Ambos, AcPIM<sub>2</sub> ou Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> podem ser alongados com sucessivas adições de resíduos de manoses para formar espécies maiores de PIMs, tais como Ac<sub>1</sub>PIM<sub>3</sub>-Ac<sub>1</sub>PIM<sub>6</sub> ou Ac<sub>2</sub>PIM<sub>3</sub>-Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub> (Figura 06), sendo AcPIM<sub>2</sub> e AcPIM<sub>6</sub> ou Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> e Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub> as moléculas de PIMs mais acumuladas na parede celular de micobactérias.

Tem sido proposto que o terceiro resíduo de manose do PIM é adicionado a AcPIM<sub>2</sub> utilizando a enzima PimC, identificada no genoma de *M. tuberculosis* CDC1551 (KREMER, 2002). Embora esta enzima seja ausente no genoma de outras espécies de micobactérias tais como *M. smegmatis* e *M. tuberculosis* H37Rv, isto sugere que há uma via alternativa, que catalisa a transferência do quarto resíduo de manose para o AcPIM<sub>3</sub> ou Ac<sub>2</sub>PIM<sub>3</sub>. As formas AcPIM<sub>4</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>4</sub> são consideradas precursores comuns para a síntese das moléculas de LM/LAM assim como para PIMs maiores (AcPIM<sub>6</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub>). A adição de duas  $\alpha$ -1,2 manoses pela manosiltransferase PimE, ao invés de  $\alpha$ -1,6 manose, para AcPIM<sub>4</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>4</sub>, leva a formação de AcPIM<sub>6</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub> (MORITA *et al.*, 2006; PATTERSON *et al.*, 2003, MORITA *et al.*, 2004) (Figura 06).

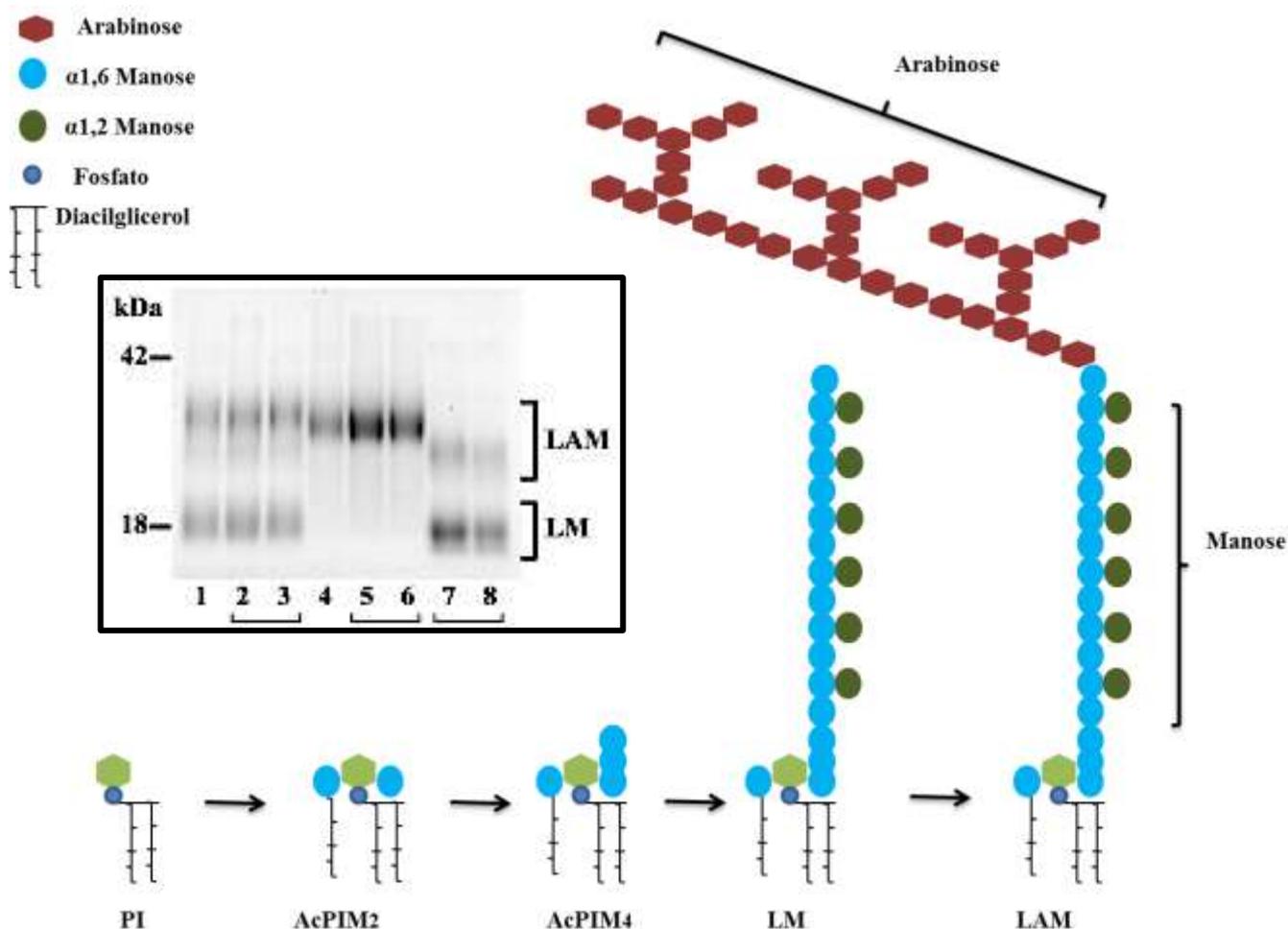
Cepas de *M. smegmatis*, mutantes para o gene *pimE*, mostraram severas anomalias morfológicas na estrutura da membrana plasmática, sugerindo que a síntese dessas altas espécies de PIMs é crítico para a manutenção da integridade da membrana plasmática desta micobactéria (KREMER *et al.*, 2002, MORITA *et al.*, 2004).



**Figura 06-** Representação esquemática da via metabólica que utiliza o inositol em *Mycobacterium smegmatis*. Esquema representativo da biossíntese de PIMs, mostrando a bifurcação em AcPIM<sub>4</sub> para produção de LM e LAM (Adaptado de MORITA *et al.*, 2011). No quadro está representado o perfil do acúmulo de PIMs por cromatografia de camada delgada (CCD), obtido da parede celular de *M. smegmatis* (Adaptado de SENA *et al.*, 2010).

#### 2.5.1.4. Lipomanana e Lipoarabinomanana

Moléculas de LM/LAM são originadas de AcPIM<sub>4</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>4</sub> que continuam o alongamento com  $\alpha$ -1,6 manoses, ao invés de ramificarem para formar AcPIM<sub>5</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>5</sub>. O alongamento com  $\alpha$ -1,6 manoses é continuado pela manosiltransferase MSMEG\_4241, construindo um esqueleto longo de manose com ramificações de  $\alpha$ -1,2 manoses, acrescentadas por outra manosiltransferase (MSMEG\_4247) (KOVACEVIC *et al.*, 2006; KAUR *et al.* 2006; KAUR *et al.* 2007; CRELLIN *et al.*, 2008) (Figura 07).



**Figura 07-** Via de biossíntese de LM e LAM. O fosfatidilinositol (PI) acumulado na parede celular de micobactéria dá origem a PIMs, LM e LAM através das enzimas manosiltransferases que induzem ramificação (verde) e alongamento (azul) do esqueleto de manose. No quadro, está representado perfis de LM e LAM após extração, separação em SDS-PAGE e coloração para carboidratos (Adaptado de SENA *et al.*, 2010).

A atividade dessas manosiltransferases formam a molécula de LM, cujo esqueleto de manose pode ser modificado pela adição de arabinoses pela atividade enzimática de arabinosiltransferases (EmbA, EmbB e EmbC) (MORITA *et al.*, 2010).

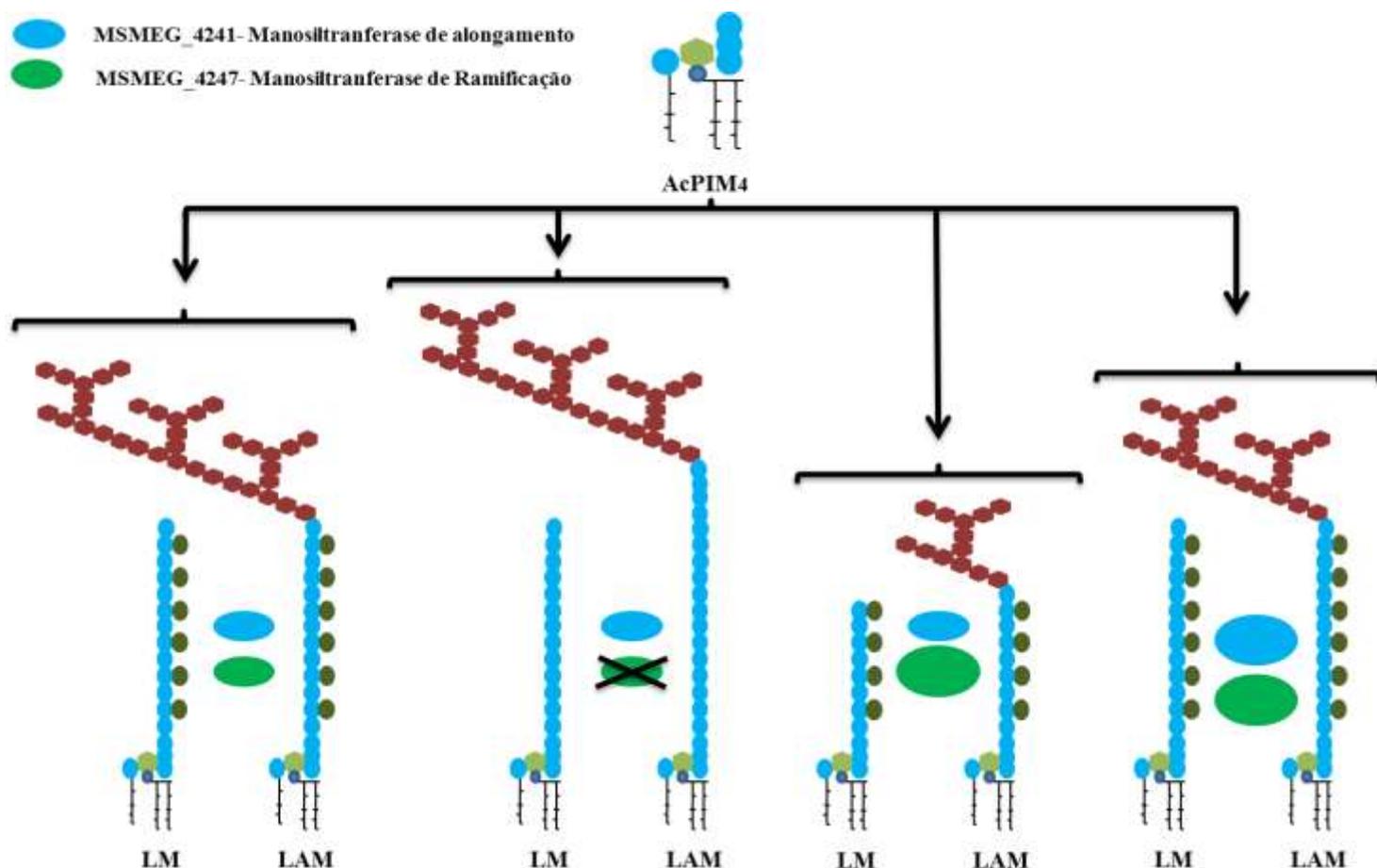
De acordo com o trabalho de Sena e colaboradores 2010, foi observado que a atividade da enzima de ramificação (MSMEG\_4247) está envolvida no controle do tamanho do esqueleto de manose das moléculas de LM/LAM, por competirem com as enzimas de alongamento (MSMEG\_4241) pela adição de manose. Foi proposto um balanço da atividade enzimática para alongar e ramificar o esqueleto de manose das moléculas de LM/LAM e caso ocorresse uma ramificação antes da molécula alongar, esta teria o alongamento terminado prematuramente (Figura 08). Estas modificações no esqueleto de manose também prejudicariam a atividade das arabinosiltransferases, comprometendo a adição de arabinose. O mesmo papel competitivo entre as manosiltransferases MSMEG\_4241 e MSMEG\_4247 foi observado em *M. tuberculosis* super expressando genes ortólogos (Rv2174 e Rv2181, respectivamente).

Fukuda e colaboradores (2013) reportaram que *M. tuberculosis* acumulando moléculas de LAM menores, em decorrência da super expressão da enzima de ramificação (Rv2181), apresentaram perda das características físico-químicas da parede celular, tornando o bacilo mais sensível a antibióticos, além de alterar a resposta imunomoduladora em macrófagos infectados.

A manosiltransferase de ramificação em *M. tuberculosis* (Rv2181) também adiciona  $\alpha$ -1,2 manoses após a região de arabinose, exclusivamente em moléculas de LAM proveniente de espécies patogênicas, conferindo uma molécula de LAM com capa de manose (manLAM) (CHATTERJEE *et al.*, 1993; VENISSE *et al.*, 1993; DINADAYALA *et al.*, 2006; KAUR *et al.*, 2008).

Diversos estudos tem demonstrado a atividade imunomoduladora de LM/LAM (BRIKEN *et al.*, 2004; TORRELLES *et al.*, 2010), porém seus papéis como componentes da parede celular da micobactéria ainda não são bem esclarecidos (PITARQUE *et al.*, 2008).

Esses achados sugerem que as moléculas de LM/LAM possuem um papel importante na manutenção da integridade da parede celular, assim como na patogenicidade desta micobactéria.



**Figura 08-** Biossíntese de LM/LAM envolvendo as enzimas manosiltransferases de alongamento (MSMEG\_4241) e ramificação (MSMEG\_4247). A molécula AcPIM<sub>4</sub> é conhecida por ser o ponto de ramificação para a produção de AcPIM<sub>6</sub> ou LAM e LM, o alongamento do esqueleto de manose de LM e LAM é regulado por uma competição entre as enzimas de alongamento e ramificação (MSMEG\_4241(azul) e MSMEG\_4247 (verde), respectivamente). Quando a enzima de ramificação acrescenta  $\alpha$ -1,2 manose antes de alongar com  $\alpha$ -1,6 manose, a manosiltransferase MSMEG\_4241 não consegue continuar o alongamento do esqueleto de manose, terminando o alongamento e com isso produzindo prematuramente LMs/LAMs menores o que também vai induzir na diminuição da adição de arabinose (Adaptado de SENA *et al.*, 2010).

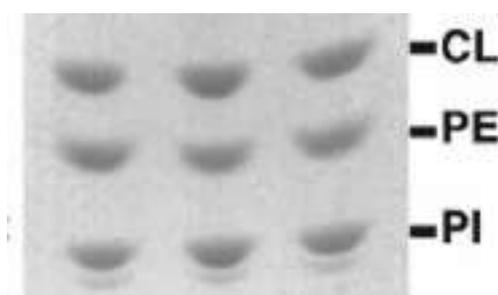
#### 2.5.1.5. Fosfolipídios

Alguns dos maiores componentes estruturais da membrana plasmática de micobactéria são os fosfolipídios tais como: cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) e fosfatidilinositol (PI). A taxa desses fosfolipídios depende da espécie de micobactéria e de suas condições de crescimento (NANDEDKAR *et al.*, 1983; KHULLER *et al.*, 1983). Cardiolipina é largamente encontrada tanto em procariotos como em eucariotos, este

fosfolipídio forma agregados na membrana biliar (MILEYKOVSKAYA *et al.*, 2001). Cardiolipina é parcialmente imobilizada e mais exposta a ambientes aquosos do que outros glicerofosfolipídios (LEWIS *et al.*, 2007). Embora a função fisiológica de CL não seja ainda tão esclarecida, suas propriedades físicas indicam que ela promove a interação membrana-proteína. De fato algumas micobactérias requerem CL para suas atividades (IMAI *et al.*, 1995; TOBARI, 1964).

Também já foi relatado que a grande quantidade de CL encontrada na parede celular de micobactérias está associada à membrana externa da parede celular (BANSAL, 2011). Cardiolipina é liberada do bacilo de *M. bovis*, quando este está residindo no fagossoma hospedeiro, sendo convertido a liso-CL pela fosfolipase hospedeira (FISCHER *et al.*, 2001). Este fato tem sugerido que a Liso-CL deve influenciar a resposta imune do hospedeiro durante a infecção.

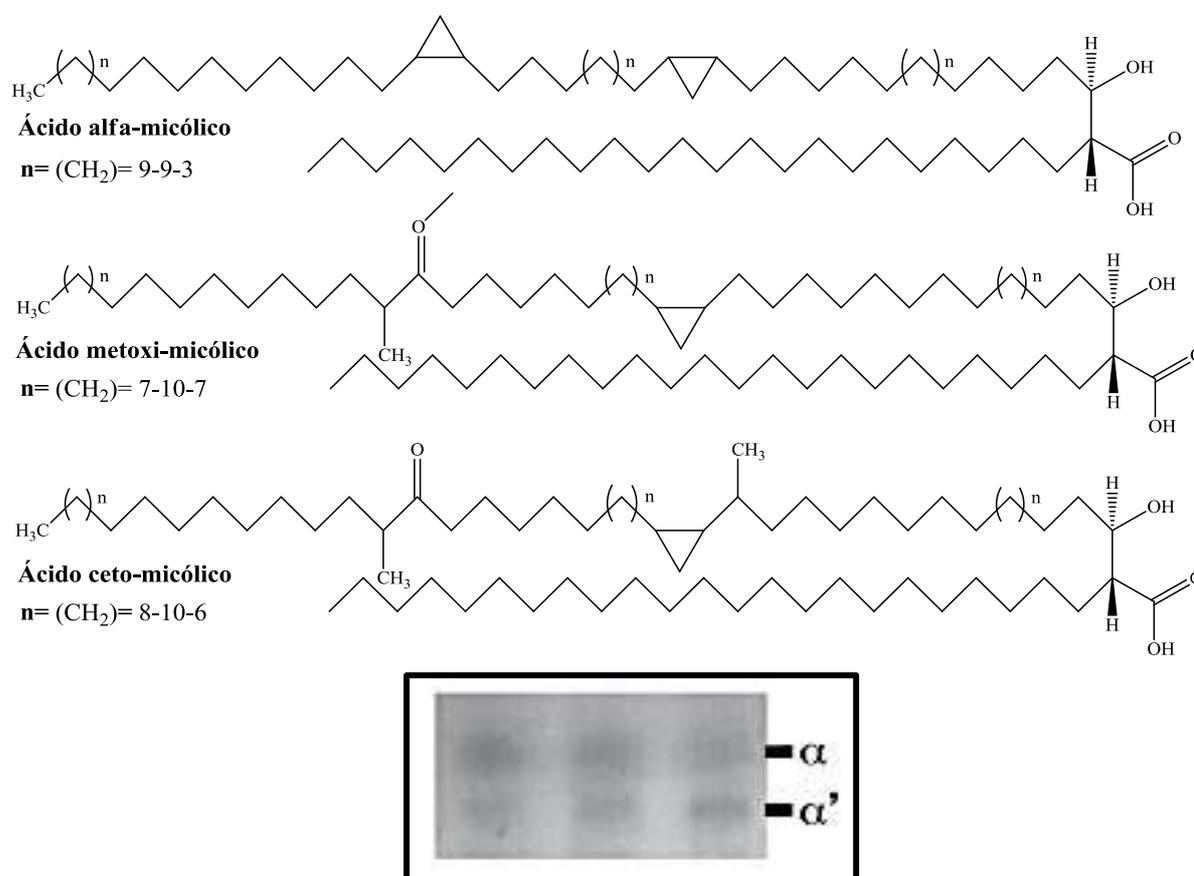
Fosfatidiletanolamina é outra maior classe de glicerofosfolipídios encontrada em micobactéria. Embora PE seja encontrada em todos os organismos, ela é particularmente abundante na membrana plasmática de bactérias (MURZYN *et al.*, 2005). A função de PE ainda permanece indeterminada a nível molecular, ela parece desempenhar um papel importante como componente da membrana plasmática. Como por exemplo, TBsmr, uma pequena família de proteínas de *M. tuberculosis* de múltipla resistência a fármacos, que mostra uma elevada atividade catalítica quando PE é suplementado no lipossomo reconstituído (CHARALAMBOUS *et al.*, 2008).



**Figura 09** – Perfil de fosfolipídios de *M. smegmatis* em Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Frações lipídicas da delipidação da parede celular da micobactéria, foram separadas por CCD e marcadas por reagente spray de azul de molibdênio (marcador específico para fosfolipídios). As bandas equivalem a Cardiolipina (CL), Fosfatidiletanolamida (PE) e Fosfatidilinositol (PI). (Adaptado de FUKUDA *et al.*, 2013).



ácidos graxos é essencial para a sobrevivência intracelular deste patógeno. Cerca de 40-60% da parede celular seca de micobactéria é composta de lipídios (GOREN, 1972).



**Figura 11** – Estruturas químicas dos ácidos micólicos presentes na membrana externa de micobactérias. A figura acima ilustra os três principais tipos de ácidos micólicos: alfa, metoxi e ceto. Os ácidos alfa-micólicos compreendem pelo menos 70% dos ácidos micólicos presentes nesses micro-organismos e contêm vários anéis de ciclopropano. Os ácidos metoxi-micólicos contêm grupos metoxi e compreende de 10 a 15% dos ácidos micólicos, os restantes são ácidos ceto-micólicos contendo grupos cetonas em sua estrutura. No quadro está representado o perfil de ácidos micólicos, após CCD e coloração para ácidos micólicos, mostrando os ácidos  $\alpha$ -micólicos e  $\alpha'$ -micólicos (Adaptado de FUKUDA *et al.*, 2013).

Os ácidos micólicos também são usados como precursores de componentes da membrana plasmática, como os fosfolipídios e os glicolipídios. Em micobactérias, eles ainda formam uma membrana hidrofóbica que confere proteção à parede celular. Os ácidos micólicos estão covalentemente ligados a trealose e a arabinogalactano na parede celular de *M. tuberculosis* (BRENNAN, 1989; TAKAYAMA *et al.*, 2005).

Devido a essa integração, os ácidos micólicos estão associados diretamente com a integridade e características físico-químicas da parede celular de micobactérias.

### 2.5.1.8. BIOSSÍNTESE DE ÁCIDOS GRAXOS

O *M. tuberculosis* codifica dois tipos distintos de sistemas enzimáticos para a biossíntese de ácidos graxos, denominados FAS I e II (*fat acid Synthesis* I e II). Os estudos sobre a síntese de ácidos graxos em micobactéria começou em 1970, quando *M. smegmatis* mostrou possuir os dois tipos de sínteses a FAS I, que envolve uma variedade de polipeptídios multifuncionais, e a FAS II, que consiste de uma série de enzimas distintas (BLOCH, 1977).

A biossíntese de ácidos graxos em micobactéria é iniciada por uma única enzima multifuncional FAS I que catalisa a síntese *de novo* de longas cadeias de acetil-CoAs (C16:0 e C18:0), utilizando malonil-CoA para formar butiril-S-ACP (Proteína Acil-carregadora-S-Butiril).

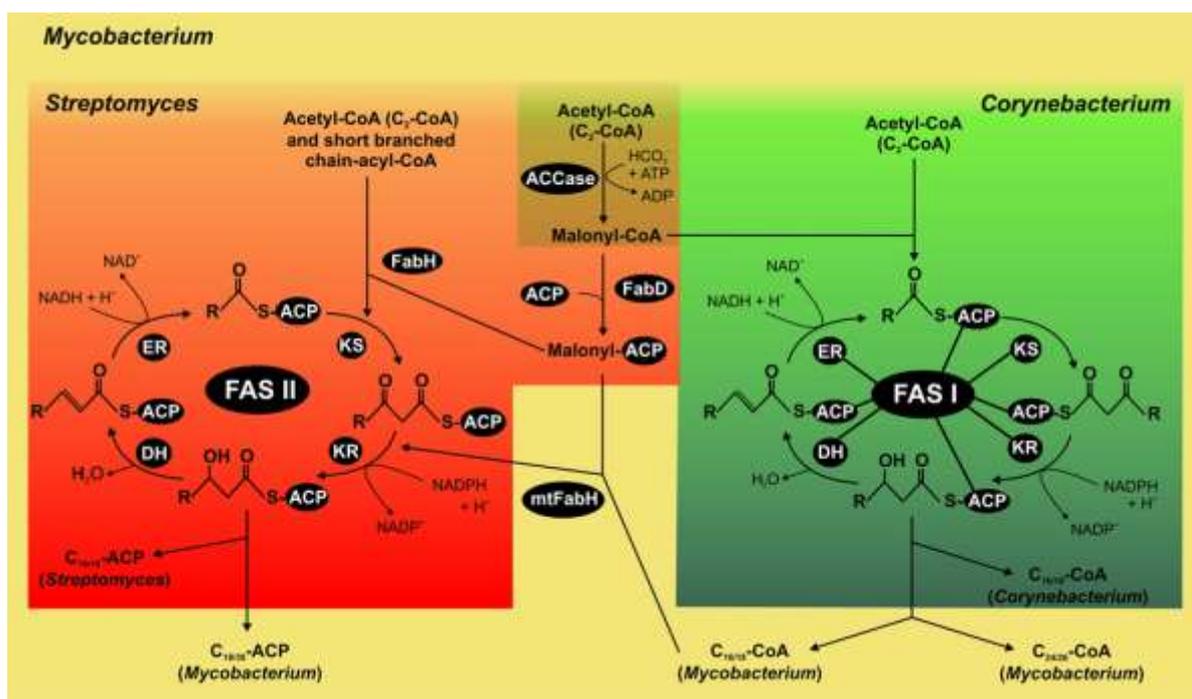
Como mostrado na figura 12, a primeira enzima envolvida no sistema FAS II é a acetil-CoA carboxilase (ACCase), que produz como produto o malonil-CoA, cujo grupo malonato é transferido à ACP (proteína transportadora de acila) pela malonil-CoA-ACP transacilase (FabD) para formar malonil-ACP (GAGO *et al.*, 2010).

A biossíntese de ácidos graxos propriamente dita é iniciada pela condensação de malonil-ACP e acetil-CoA, catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-ACP sintase III (FabH), resultando em  $\beta$ -cetobutiril-ACP. Logo após, ocorrem várias etapas cíclicas, que são repetidas até que um determinado ácido graxo saturado de comprimento apropriado seja produzido. A primeira etapa de tal ciclo, catalisada pela  $\beta$ -cetoacil-ACP redutase (KR), é a redução NADPH-dependente do grupo cetona por um grupo hidroxila. Em seguida, a molécula é desidratada pela  $\beta$ -hidroxiacil-ACP desidratase (DH), formando *trans*-2-enoil-ACP. A etapa final é a redução da dupla ligação do intermediário enoil pela NADPH-dependente *trans*-2-enoil-ACP redutase (ER) para formar acil-ACP (HEATH, WHITE, ROCK, 2001).

Dessa forma, a biossíntese de ácidos graxos, produzindo C16:0- e C18:0-S-ACP pode convertê-los tanto para os derivados de CoA ou serem utilizadas principalmente para a síntese de fosfolipídios da membrana, ou ainda produzir a C24:0-S-ACP mais alongados em micobactérias de rápido crescimento como o *M. smegmatis* (BLOCH & VANCE, 1977; PETERSON & BLOCH, 1977) e a C26:0-S-ACP em *M. bovis* e *M. tuberculosis* de crescimento lento, pelo FAS I (KIKUCHI *et al.*, 1992).

Nos últimos anos, estudos de reconstituição de células livres da parede celular de micobactérias tem demonstrados que vários destes componentes são sintetizados a partir de moléculas de Acetil-CoA, mais provavelmente derivadas a partir da via de biossíntese de

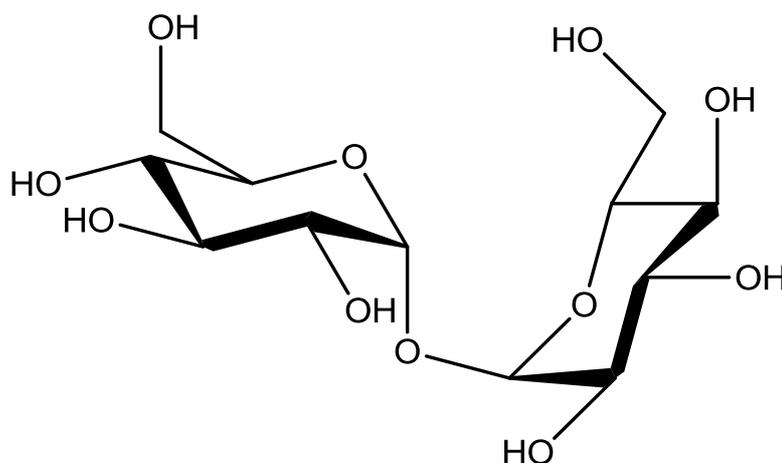
ácidos graxos (SIRAKOVA *et al.*, 2001; ONWUEME *et al.*, 200.; TRIVEDI *et al.*, 2005). Outra característica marcante das micobactérias é a síntese *de novo* de ácidos graxos (FAS I), este sistema sintetiza não somente ácidos graxos, mas também é dedicado a construção de fosfolipídios de membrana, lipídios neutros e triacilglicérides (DANIEL *et al.*, 2004; ARABOLAZA *et al.*, 2008).



**Figura 12** – Modelo comparativo de biossíntese de ácidos graxos em actinomicetos: *Streptomyces*, *Corynebacterium* e *Mycobacterium*. A biossíntese de ácidos graxos para *Mycobacterium* e *Corynebacterium* spp, é iniciada pela carboxilação do Acetil-CoA para produzir malonil-CoA esta reação é catalisada pelo complexo ACCase multifuncional (castanho). Malonil-CoA e Acetil-CoA são condensados para serem utilizados pela síntese de ácido graxos I, que consiste na biossíntese, *de novo*, de ácidos graxos (verde). Em *Streptomyces* malonil-CoA é convertido a malonil-ACP através do FabD e, em seguida condensado a acetil-CoA para produzir através do FabH β-cetoacil-ACP, que é o produto usado pelo sintese de ácido graxos II (vermelho), *Streptomyces* não utiliza o sistema FAS I. Os passos de alongamento de ácidos graxos consistem de varias reações consecutivas em ambos os sistemas. Em *Mycobacterium* ambos os sistemas estão presentes, o sistema FAS I para a biossíntese *de novo* de ácidos graxos e o FAS II para o alongamento de ácidos graxos para a produção de ácido micólico. As características diferenciais de *Mycobacterium* são mostradas em amarelo (GAGO *et al.*, 2010).

### 2.5.1.9. Trealose Dimicolato

Trealose é um dissacarídeo composto por duas moléculas de glicose ligadas por uma ligação 1,1alfa, alfa. A molécula de trealose encontra-se distribuída amplamente na natureza e é uma das principais fontes de energia encontrada em muitos organismos, incluindo bactérias, fungos, insetos, plantas e invertebrados (HIGASHIYAMA, 2002) (Figura 13).

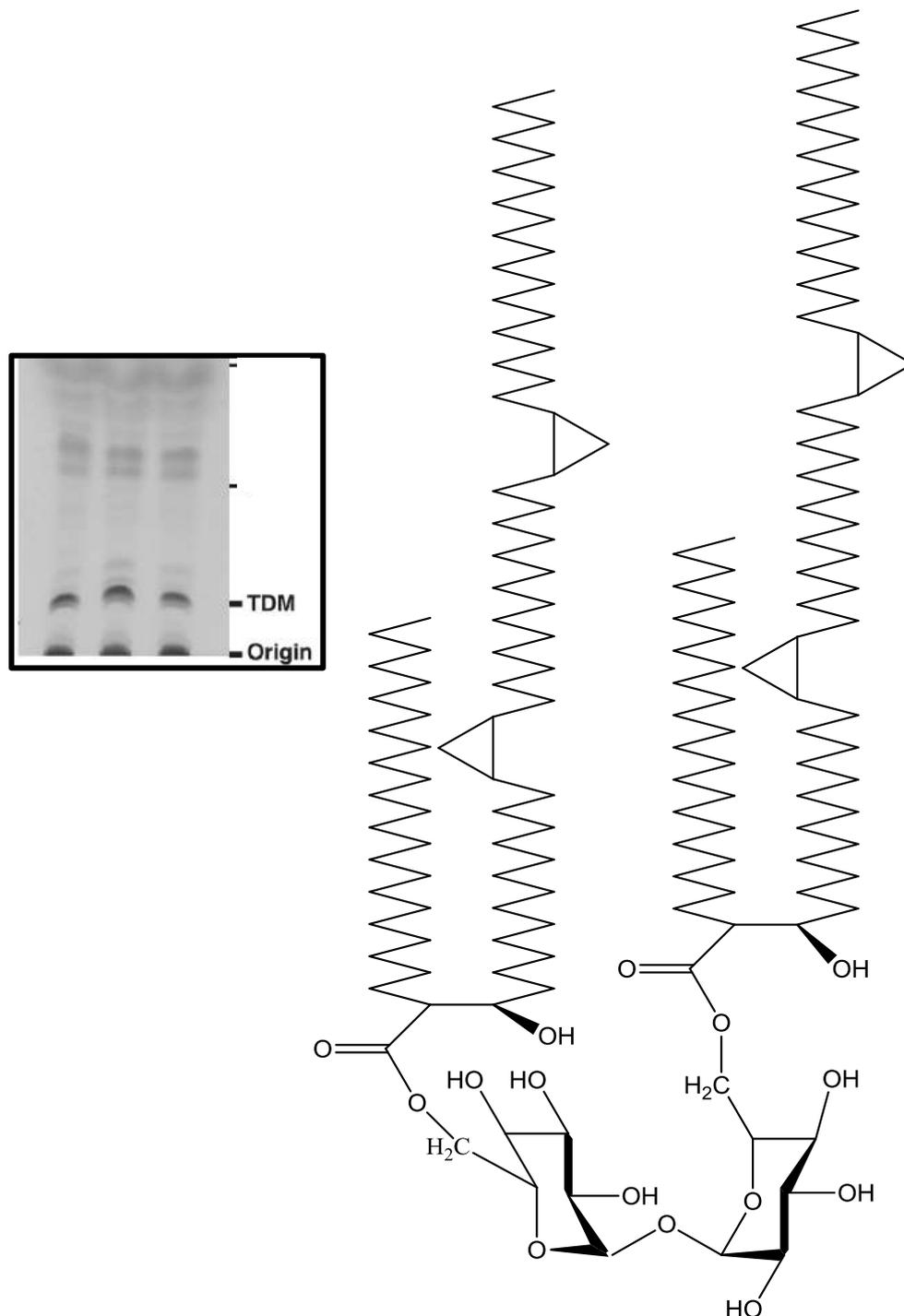


**Figura 13** – Estrutura química de Trealose. A trealose é uma molécula formada pela desidratação de duas outras moléculas de glicose (LANGFORD, 2010).

No ano de 1950 Hubert Bloch juntamente com Noll e colaboradores iniciaram uma série de investigações relacionadas aos componentes de virulências de micobactérias, com isso eles chegaram a definir a estrutura química do trealose dimicolato um glicolípido formado através de uma molécula de trealose esterificada com moléculas de ácidos micólicos. A esterificação na posição (6) ou na posição (6,6) de um núcleo de trealose originam trealose 6- monomicolato (TMM) ou trealose 6,6- dimicolato (TDM) ou ainda fator corda como este glicolípido também é conhecido (HSU *et al.*, 2011) (Figura 14). É comum que bactérias se organizem em comunidades estruturais, coordenadas e funcionais, chamadas de biofilmes. Esta organização é embebida em matrizes poliméricas produzidas pelas próprias bactérias. No caso de micobactérias, o crescimento em biofilmes requer que TDM do envelope seja hidrolisado por uma esterase específica de TDM liberando ácidos micólicos (OJHA *et al.*, 2010). O estudo de Yano (1998) mostrou que TDM é o lipídio mais tóxico e granulogênico extraído da superfície da parede celular de *M. tuberculosis*.

Trealose dimicolato é responsável por desenvolver várias atividades biológicas na infecção por micobactérias, incluindo imunomodulação por participar da inibição da fusão

do fagossomo com o lisossomo impedido deste modo a destruição do bacilo pelos macrófagos alveolares (INDRIGO *et al.*, 1979, LEMAIRE *et al.*, 1986). TDM também induz a produção de citocinas pró-inflamatória e a formação de granuloma caseoso associada à tuberculose (RHOADES *et al.*, 2005; GEISEL *et al.*, 2005).



**Figura 14** - Estrutura do glicolípido Trealose dimicolato (TDM). O TDM da parede celular de *Mycobacterium* é formada pela esterificação de dois núcleos de ácidos micólicos. No quadro esta a representação do perfil de TDM, após CCD e coloração específica (Adaptado de FUKUDA *et al.*, 2013).

A atividade inflamatória do TDM é importante para o desenvolvimento de uma resposta imunitária específica para o bacilo da tuberculose, uma vez que é responsável pelo recrutamento e manutenção de um grande número de macrófagos ativados em torno da lesão, permitindo deste modo a sobrevivência do bacilo no hospedeiro (SILVA & FAZIOLI, 1985).

Assim, ácidos micólicos, TDM e TMM, juntos com fosfolipídios (CL, PE e PI), e glicolipídios (PIMs, LM e LAM), desenvolvem um papel, não somente de preenchimento do folheto externo da bicamada lipídica, mais também de constituintes bioativos durante a infecção (BRENNAN & NIKAIDO, 1995).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a possível modulação de constituintes lipídicos da parede celular do *Mycobacterium smegmatis*, após o consumo de colesterol como fonte principal de energia e carboidratos.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o perfil dos constituintes lipídicos da parede celular do *Mycobacterium smegmatis*: (Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs); Fosfolipídios; Glicopeptídeolipídios (GPLs); Trealose dimicolato (TDM) e Ácidos micólicos), após o cultivo em meio pobre de nutrientes contendo colesterol.
- b) Analisar a propriedade físico-química da parede celular pelo método de marcação fluorescente de auramina.
- c) Verificar possíveis alterações da permeabilidade da parede celular induzida por colesterol mediante sua propriedade hidrofóbica.
- d) Relacionar as mudanças de constituintes da parede celular com suscetibilidade e/ou resistência a antibióticos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. CULTIVO 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 líquido 7H9, suplementados com 10% DC (Glicose e NaCl) e 0,05% de Tween80.

O cultivo inicial foi realizado por um período de 3 dias em placas de petri contendo meio ágar Middlebrook 7H10, utilizando estufa bacteriológica com temperatura de 37°C. Após crescimento satisfatório, uma colônia desta placa foi inoculada em um erlenmeyer contendo 20 mL do meio líquido 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 utilizando comprimento de onda de 600 nm, seguindo o protocolo adaptado de Griffin *et al.*, (2012), onde 200 µL da bactéria em cultivo na fase estacionária (volume equivalente a uma densidade ótica O.D.600 = 0,05) foi inoculado em um novo erlenmeyer para o início do experimento em meio líquido 7H9 ou Meio Mínimo (MM), suplementado com 0,1% de glicerol ou 0,01% de colesterol diluídos em solução contendo tilaxapol e etanol (1:1 v/v). Sendo o meio 7H9 composto de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g/L), L-glutâmico (0,5 g/L), Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (0,1 g/L), Vitamina B6 (1 mg/L), Biotina (0,5 mg/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.xFe<sub>3</sub><sup>+</sup>.yNH<sub>3</sub> (0,04 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,05 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,5 mg/L), ZnSO<sub>4</sub> (1 mg/L) e CuSO<sub>4</sub> (1 mg/l), e o MM composto de asparagina (0,5 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 g/L), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,5 g/L), NH<sub>4</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O (50 mg/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,5 g/L), ZnSO<sub>4</sub> (0,1 mg/L).

Deste modo, foram analisados somente a fase estacionária de ambos os meios (7H9/ MM), pois é nessa fase que se observa mudanças mais significativas na composição dos constituintes químicos da parede celular do bacilo conforme as condições de cultivo: (1) 7H9+Glicerol (grupo Controle) e (2) MM. O grupo MM foi subdividido em 4 outros grupos: (2A) MM+Glicerol; (2B) MM+Glicerol+Colesterol; (2C) MM+Colesterol e somente MM (2D), contabilizando um total de 5 grupos.

## 4.2. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS LIPÍDIOS DA PAREDE CELULAR DE *M. smegmatis*.

As células obtidas de cada cultura líquida foram coletadas nas fases de crescimento estacionário, através da análise do padrão de crescimento, descrito anteriormente. Seguindo o protocolo descrito por Sena *et al.*, (2010), um volume de cada amostra em cultivo foi coletado e transferido para tubos de 15 mL previamente pesados. As amostras foram submetidas à 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 de cada amostra precipitada, necessário para adição do volume de solventes, correspondentes ao peso de cada amostra.

Para a extração do conteúdo lipídico (delipidação) da parede celular bacteriana foi utilizado o protocolo descrito por Sena *et al.*, (2010), onde cada precipitado celular foi incubando sequencialmente 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 iniciada e finalizada com centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos. O conteúdo lipídico dos sobrenadantes, após cada centrifugação, foi combinado em um único tubo, para posterior purificação.

Para a purificação de fosfatidilinositol manosídeos (PIMs), fosfolipídios, glicopeptidiolipídios (GPLs) e trealose dimicolato (TDM) foram utilizadas alíquotas de 1200 µL de cada amostra, que foram secas em corrente de gás nitrogênio a 70°C. As amostras devidamente secas foram purificadas por partição utilizando solução de 1-butanol:água (1:1 v/v). A fase aquosa de 1-butanol contendo a fração lipídica foi por fim concentrada em centrifuga a vácuo e consecutivamente restituída em 40 µL da mesma solução de 1-butanol:água.

#### 4.2.1. ANÁLISE DE FOSFATIDILINOSITOL MANOSÍDEOS (PIMs) E FOSFOLIPÍDIOS

Para a análise de PIMs e fosfolipídios foi utilizado o protocolo descrito por Sena e colaboradores (2010), onde 6  $\mu$ L de cada amostra foram transferidos para uma cromatoplaça de camada delgada, revestida com sílica gel-60. A separação das amostras lipídicas foi efetuada por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) tendo como fase móvel solução de clorofórmio: metanol: amônia (1M): acetato de amônia (13M): água (180:140:9:9:23 v/v/v/v/v).

Após o término da CCD, os PIMs foram visualizados usando solução reveladora de Orcinol em ácido sulfúrico (marcador de carboidratos). Após borrifar a solução por toda a extensão da placa, a mesma foi aquecida a 90°C até o aparecimento das bandas com coloração marrom referentes à AcPIM<sub>2</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> e AcPIM<sub>6</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub>. Para visualização de fosfolipídios foi borrifada a solução reveladora azul de molibdênio (marcador de fosfato) revelando em temperatura ambiente bandas de coloração azul referentes à CL, PE e PI.

#### 4.2.2. ANÁLISE DE GLICOPEPTIDEOLIPÍDIOS (GPLs) E TREALOSE DIMICOLATO (TDM)

Para a análise de glicopeptideolipídios e trealose dimicolato foi utilizado o protocolo descrito por Fukuda e colaboradores (2013), onde 12  $\mu$ L de cada amostra dos lipídios purificados foram aplicados em uma cromatoplaça, revestida com sílica gel-60, sendo utilizada como fase móvel uma solução eluente de clorofórmio: metanol (9:1 v/v). As visualizações dos grupos GPLs e TDM foram obtidas após borrifar solução reveladora de ácido sulfúrico 10% em metanol por toda a extensão da placa e aquecimento da mesma a 90°C até o aparecimento de bandas marrons correspondentes a GPLs e TDM.

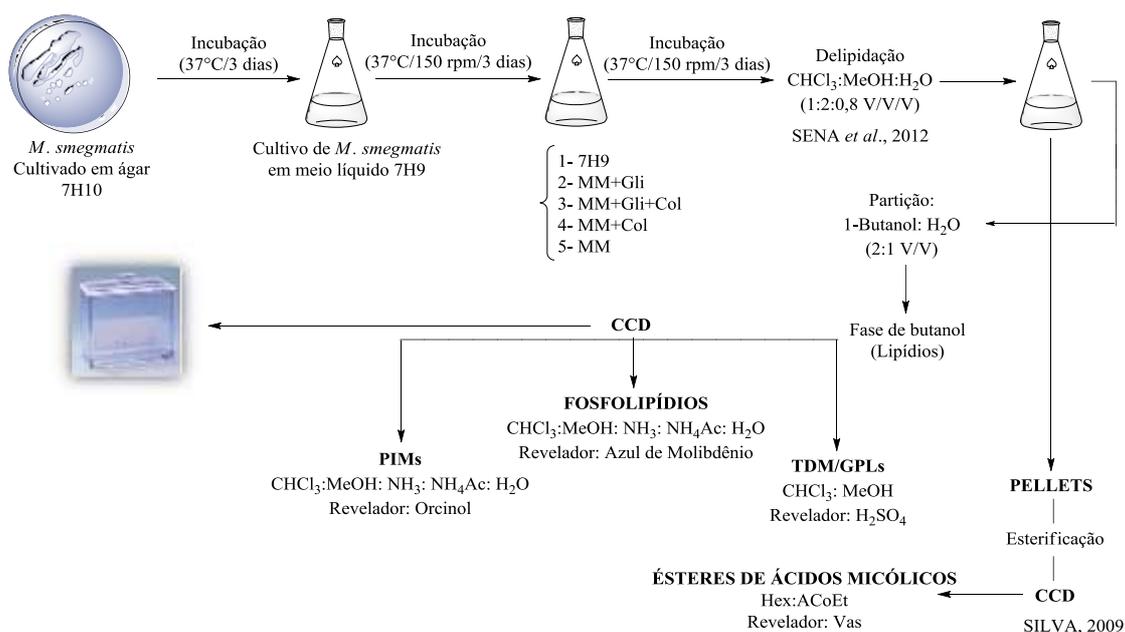
#### 4.2.3. EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE ÁCIDO MICÓLICO

Para a determinação de micolato de metil éster utilizamos as células do pellet, após delipidação como descrito por Silva, 2009. Os precipitados celulares foram restituídos proporcionalmente ao peso de cada amostra com solução de metanol: tolueno: ácido sulfúrico (30/15/1 v/v/v), objetivando extrair os micolatos, através de uma reação de esterificação, onde as amostras ficaram por 12 horas em contato com a solução extratora em banho-maria a 75°C. Após este tempo as amostras foram resfriadas a temperatura ambiente

para adição de 1 mL de hexano com subsequente agitação em vortex. As amostras foram deixadas em repouso para separação em duas fases, e em seguida a fase superior (contendo os micolatos de metil éster) foi coletada e mantida a 45°C para a evaporação do hexano.

Os resíduos secos de micolatos foram resuspenso em 40 µL de hexano, e 12 µL de cada amostra de micolato foram aplicadas em uma cromatoplaça de sílica gel-60. A eluição foi realizada por uma solução de hexano: acetato de etila (95:5 v/v). Para visualização dos micolatos de metil éster, a placa foi borrifada com solução reveladora de vas (marcador de ácidos graxos) por toda a sua extensão, com posterior aquecimento a 150°C para obtenção de bandas com coloração marrons correspondentes aos micolatos de metil éster.

As imagens de cada cromatoplaça foram digitalizadas utilizando scanner de mesa com ajustes de contraste e intensidade de bandas pelos programas PhotoScape e Image-J.



**Esquema 1-** Cultivo e análise do perfil cromatográfico dos lipídios da parede celular de *M. Smegmatis*.

#### 4.3. ANÁLISE DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE MARCAÇÃO FLUORESCENTE DE AURAMINA

A determinação da natureza ácido resistente do bacilo foi realizada pelo método de coloração por auramina fenólica. Esta técnica foi utilizada, pois os ácidos micólicos existentes na parede celular das micobactérias têm a capacidade de se ligarem ao corante auramina, resistindo à descoloração por álcool-ácido. Um corante de contraste é empregado para destacar o organismo corado e facilitar seu reconhecimento ao microscópio (COSTA, 1988).

Para verificarmos a propriedade físico-química da parede celular do bacilo cultivado nos diferentes meios de cultura utilizamos o Kit de coloração Fluorescent Stain Kit for Mycobacteria (Fluka/Sigma-Aldrich). Precipitados celulares de cada meio de cultura foram resuspenso em 20 vezes o peso de seus pellets em PBS, para se obter a mesma concentração bacteriana em todos os grupos do estudo, em seguida 5 µL de cada cultura foram secos na superfície de lâminas de vidro e fixadas por chama, para então as lâminas serem imersas na solução de auramina fenólica por 15 minutos, após foram lavadas com água destilada para a retirada do excesso do corante, seguida da imersão das lâminas numa solução de álcool-ácido por 3 minutos e enxaguadas novamente com água destilada para a retirada do excesso. As amostras coradas foram visualizadas em objetiva de imersão (100x) do microscópio de fluorescência (ZEISS Scope. A1), utilizando filtro de excitação de 340-380 nm.

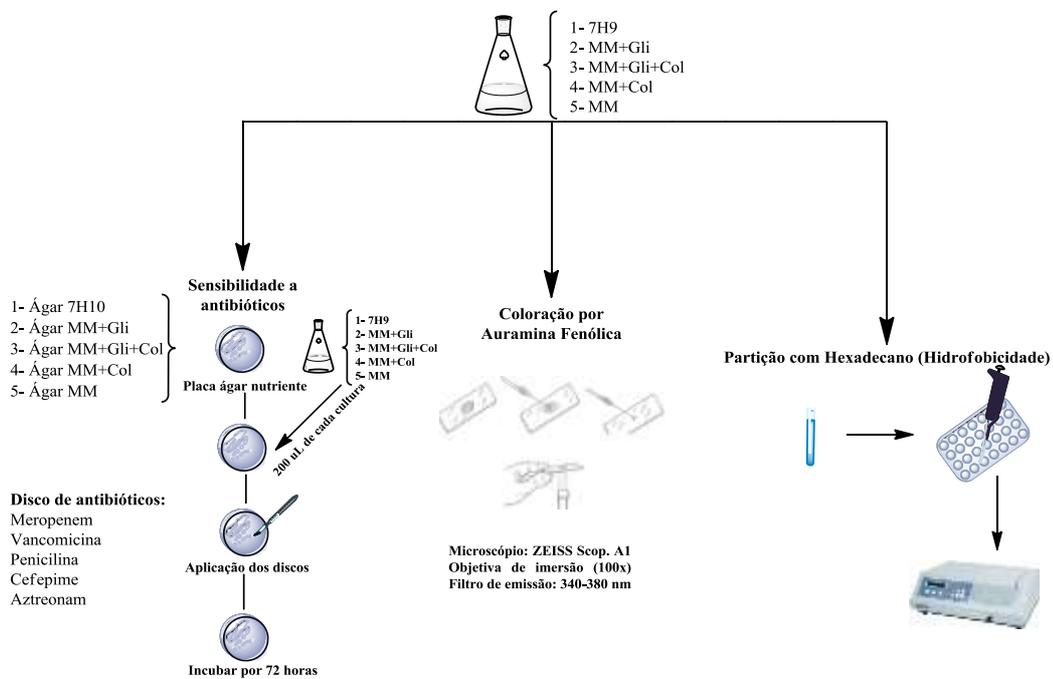
#### 4.4. ANÁLISE DA HIDROFOBICIDADE DA PAREDE CELULAR

Para verificarmos possíveis alterações na permeabilidade da parede celular induzida pelo consumo de colesterol, utilizamos o protocolo descrito por Morita *et al.*, (2006), com modificações no volume final do teste, ajustado para suprir a nossa demanda de material biológico. Partindo das células em cultivo como descrito anteriormente, volumes equivalente a 0,5 D.O.<sub>(600 nm)</sub> de cada grupo de estudo foram coletados e centrifugados. Os precipitados de células foram resuspenso em 750 µl de PBS e misturados com 0, 5, 10 e 25 µl de hexadecano, utilizando vortex por 2 minutos, seguido de descanso por 15 minutos para partição em duas fases. Após este período, alíquotas de 150 µl da porção aquosa foram coletadas e transferidas para uma placa de 96 poços para mensuração da absorbância ( $A_{600nm}$ ). O declínio da absorbância pela adição de hexadecano é proporcional a

hidrofobicidade da parede celular bacteriana, podendo ser usado como forte indicador dessa característica físico-química.

#### 4.5. ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Para avaliar o perfil de susceptibilidade do *M. smegmatis* a antimicrobianos que tem ação na biossíntese de constituintes da parede celular bacteriana, as amostras em estudos foram submetidas aos seguintes antimicrobianos meropenem (10 $\mu$ g), vancomicina (30 $\mu$ g), penicilina (10 $\mu$ g), cefepime (30 $\mu$ g) e aztreonam (30 $\mu$ g) através do método de difusão em disco, segundo metodologia de Kirby-Bauer. As células em cultivo nos respectivos meios de cultura foram coletadas, após 72 horas de incubação, foram centrifugadas e resuspensas em 20 vezes o peso de seus pellets em PBS, para se obter a mesma concentração bacteriana, depois dessa fase o antibiograma foi realizado em placa contendo ágar 7H10 e ágar MM modificado correspondente a cada cultura do estudo (MM+Gli, MM+Gli+Col, MM+Col, MM). Foram inoculados 200  $\mu$ L de cada cultura líquida nas suas respectivas placas sendo semeadas em três direções, seguindo com aplicação dos discos sobre a superfície do ágar, estas foram incubadas em estufa por 3 dias. Para avaliação da sensibilidade foi utilizado um paquímetro para determinação do tamanho do halo de inibição do crescimento ao redor de cada disco, considerado em milímetros. O experimento foi realizado em triplicatas.



**Esquema 2-** Análise das propriedades físico-químicas da parede celular de *M. smegmatis*.

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos em média e desvio padrão das triplicatas usando o programa *Microsoft Excel* (2007). Para análise estatística utilizou-se o programa *Biostat 5.0*, verificando a análise de variância ANOVA, seguido do *teste de Tukey*. Todos os testes estatísticos consideraram probabilidade (p-valor) significativa quando  $\leq 0,05$ .

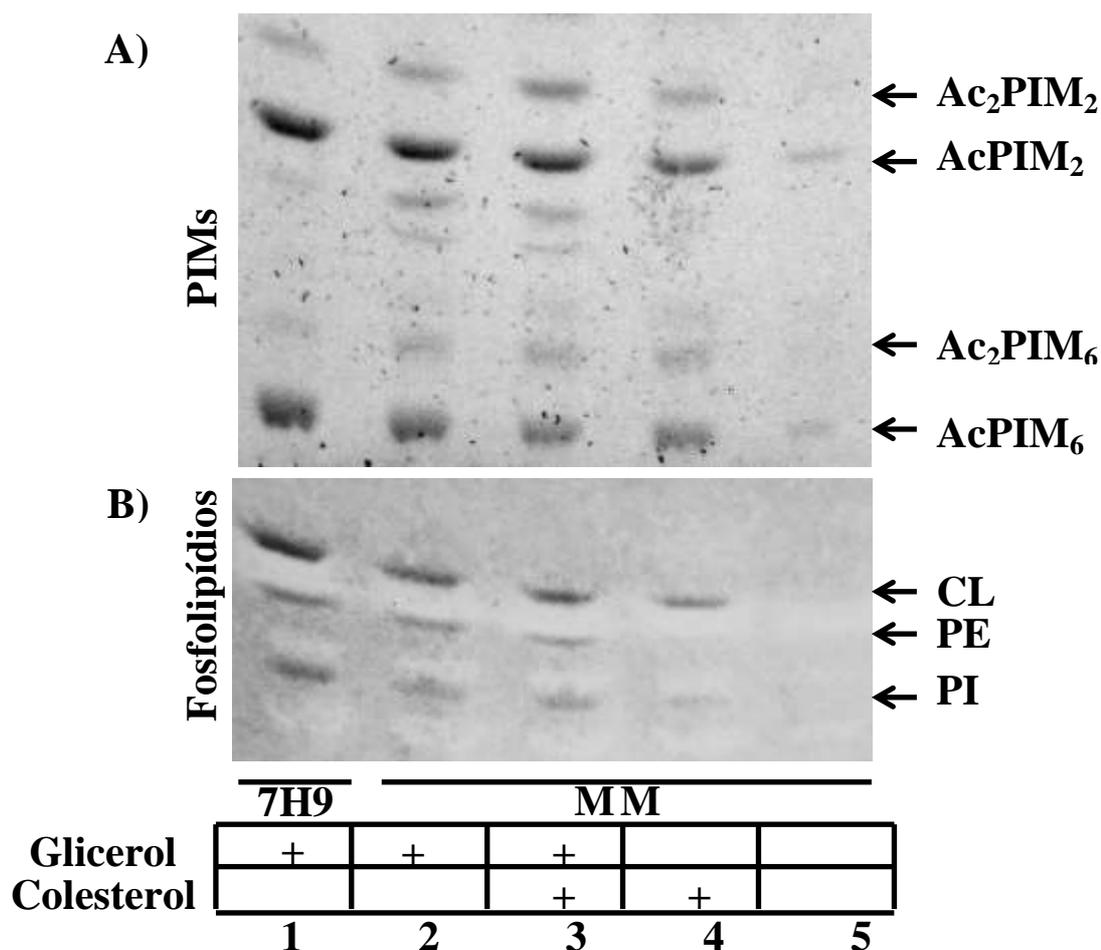
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. PERFIS DE PIMS E FOSFOLIPÍDIOS EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA

Utilizando a técnica de cromatografia de camada delgada (CCD) realizada com objetivo de verificar possíveis mudanças no acúmulo de constituintes lipídicos da parede celular da micobactéria (*M. smegmatis*), após esta ser submetida a meios nutricionais específicos, foi revelado que, apesar da escassa concentração de nutrientes em Meio Mínimo (MM), a micobactéria cultivada com fontes alternativas de carbono e energia (Glicerol e/ou Colesterol), consegue manter o acúmulo das moléculas AcPIM<sub>2</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> e AcPIM<sub>6</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub> sem grandes diferenças que possam alterar o perfil de PIMs (Figura 15A, grupos 1 – 4). Entretanto no grupo MM, que não possui suplementação com glicerol e/ou colesterol, o bacilo demonstrou ter dificuldades em acumular PIMs em sua parede celular, quando comparado aos demais grupos que obtiveram o glicerol e/ou colesterol como suplemento. Este resultado mostra a dependência de uma fonte de carbono para manter constante o acúmulo desses lipídios.

A análise de CCD para fosfolipídios (Cardiolipina – CL Fosfatidiletanolamida – PE e Fosfatidilinositol – PI) mostrou que estes componentes da parede celular da micobactéria também são encontrados sem maiores alterações durante o crescimento em MM, quando comparado ao grupo controle (7H9 + Glicerol), principalmente quando o cultivo é realizado na presença do glicerol e/ou Glicerol + Colesterol (Figura 15B, grupos 1 – 3). Por outro lado, o acúmulo de fosfolipídios, principalmente PE e PI, foi diminuído quando o cultivo foi realizado em MM suplementado somente com colesterol (Figura 15B, grupo 4). Quando não houve suplementação os níveis de fosfolipídios acumulados, em geral, foram drasticamente comprometidos, corroborando com os dados de PIMs (Figura 15A).

Esses resultados mostram que o bacilo em microambiente pobre de nutriente, contendo o colesterol como principal fonte de carbono e energia, é capaz de sintetizar fosfolipídios e acumular PIMs a níveis compatíveis com os encontrados em meio 7H9 ou MM suplementados com glicerol, não comprometendo a estrutura da superfície micobacteriana para constituintes lipídicos mais simples.



**Figura 15** - Perfil de Fosfatidilinositol manosídeos (PIMs) e Fosfolipídios extraídos da parede celular do *M. smegmatis*, após cultivo em meio pobre de nutriente, contendo glicerol e/ou colesterol como fonte de carbono e energia. (A) acúmulo de PIMs (AcPIM<sub>2</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>2</sub> e AcPIM<sub>6</sub>/Ac<sub>2</sub>PIM<sub>6</sub>) e (B) Fosfolipídios (Cardiolipina – CL; Fosfatidiletanolamina – PE; fosfatidilinositol – PI) após o cultivo em meio 7H9 ou Meio Mínimo (MM) suplementado com glicerol e/ou colesterol.

O estudo de Morita e colaboradores (2006), confirmado através de microscopia eletrônica de transmissão, com cepas mutantes para manosiltransferases de *M. smegmatis*, demonstrou que PIMs são os precursores da via de biossíntese dos gliconjugados da parede celular de micobactérias. Através desses estudos PIMs foi caracterizado como molécula de papel fundamental para a integridade da parede celular deste bacilo.

Dessa forma, os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o crescimento de micobactérias em microambiente pobre de nutriente, porém obtendo o colesterol como principal fonte de carbono e energia, como ocorre durante a infecção, não altera expressivamente o acúmulo de moléculas lipídicas menores da parede celular, como PIMs, o que justifica a preservação da biossíntese e acúmulo de moléculas mais complexas como LM/LAM, que possuem PIMs como precursores comuns.

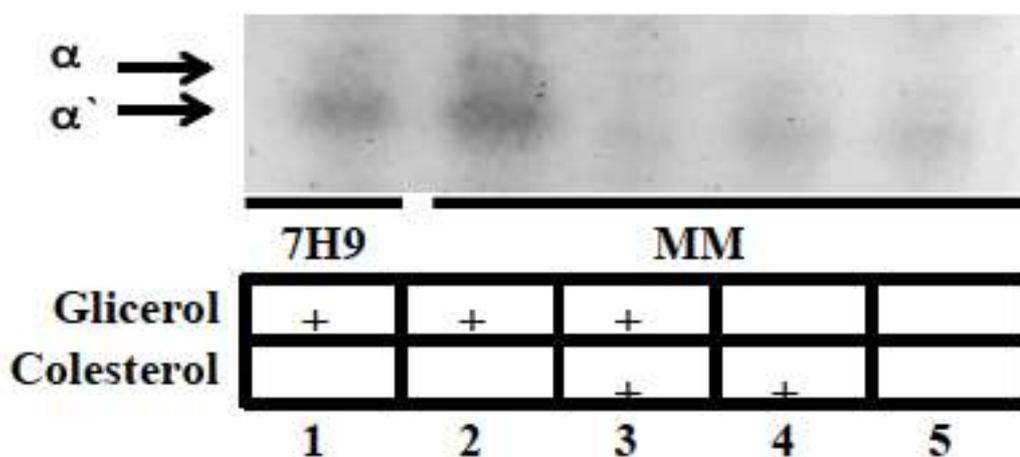
## 5.2. PERFIS DE ÁCIDO MICÓLICO EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA

A análise dos ácidos micólicos por CCD mostrou que *M. smegmatis*, quando submetido a diferentes meios nutricionais (7H9+Glicerol, MM+Glicerol, MM+Glicerol+Colesterol, MM+Colesterol e Meio Mínimo), manteve a biossíntese de micolatos em sua parede celular (Figura 16). Todavia, o cultivo em MM, com ou sem glicerol ou colesterol, mostrou uma redução acentuada tanto em  $\alpha$ -metil éster quanto em  $\alpha$ -metil éster (Figura 16, grupos 3 a 5). No entanto, o grupo MM suplementado com glicerol (Grupo 2) demonstrou maior acúmulo de micolatos, quando comparado com o grupo 7H9.

Estes dados sugerem que o crescimento do bacilo em condições restritas de nutrientes, necessita das duas fontes de energia e carbono (glicerol ou colesterol) para não haver a diminuição do acúmulo de micolatos na parede celular. Diminuindo a quantidade de ácido  $\alpha$ -micólico, teremos preferencialmente o seu derivado o  $\alpha$ -metil éster, que em meio pobre de nutrientes mostrou está mais frequente na parede celular do bacilo, quando comparados com o grupo 7H9.

Cantrell e colaboradores (2013) reportaram que *M. tuberculosis*, deficientes no transporte de lipídios (mutantes para o operon *mce1*), acumulam ácidos micólicos livres (ácidos micólicos não ligados covalentemente a trealose), usados para a formação de biofilmes. Dessa forma, nossos dados também sugerem indiretamente que a indução de captação do colesterol, com consequente diminuição do acúmulo de ácidos micólicos livres, pode está modulando a formação de biofilmes, moléculas imprescindíveis para a infectividade do bacilo.

Para justificar a presença de  $\alpha$ -metil éster em cultivo MM, buscamos analisar a biossíntese de ácidos graxos nesses bacilos. As micobactérias possuem tanto o FAS I como FAS II e entre esses dois sistemas há uma interação complexa. Por exemplo, os primeiros estudos realizados com o FAS I a partir de *M. smegmatis* demonstrou que as substâncias de Acil-CoA da albumina de soro bovino ou de certos polissacárideos podem mudar o padrão de produtos da biossíntese de ácidos graxos da parede celular desta micobactéria, passando a produzir ácidos graxos de cadeia mais curta (Peterson & Bloch, 1977).



**Figura 16** - Perfis de ácidos micólicos livres oriundos da parede celular de *M. smegmatis*. Após cultivo em meio contendo glicerol e/ou colesterol os derivados dos ácidos micólicos ( $\alpha$ - e  $\alpha'$ -metil éster) foram analisados após o cultivo em 7H9 e MM.

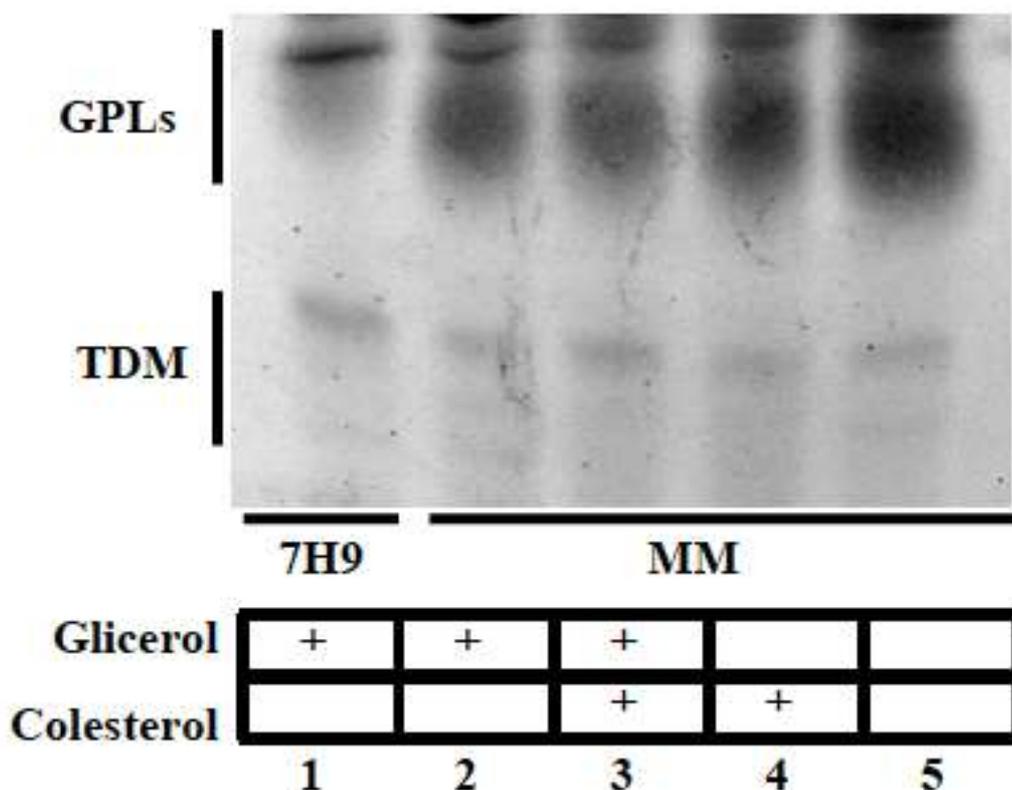
Diante disso, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a modificação nutricional da principal fonte de carbono e energia está diretamente ligada à regulação e a síntese dos componentes da parede celular micobacteriana, possibilitando-nos a propor que, nesse microambiente pobre de nutriente, o bacilo possa deixar de produzir produtos suficientes para o alongamento correto dos ácidos graxos produzidos por ele. Desta forma, o bacilo acumularia ácidos graxos menores, somente quando presente fontes de energia e carbono em quantidades eficientes, que após a estratificação, seriam acumulados como derivados de  $\alpha'$ -metil éster, como observado na figura 16.

### 5.3. PERFIS DE TREALOSE DIMICOLATO (TDM) E GLICOPEPTIDEOLIPÍDIOS (GPLs) EM DIFERENTES FONTES NUTRICIONAIS DE CARBONO E ENERGIA.

O perfil cromatográfico dos glicopeptídeolipídios (GPLs) de *M. smegmatis*, comparando com o grupo controle em 7H9, revelou aumento do seu acúmulo em todos os grupos cultivados com escassez nutricional, independente da suplementação, porém esse acúmulo foi mais acentuado quando o cultivo foi realizado na ausência do glicerol (Figura 17, Grupos 4 e 5). Estes resultados podem ser explicados pelo aumento na produção de açúcares, como GDP-fucose, presente na estrutura de GPLs, em meio pobre de nutriente, porém contendo colesterol como fonte principal de carbono e energia, como publicado por Griffin *et al.* (2012).

Em relação ao perfil de Trealose Dimicolato (TDM), não observamos decréscimo drástico de seu acúmulo na parede celular quando o bacilo foi cultivado em MM suplementado com colesterol, porém uma marcação mais discreta é observada quando não

houve suplementação (Figura 17). Como TDM é formado pela ligação covalente de trealose com os ácidos micólicos, que apresentaram acúmulo alterado em condições de escassez nutricional (Figura 16), nossos dados podem sugerir que o cultivo em MM poderia estar induzindo o direcionamento da biossíntese de micolatos para a biossíntese de TDM, e assim manter níveis mais estáveis desse lipídio na parede celular do bacilo.



**Figura 17** - Perfis de glicopeptídeolipídios (GPL) e trealose de dimicolato (TDM) oriundos da parede celular de *M. smegmatis*. Após cultivo em meio contendo colesterol os GPLs e TDM foram analisados após o cultivo em 7H9 e MM suplementado ou não com glicerol e/ou colesterol.

Dessa forma, é bem evidente que o bacilo mantém constituintes lipídicos mais complexos, como TDM e GPLs, na parede celular durante condições de escassez nutricional, independentemente da fonte de energia e carbono encontrada durante tais condições. Estes resultados sugerem que este comportamento pode suprir necessidades físico-químicas do micro-organismo, e até mesmo de reserva nutricional, na parede celular durante condições adversas ao crescimento bacteriano. Esta mudança nítida da fisiologia do bacilo poderia alterar a estabilidade da parede celular, que será avaliada pela permeabilidade a antibióticos, hidrofobicidade e perfil de coloração álcool-ácido resistente.

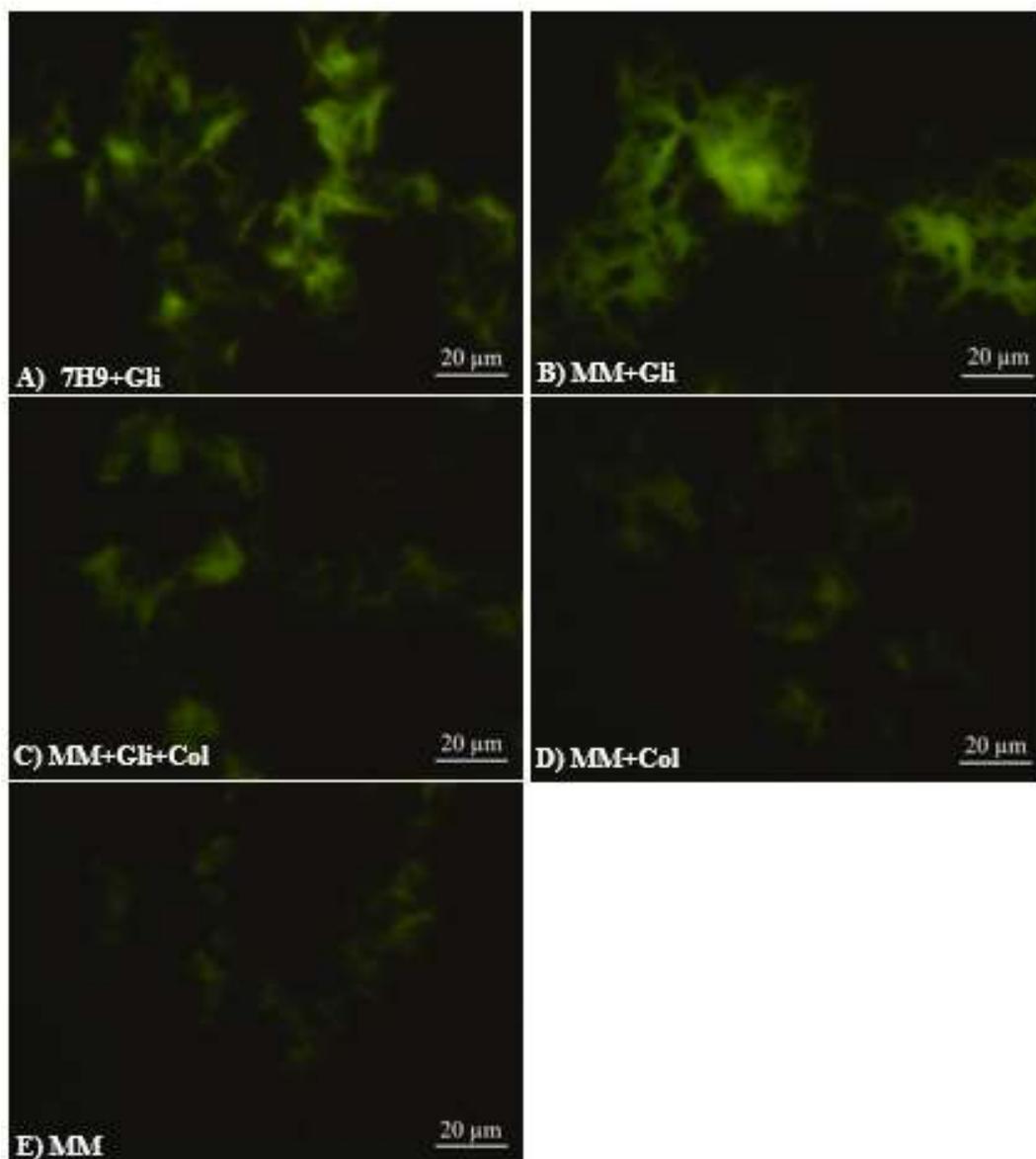
#### 5.4. AVALIAÇÃO DA PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA DA PAREDE CELULAR PELO MÉTODO DE COLORAÇÃO POR AURAMINA FENÓLICA

A característica álcool-ácido resistente do bacilo foi demonstrada pelo método de coloração por auramina fenólica, este método se baseia no fato de que a micobactéria quando tratada com auramina, resiste à descoloração frente a uma solução de ácido forte. Desta forma a parede célula do bacilo permanece corada de verde fluorescente devido à presença de ácidos micólicos, que estão ligados covalentemente na parede celular e estes por sua vez se ligam ao corante, assim resistem fortemente a sucessivas extrações do corante com álcool, éter e clorofórmio (COSTA, 1988). Esta propriedade de coloração tem sido relacionada com a propriedade físico-química da parede celular da micobactéria (FUKUDA *et al.*, 2013).

Diante disso procurou-se analisar a propriedade físico-química da parede celular nos nossos grupos estudados, já que o perfil químico dos ácidos micólicos na parede celular demonstrou estar comprometido quando o bacilo foi cultivado em MM, com exceção do grupo MM+Gli (Meio Mínimo+Glicerol), que apresentou acúmulo acentuado de micolatos, quando comparado com o grupo controle, cultivado em meio rico de nutriente (Grupo 7H9), como pode ser observado na figura 16.

Observando o resultado da figura 18 e comparando com o grupo controle cultivado em 7H9 (Figura 18A), podemos evidenciar o aumento do sinal fluorescente após a marcação com auramina, somente no grupo cultivado em MM suplementado com glicerol (Figura 18B), em detrimento do sinal nos demais grupos cultivados em meio pobre de nutriente. Este dado corrobora com o observado na CCD para ácidos micólicos (Figura 16). Entretanto, esta técnica quando utilizada com o objetivo de se verificar a propriedade físico-química da parede celular do bacilo, não se mostrou apropriada tendo em vista que ela é uma coloração específica para se visualizar os ácidos micólicos da parede celular micobactérianas.

Esses dados juntamente com os perfis de CCD para ácido micólicos demonstram que a diferença nutricional, a que o bacilo foi submetida, é capaz de alterar a fisiologia desta micobactéria.



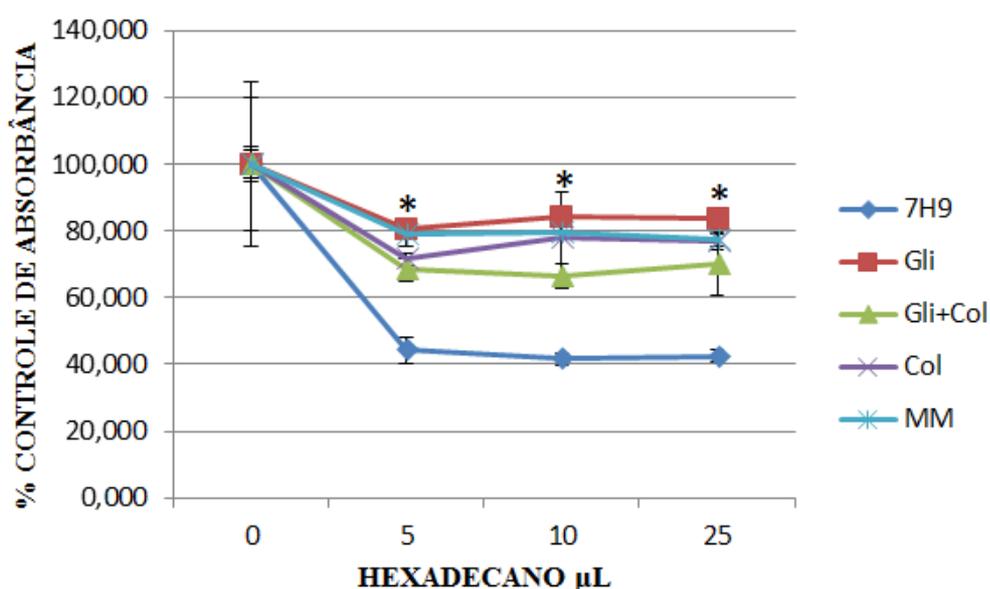
**Figura 18** - Análise das características físico-químicas pela marcação fluorescente com auramina fenólica. Os bacilos corados pelo método de auramina fenólica foram visualizados em objetiva de imersão (100x) do microscópio de fluorescência (ZEISS Scope. A1), utilizando filtro de excitação de 340-380 nm. A) 7H9+Gli, B) MM+Gli, C) MM+Gli+Col, D) MM+Col e E) MM. Barra de 20 µm.

### 5.5. AVALIAÇÃO DA HIDROFOBICIDADE DA PAREDE CELULAR DE *Mycobacterium smegmatis*

A análise da integridade da parede celular micobacteriana foi utilizada como medida alternativa para se avaliar alterações nas propriedades físico-químicas da parede celular do bacilo, em decorrência das diferenças encontradas nos níveis de um dos principais componentes estruturais, os ácidos micólicos, quando este foi submetido ao cultivo em meio rico e pobre de nutrientes.

Observando o gráfico 1, a partição com hexadecano demonstra que o cultivo no MM com ou sem fontes definidas de carbono, alterou a característica hidrofóbica do bacilo, em proporções semelhantes, mostrando ser menos hidrofóbico em relação ao grupo cultivado em 7H9 (Grupo controle), que confere condições ótimas de cultivo.

A avaliação da hidrofobicidade do bacilo após os respectivos cultivos em meio pobre de nutriente, com fontes definidas de carbono e energia, torna claro a mudança fenotípica do bacilo após a parede celular sofrer as alterações no perfil de seus constituintes em condições que possam parcialmente mimetizar o ambiente intracelular durante a infecção.



**Gráfico 1** – Partição com hexadecano para determinação da hidrofobicidade da superfície celular bacteriana. Células obtidas de cada cultivo foram submetidas a partição por 0, 5, 10 e 25  $\mu\text{L}$  de hexadecano. O experimento foi realizado em triplicata e os valores foram expressos em média e desvio padrão.

Uma possível explicação para esta observação pode ser dada com relação à biossíntese desses componentes estruturais da parede celular da micobactéria, em especial os metis ésteres de ácidos micólicos que estão ligados covalentemente em sua parede celular, gerando assim uma barreira hidrofóbica e impermeável para o bacilo (NGUYEN *et al.*, 2005). Como mostrado anteriormente, nossos resultados de CCD para micolatos, mostram que estes se encontram com níveis alterados na parede celular do bacilo, após cultivo em MM.

Schreuder e colaboradores (2015) sugeriram que polimorfismos (SNP) no gene *pohR*, têm consequências fenotípicas entre as cepas (H37RV e CDC 1551) de *M. tuberculosis*. Este gene é mais importante na regulação, virulência e composição da parede celular (GONZALO *et al.*, 2008). Diante disso, eles analisaram a hidrofobicidade da parede celular de ambas as espécies e observaram diferenças significativas, mostrando com isso que essas cepas têm diferentes estruturas de parede celular, principalmente na camada mais externa.

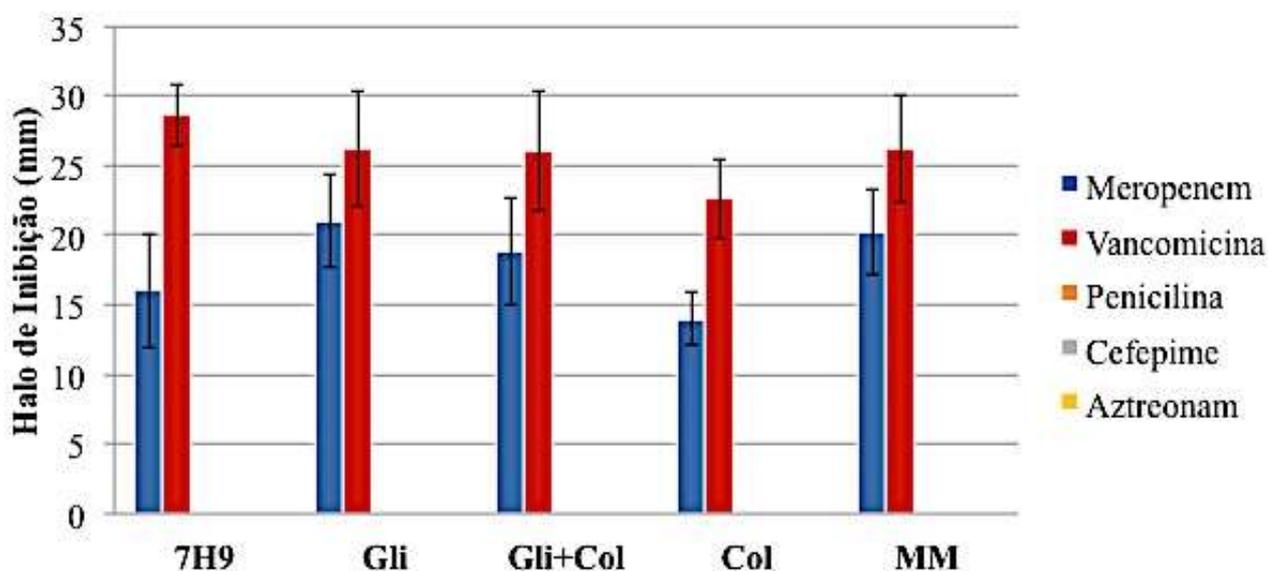
Morita e colaboradores (2006) mostraram que a manosiltransferase PIME é essencial para a biossíntese de PIMs maiores como AcPIM<sub>5</sub> e que a deleção dessa manosiltransferase não teve grandes consequência para o crescimento ou viabilidade do bacilo. No entanto, houve alterações na organização da membrana plasmática bem como, na hidrofobicidade. Neste estudo o mutante em PIME mostrou uma parede celular menos hidrofóbica.

## 5.6. AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

Diante dos resultados anteriores, principalmente os referentes aos perfis químicos de ácidos micólicos, glicopeptideolipídios e hidrofobicidade, foi avaliado a susceptibilidade da micobactéria aos antimicrobianos meropenem, vancomicina, penicilina, cefepime e aztreonam, devido à ação na síntese da parede celular micobacteriana. Como mostrado no gráfico 2, a resposta aos antimicrobianos mostrou que não houve diferença significativa de resistência ou suscetibilidade entre os grupos de estudo. Tendo em vista, que dos 5 antibióticos utilizados neste estudo somente com meropenem e vancomicina o bacilo mostrou-se sensível e nos demais mostrou-se resistente.

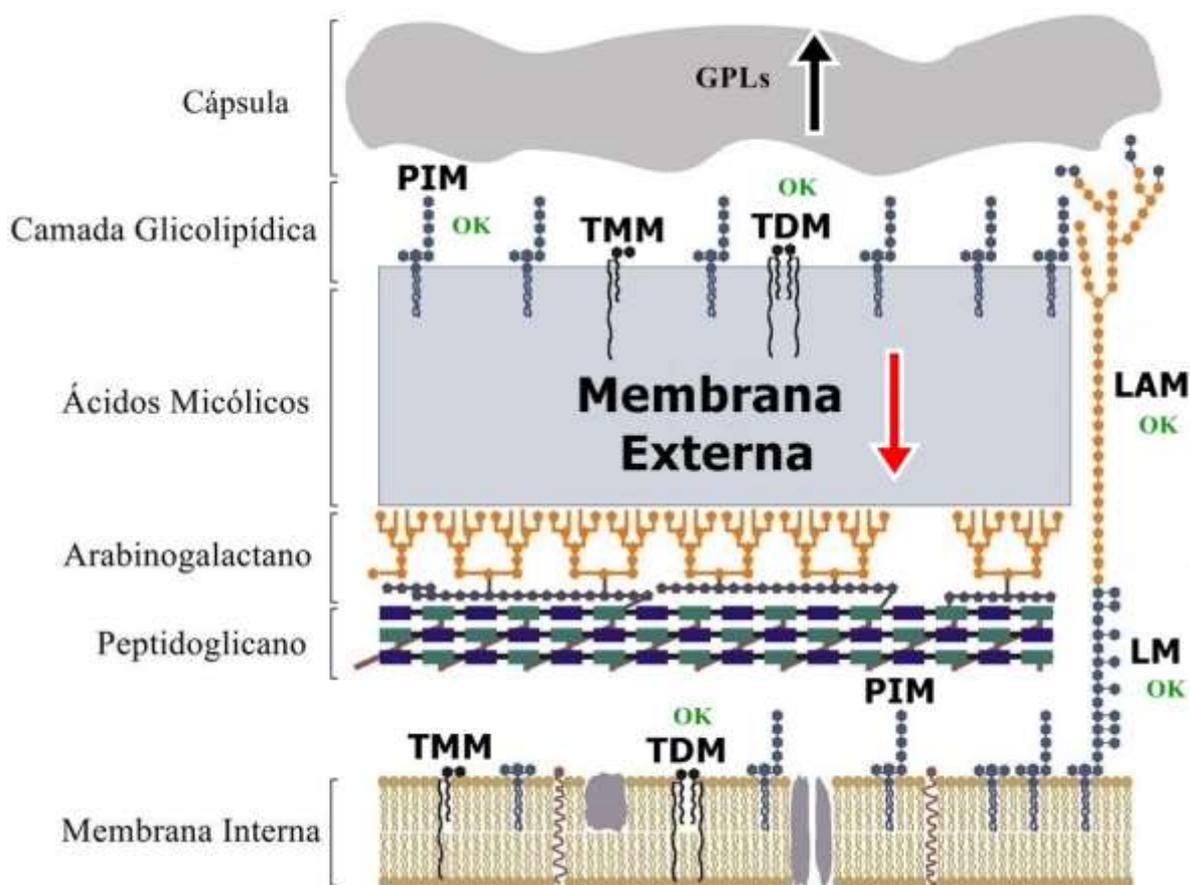
Estudos têm demonstrado que cepas de micobactérias deficientes em micoliltransferases, participantes da biossíntese de ácidos micólicos, bem como de trealose dimicolato, influenciam diretamente à integridade da parede celular, alterando a

permeabilidade a uma série de compostos bactericidas, tais os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e vancomicina (NGUYEN *et al.*, 2005). Flores e colaboradores (2005) realizaram modificações genéticas nas  $\beta$ -lactamases de *M. tuberculosis* (*blaC*) e *M. smegmatis* (*blaS* e *blaE*) e observaram que os mutantes nessas  $\beta$ -lactamases foram sensíveis a uma série de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, dentre estes o imipenem que mostrou resultado de sensibilidade semelhante ao encontrado neste trabalho, porém utilizando o antibiótico meropenem pertencente a mesma classe do imipenem.



**Gráfico 2** – Sensibilidade e resistência a antibióticos. Conteúdos celulares equivalente, obtidos dos cultivos dos respectivos meios de cultura analisados foram inoculados em meio ágar 7H10 e ágar MM modificado (MM+Gli, MM+Gli+Col, MM+Col e MM) para análise do perfil de resistência e sensibilidade à antibióticos impregnados em discos de papel filtro. Os resultados do diâmetro do halo de inibição foram obtidos de triplicatas, sendo expressos em média e desvio padrão. Os grupos analisados mostraram sensibilidade somente aos antibióticos meropenem e vancomicina e nos demais o bacilo mostrou-se resistente.

Nossos dados mostram que, por mais diferente que esteja à constituição da parede celular, as mudanças fisiológicas que o bacilo sofre durante a privação de nutrientes, e uso do colesterol como fonte alternativa de carbono e energia, a micobactéria permanece viável para prosseguir a infecção, estabilizando a estrutura da parede celular às novas necessidades encontradas na célula hospedeira.



**Figura 19-** Perfil da parede celular de *M. smegatis*, após consumo de colesterol como fonte alternativa de carbono e energia (Adaptado Crellin, *et al.*, 2011)

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que a espécie *M. smegmatis*, mesmo sendo saprofítica, consegue acumular e catabolizar o colesterol, *in vitro*, quando este lipídio passa a ser uma alternativa nutricional para obtenção de carbono e energia.

O acúmulo de colesterol não favoreceu mudanças na biossíntese e acúmulo de lipídios essenciais como PIMs, TDM e dos fosfolipídios (PI, CL e PE).

Mudanças significativas foram observadas na biossíntese GPLs que apresentaram aumento em seu acúmulo e de ácidos micólicos que mostrou acúmulo reduzido.

Mudanças nas características físico-químicas do bacilo foram confirmadas com alterações na hidrofobicidade, Porém não mostraram alterações significativas em relação à resistência e susceptibilidade a antimicrobianos.

O consumo de colesterol pela micobactéria, influência na biossíntese da parede celular, porém nada tão acentuado a ponto de deixar a bactéria mais vulnerável a agentes exógenos microbicidas.

## 7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, P.E., SILVA, A.R., MAYA-MONTEIRO, C.M., TÖRÖCSIK, D., D'AVILA, H., DEZSÖ, B. (2009). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin infection induces TLR2-dependent peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  expression and activation: functions in inflammation, lipid metabolism, and pathogenesis. **J. Immunol.** 183:1337–1345.

ALMEIDA, M.V., SILVA, A.D., SOUZA, M.V.N., BENICIO, A.A. (2003). A cascata dos fosfoinosítidos. **Quím. Nova**, 26, pp. 105–111.

ANDERSON, R. J. (1930). The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. XIV. The occurrence of inositol in the phosphatide from human tubercle bacilli. **J. Am. Chem. Soc.** 52, 1607–1608.

ANDERSON, R. J. (1939). The chemistry of the lipids of the tubercle bacillus and certain other microorganisms, **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.** 3: 145–202.

APPELBERG, R. (2006). Macrophage nutritive antimicrobial mechanisms. **J. Leuk. Biol.** 79, 1117–1128.

ARABOLAZA, A., D'ANGELO, M., COMBA, S & GRAMAJO, H. (2010a). FasR, a novel class of transcriptional regulator, governs the activation of fatty acid biosynthesis genes in *Streptomyces coelicolor*. **Mol. Microbiol.** 78 : 47– 63.

BALLOU, C. E., VILKAS, E., LEDERER E., (1968). Diacyl myo-inositol monomannoside from *Propionibacterium shermanii*. **J. Biol. Chem.** 238, 69–76.

BARRY, C.E., LEE, R.E., MDLULI, K., SAMPSON, A.E., SCHROEDER, B.G., SLAYDEN, R.A., AND YUAN, Y., (1998). Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions. **Prog. Lipid Res.** 37, 143–179.

BARRY, C.E, MDLULI K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. **Trends Microbiol.** 1996;4:275-81.

BANSAL-MUTALIK, R., NIKAIDO, H. (2011). Quantitative lipid composition of cell envelopes of *Corynebacterium glutamicum* elucidated through reverse micelle extraction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**; 108:15360-5.

BLOCH, K., (1977). Control mechanisms for fatty acid synthesis in *Mycobacterium smegmatis*. **Adv. Enzymol Relat Areas Mol. Biol**; 45:1-84.

BRENDAN, D., MANNING. (2010). Insulin Signaling: Inositol Phosphates Get Into the Akt. **NIH Public Access**. 143(6): 861–863.

BRENNAN, P.J., BALLOU, C. E. (1968). Phosphatidylmyoinositol monomannoside in propionibacterium shermanii. **Biochem. Biophys. Res. Commun**. 30: 69-75.

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

BRENNAN, P. J. (1989). Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. **Rev. Infect. Dis.11 Suppl 2**, S420–430.

BRENNAN, P. J. AND NIKAIDO, H. (1995). The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem**. 64, 29–63.

BRIKEN, V, PORCELLI, SA, BESRA, G.S, KREMER, L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. **Mol. Microbiol**. 53:391– 403.

BRZOSTEK, A., PAWELCZYK, J., RUMIJOWSKA-GALEWICZ, A., DZIADEK B., DZIADEK J. (2009). *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. **J. of Bacteriology**, 191 (21): 6584–6591.

BLOCH, K & VANCE, D., (1977). Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids. **Annu. Rev. Biochem**. 46: 263–298.

CANTRELL, S.A., LEAVELL, D. M., OLIVEIRA, M., LAVARONE, T. A., RILEY, L. W. (2013). Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the *mce1* operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. of Microbiology**. 5: 619-626.

COSTA, H.C. (1988). Estudo comparativo das variantes do método de coloração de micobactérias. **Hansenol. Int.**, v.13, n.2, p.37-41.

CLARK, D.P., CRONAN, J.E., (1996). Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. **Washington, DC: ASM Press**, pp. 343–357.

CHAISSON, R.E., MARTINSON, N.A., (2008). Tuberculosis in Africa- Combating an HIV- Driven Crisis. **NEJM** .358:1089-1092.

CHAN, J., TANAKA, K., CARROLL, D., FLYNN, J., BLOOM, BR. (1995). Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**.1995;63:736–740.

CHAKROBORTY, A., (2011). Drug-resistant tuberculosis: an insurmountable epidemic. **Inflammopharmacol**. 19:131–137.

CHARALAMBOUS, K., MILLER, D., CURNOW, P., BOOTH, P.J. (2008). Lipid bilayer composition influences small multidrug transporters. **BMC Biochem**;9:31.

CHATTERJEE, A., MAJEE, M., GHOSH, S., MAJUMDER, A.L. (2004). sll1722, an unassigned open reading frame of *Synechocystis* PCC 6803, codes for L-myo-inositol 1-phosphate synthase. **Planta**. 218: 989–998.

CHATTERJEE, D., KHOO, KH., MCNEIL, M.R., DELL, A., MORRIS, H.R., BRENNAN, P. J., (1993). Structural definition of the non-reducing termini of mannosecapped LAM from *Mycobacterium tuberculosis* through selective enzymatic degradation and fast atom bombardment-mass spectrometry. **Glycobiology**. 3:497–506.

CHATTERJEE, D., KHOO, K.H. (1998). Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. **Glycobiology**. 8:113-20.

COLE, S.T., BROSCHE, R., PARKHILL, J., GARNIER, T., CHURCHER, C., HARRIS, D., (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**. 393:537-44.

CRELLIN, P. K., KOVACEVIC, S., MARTIN, K. L., BRAMMANANTH, R., MORITA, Y. S., BILLMAN-JACOB, H., MCCONVILLE, M. J., COPPEL, R. L. (2008). Mutations in *pimE* restore lipoarabinomannan synthesis and growth in a *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol**. 190, 3690–3699.

DAFFE, M., DRAPER, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. **Adv. Microb. Physiol**; 39:131-203.

DANIEL, J., DEB, C., DUBEY, VS., SIRAKOVA, TD., ABOMOELAK, B., MORBIDONI, H.R. & KOLATTUKUDY, P.E. (2004). Induction of a novel class of

diacylglycerol acyltransferases and triacylglycerol accumulation in *Mycobacterium tuberculosis* as it goes into a dormancy-like state in culture. **J. Bacteriol.** 186: 5017–5030.

D'AVILA, H., MELO, R.C., PARREIRA, G.G., WERNECK-BARROSO, E., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., AND BOZZA, P.T. (2006). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains *Cholesterol homeostasis dysregulation* by *M. leprae* for eicosanoid synthesis *in vivo*. **J. Immunol.** 176: 3087–3097.

DINADAYALA, P., KAUR, D., BERG, S., AMIN, AG., VISSA, VD., CHATTERJEE, D., BRENNAN, P.J., CRICK, D.C. (2006). Genetic basis for the synthesis of the immunomodulatory mannose caps of lipoarabinomannan in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.** 281:20027–20035.

FLORES, A. R., L. M. PARSONS, AND M. S. PAVELKA, JR. (2005). Characterization of novel *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis* mutants hypersusceptible to beta-lactam antibiotics. **J. Bacteriol.** 187:1892-1900.

FRAENKEL, D.G. (1996). Glycolysis in *Escherichia coli* and *Salmonella*: *Cellular and Molecular Biology*. **Washington, DC: ASM Press**, pp. 189–198.

FERRERAS, J. A., STIRRETT, K.L, X. LU, J.S. RYU, C.E. SOLL, D.S. TAN, L.E. QUADRI. (2008). Mycobacterial phenolic glycolipid virulence factor biosynthesis: mechanism and small-molecule inhibition of polyketide chain initiation. **Chem. Biol.**, 15, p. 51.

FISCHER, K., CHATTERJEE, D., TORRELLES, J., BRENNAN, P.J., KAUFMANN, S.H., SCHAIBLE, U. E. (2001). Mycobacterial lysocardiolipin is exported from phagosomes upon cleavage of cardiolipin by a macrophage-derived lysosomal phospholipase A2. **J. Immunol.** 167:2187-92.

FUJIWARA, N., NAKA, T., OGAWA, M., YAMAMOTO, R., OGURA, H., TANIGUCHI, H. (2012). Characteristics of *Mycobacterium smegmatis* J15cs strain lipids. **Tuberculosis (Edinb)** 92: 187–192.

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

Gago, G. Diacovich, L. Arabolaza, A. S.C. Tsai, H. Gramajo (2011). Fatty acid biosynthesis in actinomycetes. **FEMS Microbiol. Rev.**, 35, pp. 475–497.

GEISEL, R.E., SAKAMOTO, K., RUSSELL, D.G., RHOADES, E.R. (2005). In Vivo Activity of Released Cell Wall Lipids of *Mycobacterium Bovis* Bacillus Calmette-Guerin Is Due Principally to Trehalose Mycolates. **J. Immunol**; 174:5007–5015.

GILLERON, M., QUESNIAUX, V.F., PUZO, G. (2003). Acylation state of the phosphatidylinositol hexamannosides from *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and its implication in Toll-like receptor response. **J. Biol. Chem.** 278:29880 –29889.

GONZALO-ASENSIO, J., SOTO, C. Y., ARBUE´ S, A., SANCHO, J., DEL CARMEN MENE´ NDEZ, M., GARCIA, M. J., GICQUEL, B. & MARTIN, C. (2008a). The *Mycobacterium tuberculosis* *phoPR* operon is positively autoregulated in the virulent strain H37Rv. **J Bacteriol.** 190, 7068–7078.

GOUDE, R., AMIN, AG., CHATTERJEE, D., PARISH, T. (2008). The critical role of *embC* in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Bacteriol.** 190:4335– 4341.

GOREN, M.B. (1972). Mycobacterial lipids: selected topics. **J. Bacteriol. Rev.** 36, 33–64.

GLICKMAN, M.S., JACOBS, W.R. (2001). Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium Tuberculosis*: Dawn of a discipline. **Cell.** 104: 477-485.

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

GUERIN, M. E., KAUR, D., SOMASHEKAR, B. S., GIBBS, S., GEST, P., CHATTERJEE D., BRENNAN, P. J., JACKSON, M. (2009). New Insights into the Early Steps of Phosphatidylinositol Mannoside Biosynthesis in Mycobacteria. **J. Biol. Chem.** 284, 25687– 25696.

HARI, B.N., CHITRA, K.P., BHIMAVARAPU, R., KARUNAKARAN, P., MUTHUKRISHNAN, N., RANI, B.(2010). Novel technologies: A weapon against tuberculosis. **Indian J Pharmacol.** 42:338–344.

HEATH R. J , WHITE S. W & ROCK C. O., (2001). Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. **Prog. Lipid. Res.** 40: 467– 97.

HENRIKSON K. P & ALLEN S. H., (1979). Purification and subunit structure of propionyl coenzyme A carboxylase of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Biol Chem** .254: 5888– 891.

HIGASHIYAMA, T., (2002). Novel functions and applications of trehalose. **Pure Appl Chem.** 74: 1263–1269.

HINGLEY-WILSON, S. M., SAMBANDAMURTHY, V. K., JACOBS, W. R. (2003). Survival perspectives from the words most successful pathogen, *Mycobacterium Tuberculosis*. **Nature Immunol.** 4: 949-955.

HOFFMANN, C., LEIS, A., NIEDERWEIS, M., PLITZKO, J.M., ENGELHARDT, H. (2008). Disclosure of the mycobacterial outer membrane: cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. **Proc Natl Acad Sci. U S A;** 105:3963-7.

HORSWILL, A.R., ESCALANTE-SEMERENA, J.C. (1999). *Salmonella typhimurium* LT2 catabolizes propionate via the 2-methylcitric acid cycle. **J. Bacteriol.** 181: 5615–5623.

HSU, F.F., SOEHL, K., TURK, J., HAAS, A. (2011). Characterization of mycolic acids from the pathogen *Rhodococcus equi* by tandem mass spectrometry with electrospray ionization. **Anal. Biochem.** 409, 112–122.

IMAI, T., KAGEYAMA, Y., TOBARI, J. (1995). *Mycobacterium smegmatis* malate dehydrogenase: activation of the lipid-depleted enzyme by anionic phospholipids and phosphatidylethanolamine. **Biochim. Biophys. Acta.** 1246:189-96.

INDRIGO, J., HUNTER, R.L., ACTOR, J.K. (2003). Cord Factor Trehalose 6,6'-Dimycolate (Tdm) Mediates Trafficking Events During Mycobacterial Infection of Murine Macrophages. **Microbiology.** 149:2049–2059.

JACKSON, M., CRICK, D.C., BRENNAN, P. J. (2000). Phosphatidylinositol is an essential phospholipid of mycobacteria. **J. Biol. Chem.** 275:30092-9.

JORDÃO, L., VIEIRA, O. V. (2011). Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. **Int. J. Cell Biol.**

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

KANG, B. R, SCHLESINGER, L. S. (1998). Characterization of manose receptor-dependent phagocytosis mediated by *Mycobacterium Tuberculosis* lipoarabinimanan. **Infect. Immun.** 66: 2769-2777.

KAUR, D., BERG, S., DINADAYALA, P., GICQUEL, B., CHATTERJEE, D., MCNEIL, M.R., VISSA, V.D., CRICK, D.C., JACKSON, M., BRENNAN, P. J. (2006). Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan: role of a branching mannosyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 103:13664–13669.

KAUR, D., MCNEIL, M.R., KHOO, K.H., CHATTERJEE, D., CRICK, D.C., JACKSON, M., BRENNAN, P. J. (2007). New insights into the biosynthesis of mycobacterial lipomannan arising from deletion of a conserved gene. **J. Biol. Chem.** 282:27133–27140.

KAUR, D., OBREGÓN-HENAO, A., PHAM, H., CHATTERJEE, D., BRENNAN, P.J., JACKSON, M. (2008). Lipoarabinomannan of *Mycobacterium*: mannose capping by a multifunctional terminal mannosyltransferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 105:17973–17977.

KIKUCHI, S., RAINWATER, D.L. & KOLATTUKUDY, P. E. (1992). Purification and characterization of an unusually large fatty acid synthase from *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. **Arch. Biochem. Biophys.** 295: 318 – 326.

KORDULAKOVA, J., M, GILLERON., G. PUZO., P.J. BRENNAN., B. GICQUEL, K. MIKUSOVA., M. JACKSON., (2003). Identification of the required acyltransferase step in the biosynthesis of the phosphatidylinositol mannosides of *Mycobacterium* species, **J. Biol. Chem.** 278: 36285–36295.

KOVACEVIC, S., ANDERSON, D., MORITA, Y. S., PATTERSON, J., HAITES, R., MCMILLAN, B. N., COPPEL, R., MCCONVILLE, M. J., BILLMAN-JACOB, H. (2006). Identification of a novel protein with a role in lipoarabinomannan biosynthesis in *Mycobacteria*. **J. Biol. Chem.** 281, 9011–9017.

KUNAU, W.H., DOMMES, V., SCHULZ, H. (1995).  $\beta$ -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. **Prog. Lipid. Res.** 34: 267–342.

KHULLER, G. K., TANEJA, R., NATH, N. (1983). Effect of fatty acid supplementation on the lipid composition of *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607, grown at 27 degrees and 37 degrees. **C. J Appl Bacteriol.** 54:63-8.

KREMER, L., GURCHA, S. S., BIFANI, P., HITCHEN, P. G., BAULARD, A., MORRIS, H. R., DELL, A., BRENNAN, P. J., BESRA, G. S. (2002). Characterization of a  $\alpha$ -mannosyltransferases involved in phosphatidylinositol trimannoside biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochem. J.** 363, 437–447.

KUMAR, P., SCHELLE, M. W., JAIN, M., LIN, F. L., PETZOLD, C. J., LEAVELL, M. D., LEARY, J. A., COX, J. S., BERTOZZI, C. R. (2008). PapA1 and PapA2 are acyltransferases essential for the biosynthesis of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor sulfolipid-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 104:11221–11226.

LANGFORD, K. W.; PENKOV, B.; DERRINGTON, I. M.; GUNDLACH, J. H. (2010). Unsupported planar lipid membranes formed from mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Lipid Research.** 52 (2): 272–277.

LEWIS, R.N., ZWEYTICK, D., PABST, G., LOHNER, K., MCELHANEY, RN. (2007). Calorimetric, x-ray diffraction, and spectroscopic studies of the thermotropic phase behavior and organization of tetramyristoyl cardiolipin membranes. **Biophys J.** 92:3166-77.

LIENHARDT, C., VERNON, A., RAVIGLIONE, M.C. (2010). New drugs and new regimens for the treatment of tuberculosis: review of the drug development pipeline and implications for national programmes. **Curr Opin Pulm Med.** 16:186–193.

LEMAIRE, G., TENU, J.P., PETIT, J.F., LEDERER, E. (1986). Natural and Synthetic Trehalose Diesters as Immunomodulators. **Med. Res. Rev.** 6:243–274.

LOPEZ-MARIN, L. M. (2012). Nonprotein Structures from *Mycobacteria*: Emerging Actors for Tuberculosis Control. **Clin. Dev. Immunol.** 2012.

MADIGAN, MICHAEL. *Microbiologia de Brock*. Porto Alegre: **Artmed**, 2010. 1127 p.

MARIANI, F., GOLETTI, D., CIARAMELLA, A., MARTINO, A., COLIZZI, V., FRAZIANO, M. (2001). Macrophage response to *Mycobacterium tuberculosis* during HIV infection relationships between macrophage activation and apoptosis. **Curr. Mol. Med.** 1:209-216.

MARRERO, J, RHEE, K.Y, SCHNAPPINGER, D, PETHE, K., EHRT, S., (2010). Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic acid cycle intermediates is critical for *Mycobacterium tuberculosis* to establish and maintain infection. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 2010;107:9819–9824.

MCKINNEY, J. D. (2000). Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature.** 406:735–738.

MISHRA, A.K, ALDERWICK, L.J, RITTMANN, D., TATITURI, R.V., NIGOU, J., GILLERON, M., EGGELING, L., BESRA, G.S. (2007). Identification of an alpha (1,6) mannopyranosyltransferase (MptA), involved in *Corynebacterium glutamicum* lipomannan

biosynthesis, and identification of its ortholog in *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol. Microbiol.** 65:1503–1517.

MOLLER., HOLGER, J., POULSEN, JORGEN, H., (1996). Staining glycoproteins/proteoglycans on SDS-gels. Walker, J. M. **The Protein Protocols Handbook.** 627-631.

MORITA, Y. S., PATTERSON, J. H., BILLMAN-JACOB, H., MCCONVILLE, M. J. (2004). Biosynthesis of mycobacterial phosphatidylinositol mannosides. **Biochem. J.** 378, 589–597.

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

MORITA, Y.S., YAMARYO-BOTTE, K. MIYANAGI, J.M. CALLAGHAN, J.H. PATTERSON, P.K. CRELLIN, R.L. COPPEL, H. BILLMAN-JACOB, T. KINOSHITA, M.J. MCCONVILLE. (2010). Stress-induced synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate in mycobacteria. **J. Biol. Chem.** 285. 16643–16650.

MORII, H., M. OGAWA, K. FUKUDA, H. TANIGUCHI, Y. KOGA. (2010). A revised biosynthetic pathway for phosphatidylinositol in mycobacteria, **J. Biochem.** 148. 593–602.

MILEYKOVSKAYA E, DOWHAN W, BIRKE RL, ZHENG D, LUTTERODT L, HAINES T. H. (2001). Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. **FEBS Lett.** 507:187-90.

MURZYN K, ROG T, PASENKIEWICZ-GIERULA M. (2005). Phosphatidylethanolamine and phosphatidylglycerol bilayer as a model of the inner bacterial membrane. **Biophys J.** 88:1091-103.

MURKHERJEE, R. CHATTERJI, D. (2012). Glycopeptide lipids: Immuno-modulators in greasy mycobacterial cell envelope. **IUBMBlife:** 64 (3): 215-225.

MUÑOZ-ELÍAS, E.J., MCKINNEY, J. D. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate lyases 1 and 2 are jointly required for *in vivo* growth and virulence. **Nat. Med.** 11: 638–644.

NANDEDKAR, A. K. (1983). Comparative study of the lipid composition of particular pathogenic and nonpathogenic species of *Mycobacterium*. **J. Natl. Med. Assoc.** 75:69-74.

NOLL, H. (1956). The chemistry of cord factor, a toxic glycolipid of *M. tuberculosis*. **Adv. Tuberc. Res.** 10:149-183.

NGUYEN, L., S. CHINNAPAPAGARI, AND C. J. THOMPSON. (2005). FbpA-dependent biosynthesis of trehalose dimycolate is required for the intrinsic multidrug resistance, cell wall structure, and colonial morphology of *Mycobacterium smegmatis*. **J. Bacteriol.** 187:6603-6611.

OJHA, A. K, TRIVELLI X, GUERARDEL Y, KREMER L, HATFULL G. F. (2010). Enzymatic Hydrolysis of Trehalose Dimycolate Releases Free Mycolic Acids During Mycobacterial Growth in Biofilms. **J. Biol. Chem.** 285:17380–17389.

ONWUEME K, C., VOS, C. J., ZURITA, J., FERRERAS, J. A & QUADRI L. E. (2005). The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. **Prog. Lipid. Res.** 44: 259–302.

PANDEY, A. K., AND SASSETTI, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 105: 4376–4380.

PATTERSON, J. H., WALLER, R. F., JEEVARAJAH, D., BILLMAN-JACOB, H., MCCONVILLE M. J. (2003). Mannose metabolism is required for mycobacterial growth. **Biochem. J.** 372, 77–86.

PETERSON, D.O & BLOCH, K. (1977). *Mycobacterium smegmatis* fatty acid synthetase. Long chain transacylase chain length specificity. **J. Biol. Chem.** 252: 5735–5739.

PITARQUE S, LARROUY-MAUMUS G, PAYRE B, JACKSON M, PUZO G, NIGOU J. (2008). The immunomodulatory lipoglycans, lipoarabinomannan and lipomannan, are exposed at the mycobacterial cell surface. **Tuberculosis (Edinb).** 88:560-5.

RASTOGI, W., LEGRAND, E., SOLA, C. (2001). The Mycobacteria: An introduction to nomenclature and Pathogenesis. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.** 20:21-54.

RENESTO, P., OGATA, H., AUDIC, S., CLAVERIE, J.M., RAOULT, D. (2005). Some lessons from *Rickettsia* genomics. **FEMS Microbiol Rev** 29:99–117.

RUSSELL, D. G., (2001). *Mycobacterium Tuberculosis*: Here today and here tomorrow. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.** 2: 569-577.

RHOADES, E. R, GEISEL, R. E, BUTCHER, B. A, MCDONOUGH, S., RUSSELL, D. G. (2005). Cell Wall Lipids from *Mycobacterium Bovis Bcg* Are Inflammatory When Inoculated within a Gel Matrix: Characterization of a New Model of the Granulomatous Response to Mycobacterial Components. **Tuberculosis.** ;85:159–176.

RHOADES, K. H, ABRAMOVITCH, R. B, RUSSELL, D. G. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. **Cell Host Microbe.** 2007;2:352–364.

SANTOS, A. Acúmulo de colesterol por *mycobacterium smegmatis* como possível modulador da biossíntese de lipomanana e lipoarabinomanana. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de ciências biológicas e da saúde, Universidade Federal do Pará, Pará. 2015.

SALMAN, M.J.T., LONSDALE, G.S., BESRA, BRENNAN, J. P. (1999). Phosphatidylinositol synthesis in mycobacteria, **Biochim. Biophys. Acta.** 1436 (1999) 437–450.

SENA, C.B., FUKUDA, T., MIYANAGI, K., MATSUMOTO, S., KOBAYASHI, K, MURAKAMI, Y., MAEDA, Y., KINOSHITA, T., MORITA, Y.S. (2010). Controlled expression of branch-forming mannosyltransferase is critical for mycobacterial lipoarabinomannan biosynthesis. **J. Biol. Chem.** 285:13326 –13336.

SMITH, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinantes of virulence. **Clin. Microbiol. Rev:** 16: 463-496.

SMITH D. J., MARTIN K. L., PYKE J. S., TULL D., MCCONVILLE M. J., COPPEL R. L., CRELLIN P. K. (2008). Analysis of a new mannosyltransferase required for the synthesis of phosphatidylinositol mannosides and lipoarabinomannan reveals two lipomannan pools in corynebacterineae. **J. Biol. Chem.** 283, 6773–6782.

SCHOREY, J. S. AND SWEET, L. (2008). The mycobacterial glycopeptidolipids:structure, function and their role in pathogenesis. **Glycobiology.** 18,832–841.

SCHEISINGER, L. S., (1993). Macrophage phagocytosis of virulent but attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by manoses receptors in addition to complemente receptors. **J. Immuno.** 150: 2920-2930.

SCHREUDER, L. J., CARROLL, P., MUWANGUZI-KARUGABA, J., RACHEL KOKOCZAKA., AMANDA, C., BROWN., PARISH, T. (2015). Mycobacterium tuberculosis H37Rv has a single nucleotide polymorphism in PhoR which affects cell wall hydrophobicity and gene expression. **Microbiology**. 161, 765-773.

SCHNAPPINGER, D., S. EHRT, M. I. VOSKUIL, Y. LIU, J. A. MANGAN, I. M. MONAHAN, G. DOLGANOV, B. EFRON, P. D. BUTCHER, C. NATHAN, AND G. K. SCHOOLNIK. (2003). Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: insights into the phagosomal environment. **J. Exp. Med.** 198:693-704.

STEWART, G.K, PATEL, J., ROBERTSON, B. D, RAL, A., YOUNG, D. B. (2005). Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. **Plos Pathogens**. 1: 269-278.

SWEET, L., SINGH, P. P., AZAD, A. K., RAJARAM, M. V. S., SCHLESINGER, L. S. (2010). Mannose receptor-dependent delay in phagosome maturation by *Mycobacterium avium* glycopeptidolipids. **Infect. Immun.** 78, 518–526.

SILVA, P. Valorização do diagnóstico laboratorial na identificação de *Rhodococcus equi* isolado do escarro de pacientes suspeitos de tuberculose. 2009. 147 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia. Universidade estadual Paulista- UNESP. São Paulo. 2009.

SILVA, C.L, EKIZLERIAN, S.M, FAZIOLI, R.A. (1985). Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria. **Am. J. Pathol.** 118:238-247.

SIRAKOVA, T. D., THIRUMALA, A.K., DUBEY, V.S., SPRECHER, H & KOLATTUKUDY, P. E. (2001). The *Mycobacterium tuberculosis pks2* gene encodes the synthase for the hepta- and octamethyl-branched fatty acids required for sulfolipid synthesis. **J. Biol. Chem.** 276: 16833–16839.

TAKAYAMA, K., WANG, C., AND BESRA, G.S. (2005). Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin. Microbiol. Rev.** 18, 81–101.

TEXTOR, S., WENDISCH, V.F., DE GRAAF, A.A., MULLER, U., LINDER, M.I., LINDER, D., BUCKEL, W. (1997). Propionate oxidation in *Escherichia coli*: evidence for operation of a methylcitrate cycle in bacteria. **Arch. Microbiol.** 168: 428–436.

TOBARI, J. (1964). Requirement of flavin adenine dinucleotide and phospholipid for the activity of malate dehydrogenase from *Mycobacterium avium*. **Biochem. Biophys. Res Commun.** 15:50-4.

TORRELLES, J.B, DESJARDIN, L.E, MACNEIL, J., KAUFMAN, T.M., KUTZBACH, B., KNAUP, R., MCCARTHY, T.R., GURCHA, S.S, BESRA, G.S, CLEGG, S, SCHLESINGER, LS. (2009). Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase *pimB* reduces the cell wall lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterial-induced human macrophage cell death. **Glycobiology**. 19:743–755.

TORRELLES, J.B, SCHLESINGER, L.S. (2010). Diversity in *Mycobacterium tuberculosis* mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host. **Tuberculosis (Edinb)**. 90:84 –93.

TRIVEDI, O.A., ARORA, P., VATS, A., ANSARI, M.Z., TICKOO, R., SRIDHARAN, V., MOHANTY, D & GOKHALE, R.S., (2005). Dissecting the mechanism and assembly of a complex virulence mycobacterial lipid. **Mol. Cell**. 17: 631–643.

TRIVEDI, O.A., ARORA, P., SRIDHARAN, V., TICKOO, R., MOHANTY, D & GOKHALE, R.S. (2004). Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyladenylates in mycobacteria. **Nature**. 428:441– 445.

VENISSE, A., BERJEAUD, J.M., CHAURAND, P., GILLERON, M., PUZO, G. (1993). Structural features of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Determination of molecular mass by laser desorption mass spectrometry. **J. Biol. Chem**. 268:12401–12411.

VERCELLONE, A., NIGOU, J., PUZO G. (1998). Relationships between the structure and the roles of lipoarabinomannans and related glycoconjugates in tuberculosis pathogenesis. **Front Biosci**. 3:e149-63.

VIA, L.E, LIN, P.L., RAY, S.M., CARRILLO, J., ALLEN, S.S., EUM, S.Y., TAYLOR, K., KLEIN, E., MANJUNATHA, U., GONZALES, J. (2008). Tuberculous granulomas are hypoxic in guinea pigs, rabbits, and nonhuman primates. **Infect. Immun**. 2008;76:2333–2340.

ZAHRT, T. C. (2003). Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium Tuberculosis* infection. **Microbes infect**. 5: 159-167.

YANO.I., Kekkaku. (1998) . **The 72nd Annual Meeting Education Lecture**. Cord Factor. 73:37-42.