

# DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO E NO DESCARTE DO TNFR1 E TNFR2 DURANTE A INFECÇÃO *IN VITRO* COM O *MYCOBACTERIUM BOVIS*

Bárbara Bruna Muniz Figueiredo<sup>1</sup>  
Michele Fernandes Rodrigues<sup>2</sup>  
Henrique Couto Teixeira<sup>3</sup>

## RESUMO

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por bactérias do gênero *Mycobacterium*, entre elas o *M. bovis*. Esses bacilos penetram no organismo principalmente pela via respiratória, sendo fagocitados pelos macrófagos alveolares. A infecção desencadeia uma cascata de moléculas inflamatórias, que visa a eliminação do patógeno. A citocina fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) tem um papel importante no desenvolvimento da tuberculose por induzir potente resposta inflamatória, além de regular a apoptose. O TNF- $\alpha$  atua por meio de dois receptores de superfície celular, o receptor 55-kDa (TNFR1) e o receptor 75-kDa (TNFR2). Esses receptores são inicialmente sintetizados como proteínas ancoradas na membrana celular, mas podem ser clivados por proteólise originando os receptores solúveis sTNFR-1 e sTNFR-2, que podem competir com os TNFRs pela ligação com o TNF- $\alpha$ . O objetivo desse trabalho foi analisar, *in vitro*, a expressão de TNFRs na superfície macrófagos J774.A1 infectados com o *M. bovis* BCG, além de investigar a presença de sTNFRs e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de cultura. Os resultados mostram uma produção significativa de TNF- $\alpha$  e maior expressão de TNFR1 nas culturas infectadas com *M. bovis*, em comparação ao controle não infectado. Na presença de *M. bovis* as células apresentaram uma diminuição significativa na expressão do TNFR2, o que correlacionou com maior detecção de sTNFR2. Estes dados indicam que a infecção de macrófagos J774.A1 com o *M. bovis* induz um aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  que correlaciona com uma maior expressão de TNFR1 na superfície das células cultivadas. Os níveis de sTNFR2 foram maiores após a infecção com *M. bovis* e podem influenciar no acesso do TNF- $\alpha$  ao TNFR1, modulando a atividade biológica do TNF- $\alpha$ .

**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*. TNF- $\alpha$ . Macrófago. Receptores de TNF- $\alpha$ .

1 Bolsista do Programa PROBIC/FAPEMIG/UFJF.

2 Doutoranda em Saúde, UFJF.

3 Professor Orientador - Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. Correspondência: H. C. Teixeira. Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora. CEP 36036-330 - Juiz de Fora – Minas Gerais – Brasil. Telefone/Fax: (32) 2102-3214. Email: henrique.teixeira@ufjf.edu.br

## INTRODUÇÃO

A tuberculose é reconhecida como uma emergência global, sendo a maior causa de morte de adultos por doença infecciosa (WHO, 2009). O *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico da tuberculose, bem como o *Mycobacterium bovis* espécie também patogênica para o homem, são bacilos intracelulares facultativos estritamente aeróbicos, que apresentam uma predileção pelo tecido pulmonar. O bacilo entra no organismo principalmente pela via respiratória e a fagocitose da micobactéria pelo macrófago alveolar é o primeiro evento na relação patógeno-hospedeiro (KAUFMANN, 1993; RAJA, 2004). A infecção desencadeia uma cascata de moléculas inflamatórias, incluindo a liberação de citocinas e quimiocinas pelos macrófagos alveolares e teciduais infectados (ALGOOD *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2009).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) participa da ativação de macrófagos, aumentando sua atividade microbicida. As atividades biológicas do TNF- $\alpha$  são mediadas por dois receptores de superfície celular, um de 55 kD, conhecido como receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), e outro de 75 kD, denominado receptor de TNF tipo 2 (TNFR2) (TARTAGLIA e GOEDDEL, 1992). O TNFR1, principal responsável pela sinalização do TNF- $\alpha$  na maioria dos tipos de célula, pode induzir tanto sinais de sobrevivência como sinais de morte celular. Por outro lado, o TNFR-2 medeia primariamente sinais de sobrevivência celular (IHNATKO e KUBES, 2007; GUICCIARDI e GORES, 2009).

O TNF- $\alpha$  poder atuar também como um dos moduladores da morte celular programada, também conhecida como apoptose (KEANE *et al.*, 1997; SPIRA *et al.*, 2003). A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos, através de receptores específicos localizados na superfície celular, denominados receptores de morte (GREEN e REED, 1998; PAROLIN e REASON, 2001; AMARANTE-MENDES, 2003). Grande parte dos receptores de morte pertence à superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) que inclui diversos receptores, entre eles o TNFR1 e o TNFR2 (GUPTA, 2003). Tanto o TNFR1 como o TNFR2 são inicialmente sintetizados como proteínas ligadas à membrana, mas podem perder seus domínios extracelulares por proteólise formando moléculas solúveis dos receptores, denominadas sTNFR1 e sTNFR2, capazes de se ligar ao TNF- $\alpha$  (BROCKHAUS, 1997; XANTHOULEA *et al.*, 2004; PALANDI *et al.*, 2008). Os receptores solúveis de TNF (sTNFR) podem gerar atividades agonista ou antagonista, quando ativam ou inibem a ação biológica do seu ligante, o TNF- $\alpha$ .

A ocorrência da apoptose de macrófagos infectados e não infectados induzida pelo TNF- $\alpha$ , parece ter relação com a maior ou menor expressão do receptor de TNF tipo 1 (TNFR1) (Kelly *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que a apoptose dos macrófagos infectados constitui uma estratégia alternativa que pode contribuir para a defesa do hospedeiro, uma vez que este tipo de morte celular elimina o ambiente de suporte para o crescimento das micobactérias, e também impede a sua propagação por sequestrar e reter o bacilo dentro dos corpos apoptóticos. (MOLLOY *et al.*, 1994; FRATAZZI *et al.*, 1999; KEANE *et al.*, 2000; BOCCHINO *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2006, Rodrigues *et al.*, 2009).

O objetivo desse trabalho foi analisar *in vitro* a expressão de TNFRs na superfície de macrófagos infectados com o *M. bovis* BCG, além de investigar a produção dos receptores solúveis (sTNFR) e a produção de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes de cultura.

## METODOLOGIA

Macrófagos (J774A.1) foram cultivados em estufa a 37<sup>o</sup> C e atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>, em meio RPMI 1640 suplementado com 1% penicilina/estreptomicina e 5% de soro fetal bovino. Após 5 dias de cultura as células foram lavadas, distribuídas em placas de 24 poços (10<sup>5</sup>/poço) e incubadas por 24h antes da infecção.

Alíquotas de *M. bovis* BCG (cepa Moreau, obtida da Fundação Ataulpho de Paiva, Rio de Janeiro) foram descongeladas e adicionadas às placas na proporção de 10:1 micobactérias por macrófago (MOI 10:1). Após uma hora de incubação a 37° C em 5% de CO<sub>2</sub>, as micobactérias que não foram fagocitadas foram removidas lavando-se a placa por três vezes com PBS. As células infectadas foram cultivadas por 24, 48 e 72 horas em meio RPMI 1640 suplementado.

Para a análise da expressão dos receptores de TNF- $\alpha$  na superfície celular, as células foram incubadas com anticorpos anti-CD120a-FITC (TNFR1) e anti-CD120b-PE (TNFR2) de acordo com orientações do fabricante (BD Biosciences). A expressão de cada molécula foi mensurada utilizando citômetro de fluxo (FACSCalibur) e o software CellQuest (BD Biosciences).

Os níveis de TNF- $\alpha$  e de receptores solúveis para TNF- $\alpha$  (sTNFR1 e sTNFR2) nos sobrenadantes de culturas foram mensurados por ELISA, seguindo as especificações dos fabricantes (BD OptEIA TNF Elisa Set II, Biosciences; e R&D Systems sTNF kit, respectivamente).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O TNF- $\alpha$  é uma citocina proinflamatória essencial na resposta imune frente a infecções causadas por micobactérias. O TNF- $\alpha$  está envolvido em quase todas as fases da resposta inflamatória induzida após a infecção, englobando a migração de leucócitos através dos vasos sanguíneos, sua retenção e ativação no local da infecção (SAUNDERS *et al.*, 2005).

Muitas evidências indicam que a sinalização através dos receptores de TNF (TNFR) exerce importante papel protetor na infecção contra micobactérias, relacionado com as inúmeras funções que o TNF- $\alpha$  desempenha na resposta imune contra o *Mycobacterium*. O TNF- $\alpha$  possui receptores capazes de mediar tanto sinais de sobrevivência como sinais de morte celular (TNFR1), e receptores que irão mediar apenas sinais de sobrevivência (TNFR2) (IHNATKO e KUBES, 2007). Este trabalho avaliou a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos J774.A1 após infecção com *M. bovis* BCG, investigando também a expressão de receptores de superfície (TNFRs) e receptores solúveis de TNF- $\alpha$  (sTNFR).

A análise da produção de TNF- $\alpha$  no sobrenadante das culturas previamente infectadas com *M. bovis* mostrou que houve um aumento significativo em sua produção quando comparado ao controle não infectado (Fig. 1). O aumento na produção de TNF- $\alpha$  pode ser relacionado com uma resposta da célula infectada visando aumentar sua capacidade microbicida. Foi observado também um aumento na expressão de TNFR1 nas células cultivadas com *M. bovis* (Fig. 2A). Sendo o TNFR1 o principal receptor de superfície responsável pela sinalização do TNF- $\alpha$  na maioria dos tipos de celulares (GUICCIARDI e GORES, 2009), o aumento da expressão do TNFR1 nas células infectadas com o *M. bovis* pode favorecer uma melhor sinalização induzida pelo TNF- $\alpha$  nessas células, possibilitando uma melhor resposta ao TNF- $\alpha$  e conseqüente combate à infecção.

A formação de receptores solúveis de citocinas, como os sTNFRs, é induzida através de um processo de clivagem dos receptores de membrana (conhecido em inglês como “ectodomain shedding”), processo que resulta na redução do número de moléculas dos receptores de TNF na superfície celular e que pode transitoriamente dessensibilizar as células frente a ação do TNF- $\alpha$ . Além disso, essas formas solúveis de receptores liberados (sTNFR) podem competir com os receptores de superfície celular pela ligação com o TNF- $\alpha$  e assim bloquear a atividade dessa citocina (ADERKA, 1996; XANTHOULEA *et al.*, 2004). Neste trabalho não foi observado aumento na liberação do receptor solúvel sTNFR1, indicando que os receptores TNFR1 de superfície não são clivados de forma significativa após a infecção dos macrófagos com o *M. bovis* BCG (Fig. 3A)

Quando analisamos a expressão do receptor de superfície celular TNFR2, percebemos que houve uma diminuição significativa deste receptor nas culturas contendo *M. bovis*, quando comparado com

o controle não infectado (Fig. 2B). Essa diminuição pode estar relacionada com a clivagem desse receptor da superfície dos macrófagos estudados, visto que níveis elevados do receptor solúvel sTNFR2 foram detectados nos sobrenadantes de cultura (Fig. 3B). O aumento na liberação de sTNFR2 pode representar uma tentativa do organismo de limitar a reação inflamatória, considerando que a superprodução de TNF- $\alpha$  pode causar imunopatologia (QUESNIAUX *et al.*, 2010).

Recentemente, estudos utilizando camundongos infectados com cepas virulenta e atenuada de *M. bovis* sugerem que cepa virulenta do *M. bovis* mostra capacidade de interferir na expressão do TNFR1 de superfície celular de macrófagos alveolares, assim como modular a produção de TNF- $\alpha$  e a liberação de sTNFR1, influenciando a apoptose dos macrófagos. Esta modulação da apoptose pelo *M. bovis* pode favorecer sua proliferação intracelular, saída para o meio extracelular após a fase de intensa replicação, e posterior disseminação no hospedeiro infectado (Rodrigues *et al.*, 2013).

## CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra que a infecção de macrófagos J774.A1 por *M. bovis* induz um aumento significativo na produção de TNF- $\alpha$  que correlaciona com uma maior expressão de TNFR1 na superfície das células cultivadas. Os níveis de sTNFR2 foram maiores após a infecção com *M. bovis* e podem influenciar no acesso do TNF- $\alpha$  ao TNFR1, modulando a atividade biológica desta citocina.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do CNPq, CAPES e FAPEMIG.

## DIFFERENTIAL EXPRESSION AND SHEDDING OF TNFR<sub>1</sub> AND TNFR<sub>2</sub> DURING IN VITRO MYCOBACTERIUM BOVIS INFECTION

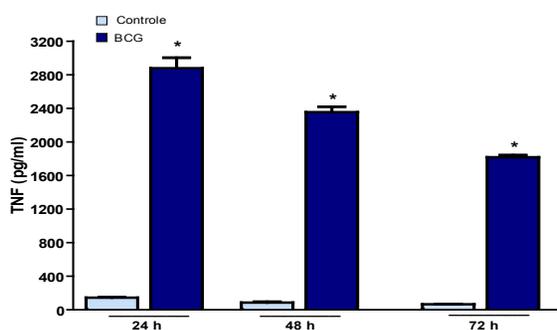
### ABSTRACT

Tuberculosis is an infectious disease caused by bacteria of the Mycobacterium genus, including *M. bovis*. These bacteria enter the body mainly by the respiratory route, being phagocytosed by alveolar macrophages. The infection triggers an inflammatory cascade aimed towards the elimination of the pathogen. The production of the cytokine tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) plays an important role in the development of tuberculosis by inducing potent inflammatory response, in addition to regulation of apoptosis. TNF- $\alpha$  acts through two cell surface receptors, the 55-kDa receptor (TNFR1) and the 75-kDa receptor (TNFR2). These receptors are initially synthesized as proteins anchored in the cell membrane, but can be cleaved by proteolysis yielding the soluble receptors sTNFR-1 and sTNFR-2, which can compete with TNFRs for binding to TNF- $\alpha$ . The aim of this study was to analyze in vitro the expression of TNFRs on the surface of *M. bovis* BCG-infected J774.A1 macrophages and to investigate the presence of TNF- $\alpha$  and sTNFRs- $\alpha$  in culture supernatants. The results show a significant production of TNF- $\alpha$  and increased expression of TNFR1 in the cultures infected with *M. bovis* in comparison with the uninfected control. In the presence of *M. bovis* the cells showed a significant decrease in TNFR2 expression, which correlated with increased detection of sTNFR2. These data indicate that infection of J774.A1 macrophages with *M. bovis* induces a significant increase in TNF- $\alpha$  production, which correlates

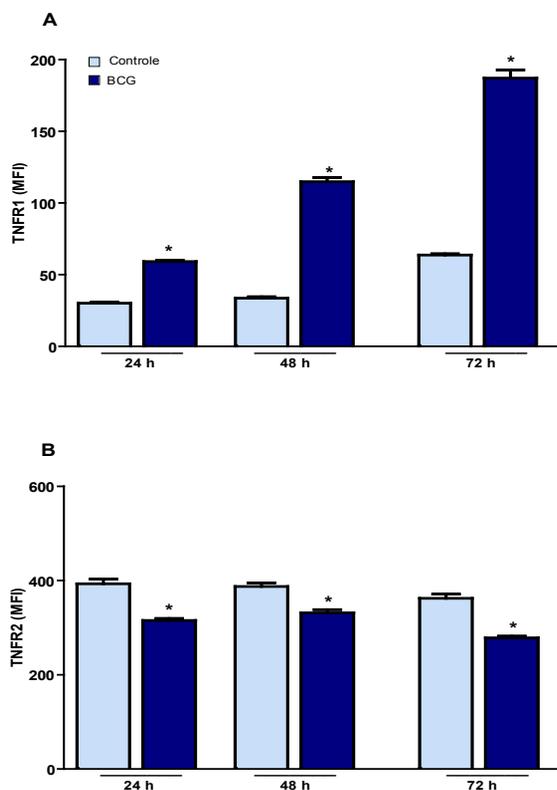
with a high cell surface expression of TNFR1. Increased sTNFR2 levels after *M. bovis* infection can influence bind of TNF- $\alpha$  to TNFR1 modulating the biological activity of TNF- $\alpha$ .

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, TNF- $\alpha$ , Macrophages, TNF- $\alpha$  receptors.

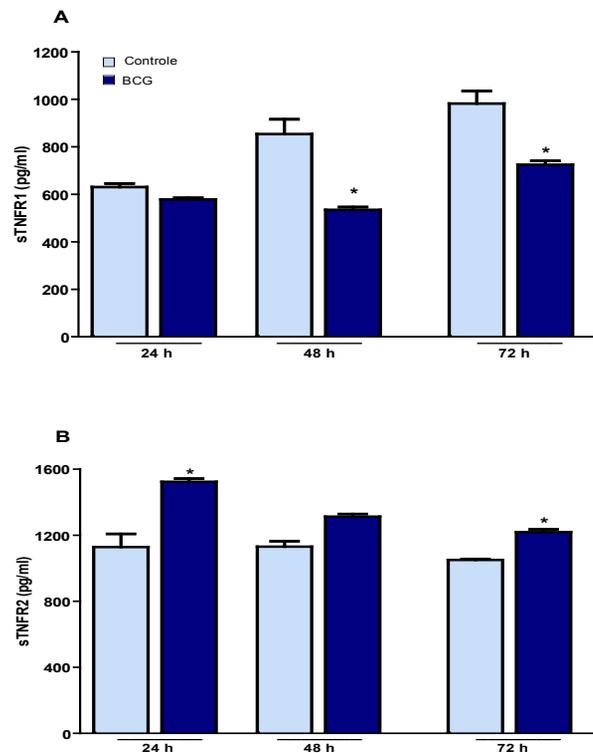
## FIGURAS E LEGENDAS



**Fig. 1 - Produção de TNF- $\alpha$  por células infectadas com *M. bovis*.** Macrófagos J774.A1 foram distribuídos em placas de 24 poços ( $10^5$ /poço) e posteriormente infectados com *M. bovis* BCG (cepa Moreau) na proporção de 10:1 micobactérias por macrófago (MOI 10:1). Células J774.A1 infectadas (barras escuras) ou não infectados (barras claras) foram cultivadas a 37°C, em 5% CO<sub>2</sub>, por 24, 48 e 72h. As concentrações de TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes das culturas foram mensuradas por ELISA. Valores representam a média e o erro padrão. \* =  $p < 0.05$  versus grupo controle não infectado.



**Fig. 2 - Expressão de TNFR1 e TNFR2 em células J774.A1 infectadas com *M. bovis* BCG.** Macrófagos J774.A1 foram cultivados com *M. bovis* BCG por 24, 48 e 72 horas (barras escuras). Após a cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-CD120a-FITC (TNFR1) (A) ou anti-CD120b-PE (TNFR2) (B) e analisadas por citometria de fluxo. Cada barra representa a média e o erro padrão, referente à intensidade de fluorescência. \* =  $p < 0.05$  versus grupo controle não infectado (barras claras).



**Fig. 3 - Detecção de sTNFR1 e sTNFR2 em culturas de células J774.A1 infectadas com *M. bovis*.** Macrófagos J774.A1 foram cultivados com *M. bovis* BCG a 37°C, em 5% de CO<sub>2</sub>, por 24, 48 e 72 horas (barras escuras). Os sobrenadantes de cultura foram testados quanto a presença dos receptores solúveis sTNFR1 (A) e sTNFR2 (B) através do método de ELISA. \* = p < 0.05 versus grupo controle não infectado (barras claras).

## REFERÊNCIAS

ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 7, p. 231-240, 1996.

ALGOOD, H. M. S., CHAN, J., FLYNN, J. L. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 14, p. 467-477, 2003.

ALMEIDA, C.S. *et al.* Anti-mycobacterial treatment reduces high plasma levels of CXC-chemokines detected in active tuberculosis by cytometric bead array. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 1039-1041, 2009.

AMARANTE-MENDES, G.P. Apoptose: Programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15-18, 2003.

BOCCHINO, M. *et al.* Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 9, p. 375-383, 2005.

BROCKHAUS, M. Soluble TNF receptor: what is the significance? **Intensive Care Medicine**, v. 23, p. 808-809, 1997.

- FRATAZZI, C. et al. Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, p. 763-764, 1999.
- GREEN, D. R., REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **SCIENCE**, v. 281, p. 1309-1312, 1998.
- GUICCIARDI, M. E., GORES, G. J. Life and death by death receptors. **FASEB Journal**, v. 23, p. 1625-1637, 2009.
- GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **International Journal of Oncology**, v. 22, p. 15-23, 2003.
- IHNATKO, R., KUBES, M. TNF signaling: early events and phosphorylation. **General Physiology and Biophysics**, v. 26, p. 159-167, 2007.
- KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular bacteria. **Annual Review of Immunology**, v. 11, p. 129-163, 1993.
- KEANE, J. *et al.* Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 298-304, 1997.
- KEANE, J., REMOLD, H.G., KORNFELD, H. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, v. 164, p. 2016-2020, 2000.
- KELLY, D. M. et al. Bystander macrophage apoptosis after *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra infection. **Infection and Immunity**, v. 76, p. 351-360, 2008.
- LEE, J. *et al.* Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by a novel caspase-independent pathway. **Journal of Immunology**, v. 176, p. 4267-4274, 2006.
- MOLLOY, A., LAOCHUMROONVORAPONG, P., KAPLAN, G. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guérin. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 1499-1509, 1994.
- PALAND, N. *et al.* Reduced display of Tumor Necrosis Factor receptor I at the host cell surface supports infection with *Chlamydia trachomatis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, p. 6438-6448, 2008.
- PAROLIN, M. B., REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos of Gastroenterology**, v. 38, p. 138-144, 2001.
- QUESNIAUX, V. F. *et al.* TNF in host resistance to tuberculosis infection. **Current Directions in Autoimmunity**, v. 11, p. 157-179, 2010.
- RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, p. 213-232, 2004.

RODRIGUES, M. F. *et al.* Apoptosis of macrophages during pulmonary *Mycobacterium bovis* infection: correlation with intracellular bacillary load and cytokine levels. **Immunology**, v. 128, p. e691-e699, 2009.

RODRIGUES, Michele F.; ALVES, Caio C. S.; FIGUEIREDO, Bárbara B. M.; REZENDE, Alice B.; WOHLRES- VIANA, Sabine, SILVA, Vânia Lúcia da; MACHADO, Marco Antônio; TEIXEIRA, Henrique C. Tumour necrosis factor receptors and apoptosis of alveolar macrophages during early infection with attenuated and virulent *Mycobacterium bovis*. **Immunology**, v. 139, n. 4, p. 503-512, 2013.

SAUNDERS, B. M. *et al.* Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Journal of Immunology**, v. 174, p. 4852-4859, 2005.

SPIRA, A. *et al.* Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. A pivotal role for Tumor Necrosis Factor. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, p. 545-551, 2003.

TARTAGLIA, L. A., GOEDDEL, D. V. Two TNF receptors. **Immunology Today**, v. 13, p. 151-3, 1992.

WHO. Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report. **WHO Press**, Geneva, 2009. 39 p.

XANTHOULEA, S. *et al.* Tumor Necrosis Factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 367-376, 2004.