

Quimiocinas e sua importância na infecção por *Mycobacterium tuberculosis*

Chemokines and their role in the infection by *Mycobacterium tuberculosis*

Ludmilla Sena¹, Dan Loureiro², Thiago de Jesus Sousa³, Roberto Meyer⁴, Ricardo Wagner Portela⁵

¹Médica Veterinária, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA; ²Biólogo, Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFBA; ³Graduando em Biotecnologia, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA; ⁴Médico, Doutor em Imunologia, Professor Titular, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA; ⁵Médico Veterinário, Doutor em Bioquímica e Imunologia, Professor Adjunto, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA, e Pós-Doutorando em Biologia Molecular de Micro-organismos, Australian Animal Health Laboratory, CSIRO Livestock Industries, Australia

Resumo

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas, que recrutam células de defesa do hospedeiro para os locais de infecção, e regulam o tráfego de linfócitos e outros leucócitos através dos tecidos linfóides periférico. Especificamente no combate às bactérias intracelulares, o tráfego e a recirculação celular são processos cruciais orquestrados por estas moléculas e seus receptores. O *Mycobacterium tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose humana, e possui a capacidade de sobreviver e de se replicar dentro dos fagócitos, tornando-se inacessível aos anticorpos circulantes. Consequentemente, sua eliminação depende basicamente de mecanismos da imunidade mediada por células, envolvendo a produção de diversas citocinas, com interações bastante complexas. Desta forma, na dinâmica da resposta imune contra o *M. tuberculosis*, as quimiocinas têm função primordial na formação e manutenção do granuloma, principal estrutura formada na tentativa de conter a disseminação deste patógeno no organismo. Portanto, pretende-se discutir a importância das quimiocinas no contexto da imunidade e/ou proteção contra a infecção com *M. tuberculosis*, relacionando-se os principais avanços na pesquisa sobre esta interação.

Palavras-chave: Granuloma. Quimiocinas. *Mycobacterium tuberculosis*.

Abstract

Chemokines (chemotactic cytokines) are a large family of structurally homologous cytokines, which recruit host defense cells to infection sites, and regulate the traffic of lymphocytes and other leukocytes through peripheral lymphoid tissues. Specifically in the defense against intracellular bacteria, the cell traffic and recirculation are critical processes orchestrated by these molecules and their receptors. *Mycobacterium tuberculosis* is the etiologic agent of human tuberculosis, and has the ability to survive and replicate within phagocytes, making it inaccessible to antibodies. Consequently, its elimination depends largely on the mechanisms of cell-mediated immunity, involving the production of several cytokines, with very complex interactions. Thus, in the dynamics of the immune response to *M. tuberculosis*, chemokines have primary role in the formation and maintenance of the granuloma, the main structure formed in an attempt to contain the spread of this pathogen in the body. Therefore, we intend to discuss the importance of chemokines in the context of immunity and/or protection against infection with *M. tuberculosis*, relating to major advances in research on this interaction.

Keywords: Granuloma. Chemokines. *Mycobacterium tuberculosis*.

A INFECÇÃO POR *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

O *M. tuberculosis* é o agente etiológico da tuberculose humana, uma das mais graves doenças infecto-contagiosas existentes, e que leva à morte cerca de 10 milhões de pessoas por ano (AHMAD, 2010; DHEDA et al., 2010; KORBEL et al., 2008). É um bacilo intracelular facultativo e aeróbio estrito, possuindo uma parede celular muito rica em lipídios, principalmente ácidos graxos de cadeia longa e ácidos micólicos (BARKAN et al., 2009).

A virulência micobacteriana e a patogenia da tuberculose estão relacionadas principalmente a esta estrutura peculiar de parede celular. O complexo da parede celular contém peptidoglicanos e, principalmente, lipídios complexos, os quais compõem cerca de 60% da estrutura total (AHMAD, 2010; GAO et al., 2004). Esta alta concentração de lipídios contribui para a resistência contra agentes antimicrobianos, resistência a agentes ácidos ou alcalinos tanto no ambiente intracelular quanto no extracelular, resistência à lise osmótica pela deposição do complemento e pelo ataque de lisozimas, e resistência a agentes oxidantes, permitindo a sobrevivência da bactéria dentro do fagolisossomo (AHMAD, 2010;

Recebido em 08/02/2012; revisado em 26/03/2012.

Correspondência / Correspondence:

BARKAN et al., 2009; DHEDA et al., 2010). Os principais componentes da parede celular do *M. tuberculosis* relacionados com a virulência são os ácidos micólicos, o fator corda, a cera-D e o lipoarabinomanano (LAM) (AHMAD, 2010; GAO et al., 2004).

A infecção pelo *M. tuberculosis* inicia-se com a inalação dos bacilos infecciosos presentes em aerossóis que foram expelidos na atmosfera. As bactérias então chegam aos pulmões, onde são fagocitadas pelos macrófagos alveolares que posteriormente se dirigem para o parênquima (KORBEL et al., 2008; RUSSEL et al., 2010). Após a infecção da célula, os agregados de *M. tuberculosis* virulentos amadurecem dentro dos fagossomos através da interrupção da fusão com o lisossoma e da acidificação, criando um nicho protetor na célula para a replicação bacteriana (COOPER, 2009; DIVANGAHI et al., 2009). Por fim, a infecção intracelular com bacilos virulentos leva o macrófago à morte por necrose, um processo caracterizado pela lise da membrana plasmática e escape das bactérias para o tecido adjacente para um novo ciclo de infecção (DIVANGAHI et al., 2009).

A multiplicação e disseminação dos bacilos provocam uma resposta inflamatória localizada que leva ao recrutamento de células mononucleares dos vasos sanguíneos vizinhos, promovendo um aporte de novas células para combater a população bacteriana em expansão (COOPER, 2009; KORBEL et al., 2008). Estas células são a base para a formação do granuloma, que é a lesão patológica característica da tuberculose. O granuloma primário é uma massa amorfa de macrófagos, monócitos e neutrófilos, porém os macrófagos se diferenciam em muitos tipos celulares especializados, incluindo gigantócitos e macrófagos epitelióides (ALGOOD et al., 2003; RUSSEL et al., 2010). Com o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida e a chegada dos linfócitos, o granuloma adquire uma estrutura mais organizada e estratificada (ALY et al., 2007; RUSSEL et al., 2010).

AS QUIMIOCINAS

O sistema imune dos mamíferos é composto pelas respostas inata e adaptativa, as quais funcionam cooperativamente a fim de controlar a invasão de patógenos, sendo que o movimento coordenado dos leucócitos é crítico para o eficiente funcionamento de ambas (DEVRIES et al., 2006). Especificamente, no combate às bactérias intracelulares, o tráfego e a recirculação celular são processos cruciais que envolvem várias etapas, incluindo rolamento, adesão e migração através do endotélio para o interior dos tecidos (ALGOOD et al., 2003). O recrutamento de leucócitos é um processo orquestrado que envolve diversas famílias de proteínas, incluindo citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão, metaloproteinases de matriz e quimiocinas (MOSER et al., 2004; PROUDFOOT, 2002).

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são uma grande família de pequenas citocinas (possuem de 8 a 12 kDa) estruturalmente homólogas (HASAN et al., 2009). O termo “quimiocinas” foi atribuído a estas moléculas uma vez que sua principal atividade biológica é a quimiotaxia, direcionando leucócitos para sítios inflamatórios através de gradientes de concentração. Porém, estas moléculas também participam de outros processos biológicos como organogênese, angiogênese, hematopoiese, recirculação homeostática de leucócitos através dos tecidos linfóides periféricos, maturação de linfócitos B e T, e regulação imune (HASAN et al., 2009; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008; MOSER et al., 2004; VIOLA e LUSTER, 2008).

As quimiocinas também se distinguem das demais citocinas por serem os únicos membros desta família que se ligam a receptores acoplados à proteína G (GPCR) (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008; VIOLA E LUSTER, 2008). Embora as quimiocinas tenham um nível relativamente pequeno de identidade na sequência de aminoácidos, sua estrutura tridimensional demonstra uma homologia marcante na qual todas têm uma mesma dobra monomérica. Esta dobra, constituída por três folhas β , uma α -hélice carboxi-terminal e uma região amino-terminal flexível, é atribuída a estas proteínas por um motivo tetra-conservado de cisteína que forma duas pontes dissulfeto características (a primeira cisteína forma uma ponte dissulfeto com a terceira e a segunda forma outra ponte com a quarta). Acredita-se que a região n-terminal flexível seja importante na ativação do receptor. Embora a topologia monomérica das quimiocinas seja semelhante, dímeros de diferentes subfamílias possuem diferentes conformações quaternárias (PROUDFOOT, 2002).

A superfamília das quimiocinas é subdividida em quatro famílias: C (ou α -quimiocinas), CC (beta-quimiocinas), CXC (alfa-quimiocinas) e CX3C (gama-quimiocinas), onde C representa os resíduos de cisteína e X o número de aminoácidos entre tais resíduos (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008; VIOLA E LUSTER, 2008). Dentre estas subfamílias, as principais são a CXC e a CC, respectivamente (INTEMANN, 2011; ROT E VON ANDRIAN, 2004). A subfamília C3XC possui apenas uma proteína e é caracterizada por três resíduos de aminoácidos entre as duas primeiras cisteínas. A subfamília C é uma exceção à regra, pois possui apenas duas das quatro cisteínas usuais (MOSER et al., 2004; ROT E VON ANDRIAN, 2004).

A nomenclatura dos receptores de quimiocinas é norteadada pela subclasse específica de quimiocina na qual estes atuam. Assim, receptores que se ligam com quimiocinas das subfamílias CC e CXC recebem, respectivamente, a denominação de CCR e CXCR, seguida por um número. As quimiocinas (os ligantes) recebem a letra “L” ao final do segundo “C”, seguida por um número. Geralmente, este número corresponde ao mesmo que é

utilizado na nomenclatura da sequência gênica correspondente à molécula (MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008).

Uma análise mais cuidadosa dos receptores de quimiocinas e de seus ligantes permite ainda que estes sejam categorizados em duas classes, dependendo se eles são produzidos constitutivamente ou perante indução (PROUNDFOOT, 2002; MOSER et al., 2004; VIOLA E LUSTER, 2008). As quimiocinas envolvidas em reações inflamatórias, chamadas “quimiocinas inflamatórias”, são produzidas por leucócitos e por vários tipos celulares (células endoteliais, epiteliais e fibroblastos) em resposta a estímulos externos, tais como micro-organismos e citocinas pró-inflamatórias, principalmente Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF-alfa) e Interleucina 1 (IL-1), ou células T estimuladas por antígenos. Isso proporciona uma ligação entre a imunidade adaptativa e o recrutamento de leucócitos inflamatórios (MOSER et al., 2004; VIOLA E LUSTER, 2008). Já as “quimiocinas homeostáticas” regulam o tráfego fisiológico de linfócitos através dos diversos tecidos e são produzidas constitutivamente em órgãos linfóides (MOSER et al., 2004; KHADER et al., 2009). Algumas também participam da organogênese durante a vida embrionária. Muitas quimiocinas não se enquadram nestas duas divisões, e outras exercem ambas as funções ao mesmo tempo, sendo então chamadas de “quimiocinas de dupla função” (MOSER et al., 2004; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). Um sumário de informações acerca das principais quimiocinas pode ser encontrado no Quadro 1.

O campo de estudo das quimiocinas é relativamente novo e ainda um pouco obscuro, já que estas foram descobertas e vêm sendo estudadas há pouco mais de 20 anos. Até o momento, foram identificadas aproximadamente 50 quimiocinas e 20 receptores de quimiocinas. Tal área vem ganhando cada vez mais importância na pesquisa, uma vez que o desequilíbrio na expressão destas proteínas e de seus receptores está envolvido no desenvolvimento de muitas patologias, dentre as quais doenças autoimunes e inflamatórias crônicas, imunodeficiências e neoplasias (VIOLA E LUSTER, 2008).

QUIMIOCINAS E SUAS FUNÇÕES

A migração orquestrada de leucócitos para órgãos linfóides e tecidos inflamados depende da habilidade das quimiocinas em regular dois processos distintos de migração, chamados extravasamento e quimiotaxia (MOSER E WILLIMANN, 2004; VIOLA E LUSTER, 2008). Com exceção da CXCL16 e da CX3CL1, que são proteínas integrais de membrana, todas as quimiocinas são proteínas secretadas que se ligam a glicosaminoglicanos (GAGs) carregados negativamente (VIOLA E LUSTER, 2008; WEBER E KOENEN, 2006).

A primeira etapa da migração celular é o extravasamento, e para sua ocorrência é essencial que

haja ligação dos receptores de quimiocinas nos leucócitos com as quimiocinas associadas ao endotélio. Perante tal interação, estas moléculas induzem uma cascata de sinalização intracelular que resulta em um rápido crescimento da adividez/afinidade por moléculas de adesão, dentre as quais as principais são as integrinas, resultando em adesão firme e transitória dos leucócitos (VIOLA E LUSTER, 2008). Subsequentemente, estes atravessam o endotélio e a membrana basal, e chegam aos tecidos, dando início à etapa de quimiotaxia, na qual os leucócitos perivasculares responderão a uma concentração de quimiocinas que os guiará para o local exato da infecção (MOSER et al., 2004). Porém, ainda não está claro se esta migração direcionada é consequência da quimiotaxia em direção a um gradiente solúvel ou associado a uma superfície, ou à maior motilidade aleatória (quimioquinesa) promovida dentro dos tecidos por sinalização induzida pelas quimiocinas (MOSER et al., 2004; MOSER E WILLIMANN, 2004; VIOLA E LUSTER, 2008).

A quimiotaxia é orquestrada, na cascata de reações intracelulares que segue a ligação das quimiocinas a seus receptores, principalmente pela GTPase Cdc42. Sem ela, os leucócitos movimentam-se aleatoriamente, ao invés de exibirem uma migração direcionada quando se encontram em um gradiente quimioatraente (ROT E VON ANDRIAN, 2004). As quimiocinas, ao se ligarem a receptores presentes na superfície celular, ativam vias de sinalização que levam à montagem localizada de actina filamentososa (F-actina) na região frontal (formando uma crista ou pseudópodo) de uma célula, levando à profusão da superfície da membrana e a uma movimentação frontal, seguida pela contração da região posterior da célula mediada pela ação da miosina II. Portanto, o movimento celular direcionado requer uma polaridade definida na qual os componentes do citoesqueleto estão localizados distintamente em dois polos da célula (CHUNG et al., 2001) Uma esquematização do processo supracitado pode ser visualizada na Figura 1.

QUIMIOCINAS NA INFECÇÃO POR *M. TUBERCULOSIS*

O maior foco no estudo das quimiocinas tem sido sua relação com infecções e processo inflamatório, sem dúvida por causa do papel central das respostas leucocitárias nestas condições. A expressão de quimiocinas é detectada em praticamente todas as infecções microbianas examinadas até então (CHENSUE, 2001).

Várias evidências dão suporte à premissa de que as quimiocinas exercem um importante papel na imunidade inata contra bactérias. Sabe-se que a resistência contra muitas infecções com bactérias gram-positivas e gram-negativas é dependente da mobilização eficiente de leucócitos polimorfonucleares neutofílicos (VIOLA E LUSTER, 2008). Estas células fagocíticas são normalmente mobilizadas em minutos

Familia	Nomes Quimiocinas		Receptores	Classificação funcional	Função
	Novo	Antigo			
CXC	CXCL1	Gro- α	CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL2	Gro- β	CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL3	Gro- γ	CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL4	PF4	CXCR3B	inflamatória	Agregação de plaquetas
	CXCL5	ENA78	CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL6	GCP-2	CXCR1, CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL7	NAP-2	CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL8	IL-8	CXCR1, CXCR2	inflamatória	Recrutamento de neutrófilos
	CXCL9	MIG	CXCR3	Dupla função	Recrutamento de células T efetoras
	CXCL10	IP-10	CXCR3, CXCR3B	Dupla função	Recrutamento de células T efetoras
	CXCL11	I-TAC	CXCR3	Dupla função	Recrutamento de células T efetoras
	CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4	homeostática	Recrutamento misto de leucócitos; co-receptor de HIV
	CXCL13	BCA-1	CXCR5	homeostática	Migração de células B
	CXCL14	BRAK	-----	homeostática	-----
CXCL16	-----	CXCR6	Dupla função	-----	
CC	CCL1	I-309	CCR8	Dupla função	Recrutamento de monócitos e migração para células endoteliais
	CCL2	MCP-1	CCR2	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL3	MIP-1 α	CCR1, CCR5	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL4	MIP-1 β	CCR5	inflamatória	Recrutamento de células T, célula dendríticas, monócitos e NK; co-receptor HIV
	CCL5	RANTES	CCR1, CCR3, CCR5	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL7	MCP-3	CCR1, CCR2, CCR3	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL8	MCP-2	CCR3, CCR5	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL9/CCL10	-----	CCR1	inflamatória	-----
	CCL11	Eotaxina	CCR3	inflamatória	Recrutamento de eosinófilos, basófilos e TH2
	CCL12	-----	CCR2	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL13	MCP-4	CCR2, CCR3	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL14	HHC-1	CCR1, CCR5	inflamatória	-----
	CCL15	MIP-1 δ	CCR1, CCR3	inflamatória	Recrutamento misto de leucócitos
	CCL16	HHC-4	CCR1, CCR2	inflamatória	-----
	CCL17	TARC	CCR4	Dupla função	Recrutamento de células T e basófilos
	CCL18	DC-CK1	-----	homeostática	Homing de linfócitos e células dendríticas
	CCL19	MIP3 β /ELC	CCR7	homeostática	Migração de células T e células dendríticas
	CCL20	MIP-3 α	CCR6	Dupla função	-----
	CCL21	SLC	CCR7	homeostática	Migração de células T e células dendríticas
	CCL22	MDC	CCR4	Dupla função	Recrutamento de células T e basófilos
	CCL23	MPIF-1	CCR1	Inflamatória	-----
	CCL24	Eotaxina-2	CCR3	Inflamatória	Recrutamento de eosinófilos, basófilos e TH2
	CCL25	TECK	CCR9	Dupla função	Migração de astrócitos
CCL26	Eotaxina-3	CCR3	inflamatória	Recrutamento de eosinófilos, basófilos e TH2	
CCL27	CTACK	CCR10	inflamatória	Migração de célula dérmica	
CCL28	MEC	CCR10	inflamatória	Migração de célula dérmica	
C	XCL1	Linfotactina	XCR1	inflamatória	Recrutamento de células T e células NK
	XCL2	SCM-1 β	XCL1	inflamatória	-----
CX ₃ C	CX ₃ CL1	Fractalcina	CX ₃ CR1	inflamatória	Recrutamento de células T, células NK e macrófagos

Quadro 1. Classificação das quimiocinas de acordo com a família, receptores, divisão funcional e função. Os campos tracejados indicam que a função e/ou receptor.

a horas para o tecido afetado e, conseqüentemente, exercem um papel crucial prevenindo a disseminação da bactéria. Bactérias que manifestam predominantemente uma infecção intracelular crônica, como as dos

gêneros *Mycobacterium* e *Listeria*, conferem uma dificuldade especial para o hospedeiro, uma vez que as quimiocinas não são consistentemente efetivas em eliminar estes agentes (HAGGE et al., 2009).

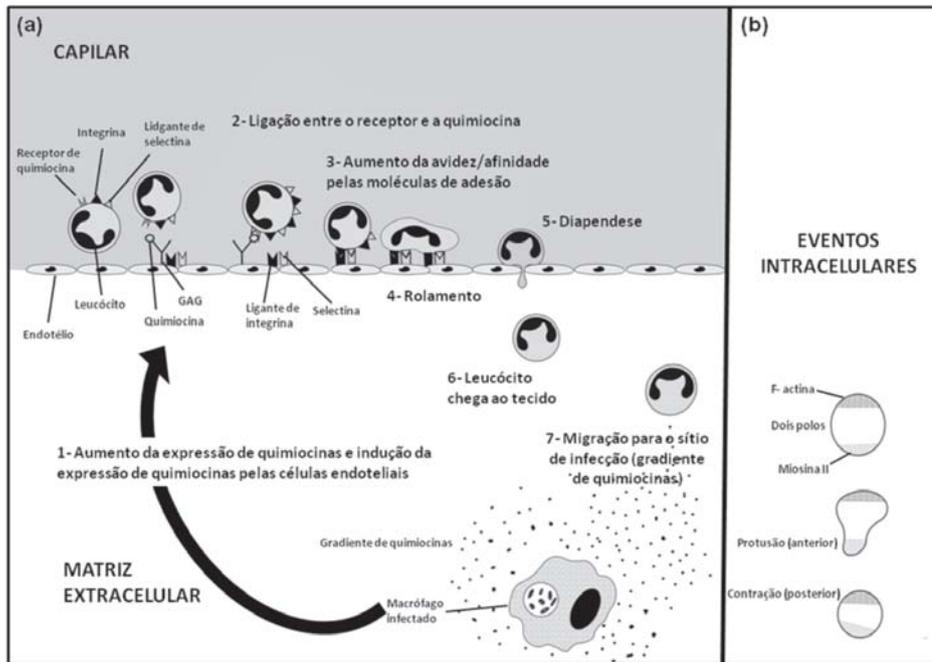


Figura 1. (a) Processos de adesão, rolamento, extravasamento e quimiotaxia orquestrados pelas quimiocinas. (b) Eventos intracelulares que correm após a ligação das quimiocinas aos receptores e que são responsáveis pela migração de células em um gradiente. Percebe-se a formação de dois polos distintos na célula, um frontal (com filamentos de miosina II) e um posterior (com filamentos de F-actina). A propulsão e contração simultâneas destes elementos propiciam a formação de pseudópodos e a movimentação celular.

O *M. tuberculosis* é um forte indutor da expressão de quimiocinas, tendo seus componentes de parede celular um papel crucial nesta ação. As respostas protetoras contra *Mycobacterium sp.* dependem da interação entre células T e macrófagos, e da relação entre citocinas pró-inflamatórias e inibitórias, as quais influenciarão a produção de quimiocinas (AHMAD, 2010; KORBEL et al., 2008). Citocinas da resposta Th1 como IFN-gama e IL-12 são essenciais na restrição da infecção com *M. tuberculosis*, já citocinas da resposta Th2, como IL-10, são importantes para o efetivo controle da inflamação no hospedeiro. IFN-gama e TNF-alfa agem de forma coordenada na formação do granuloma e regulam quimiocinas que são responsáveis pelo recrutamento e ativação de células epiteliais, mastócitos, monócitos e neutrófilos para o sítio de infecção (BEHAM et al., 2011; FALLAHI-SICHANI et al., 2011; HASAN et al., 2009; KANG et al., 2011, KORBEL et al., 2008).

Estudos *in vitro* indicam que o grau de produção das quimiocinas pode variar de acordo com a cepa bacteriana e não está necessariamente relacionado com resistência (RHOADES et al., 1995). Macrófagos são alvos-chave para a colonização de bactérias intracelulares. Ligantes de CCR2, como CCL2, são capazes de promover a ativação de macrófagos e contribuem para o recrutamento destes durante a inflamação

granulomatosa mediada por células T em resposta a antígenos micobacterianos (HASAN et al., 2009). Contudo, com a sub-otimização dos mecanismos intracelulares de eliminação, a inflamação mediada por quimiocinas pode não ser suficiente para a imunidade protetora, a qual pode depender mais de citocinas como IFN-gama e TNF-alfa (ARIAS et al., 2007; FALLAHI-SICHANI et al., 2011; KORBEL et al., 2008).

Macrófagos humanos produzem quimiocinas CC (CCL2, CCL3, CCL4 e CCL5) e CXC (CXCL8, CXCL9 e CXCL10) em resposta a cepas virulentas de *M. tuberculosis*, e estas interagem com os receptores CCR1 (CCL3, CCL5), CCR2 (CCL2), CCR5 (CCL4) e CXCR3 (CXCL8, CXCL9 e CXCL10) (ALGOOD et al., 2003; ARIAS et al., 2007; HASAN et al., 2009). Contudo, é importante ressaltar que os granulomas mediados por quimiocinas e ricos em macrófagos representam uma resposta de sequestro primitiva e menos eficiente, com conseqüente destruição intracelular bacteriana falha. Portanto, a contribuição relativa das quimiocinas pode variar significativamente de acordo com a virulência do organismo e seus mecanismos de escape (CHENSUE, 2001; HAGGE et al., 2009).

As quimiocinas da família CC possuem, em geral, a habilidade de atrair e ativar células T, monócitos/macrófagos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas e natural killer (NK), o que sugere que estas moléculas

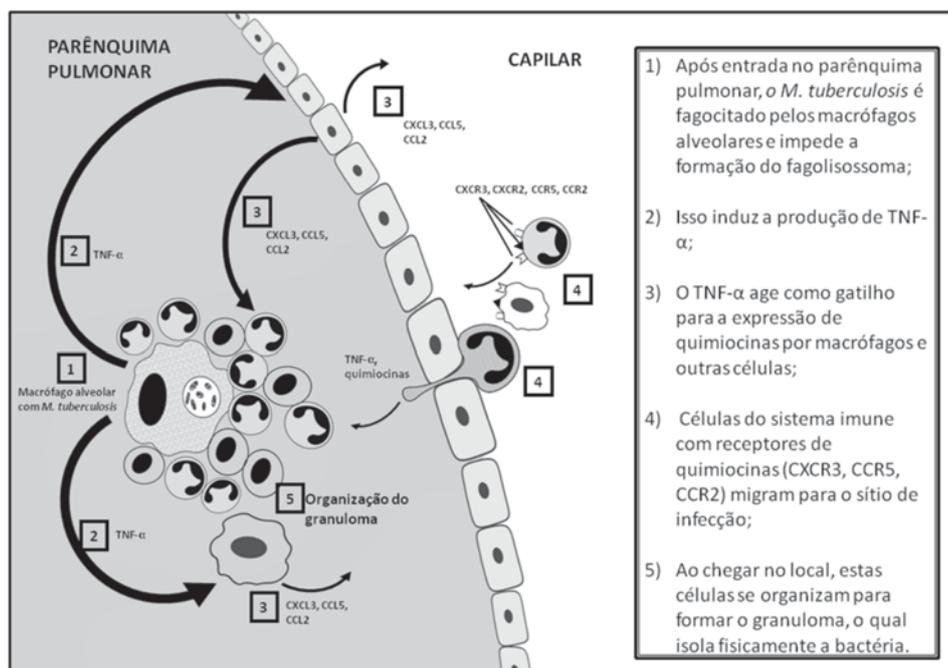


Figura 2. Modelo de resposta imune coordenada pelo TNF- α e as quimiocinas na infecção por *M. tuberculosis*.

modulam respostas imunes contra infecções bacterianas (INTEMANN, 2011; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). Já as quimiocinas da família CXC atraem e ativam principalmente neutrófilos, mas algumas também ativam células T e NK (HASAN et al., 2009; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). Especificamente, CCL3, CCL4 e CCL5 induzem ativação e proliferação de células T e de macrófagos, e CCL3 promove diferenciação de células Th1 (ARIAS et al., 2007). É bem documentado que CCL2 é o mais potente quimioatraente e ativador de monócitos e atrai linfócitos T CD4⁺ e células dendríticas, exercendo papel fundamental no controle da tuberculose em ratos (BEHAM et al., 2011; HASAN et al., 2005; INTEMANN, 2011; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). Peters et al. (2001) e Scott e Flynn (2002) realizaram trabalhos que demonstraram que a CCL2 é importante na resposta protetora contra o *M. tuberculosis*, e o seu receptor (CCR2) é essencial para a migração de macrófagos e células dendríticas para os pulmões.

Em trabalho realizado por Méndez-Samperio et al. (2008), evidenciou-se que em resposta à estimulação com bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *Mycobacterium bovis* as células do hospedeiro secretam quimiocinas CC a fim de atrair componentes do sistema imune inato e adaptativo para o sítio de infecção. Demonstrou-se que o receptor Toll Like-2 reconhece moléculas de *M. bovis* BCG e inicia vias de sinalização que resultam no aumento da secreção de CCL2 e CCL5. Vesosky et al. (2010) realizaram experimentos com ratos CCL5 ^{-/-} infectados com aerossóis de *M. tuberculosis*. Demonstrou-se que estes animais, durante a infecção

inicial com a bactéria, recrutaram poucas APCs e células T com receptores de quimiocinas para os pulmões, e apresentaram, à microscopia, evidências de alteração no tráfego celular para os granulomas. A resposta imune adquirida precoce e a formação do granuloma foram fracas na ausência de CCL5, evidenciando a importância desta quimiocina no controle da tuberculose.

Estas quimiocinas exercem papéis fundamentais na formação do granuloma, uma das principais estruturas envolvidas no combate ao *M. tuberculosis* (HAGGE et al., 2009; HASAN et al., 2009; MÉNDEZ-SAMPERIO, 2008). A inflamação granulomatosa é a característica histológica marcante de infecções com alguns agentes intracelulares, consequência da estimulação antigênica crônica causada pela persistência bacteriana no fagócito (BEHAM et al., 2011). Um granuloma é composto de vários tipos celulares, incluindo macrófagos, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e linfócitos B, e suas principais funções são isolar fisicamente a bactéria, impedindo sua disseminação no organismo, e criar um ambiente que permita a interação das células para uma resposta imune efetiva onde produção de citocinas, ativação de macrófagos e linfócitos T CD8⁺ efetores agem na tentativa de eliminar o patógeno (ALGOOD et al., 2003; ALY et al., 2007; FALLAHI-SICHANI et al., 2011; HAGGE et al., 2009).

Com relação aos granulomas nas infecções humanas por *M. tuberculosis*, pode-se observar populações de macrófagos que se diferenciam em células gigantes multinucleadas (gigantócitos). Ocasionalmente,

onalmente, alguns gigantócitos podem ser observados nos granulomas murinos, normalmente em condições de inflamação severa (AHMAD, 2010). Nos granulomas humanos, os macrófagos estão localizados centralmente com os linfócitos rodeando e infiltrando a área dos macrófagos (ALGOOD et al., 2003; FALLAHI-SICHANI et al., 2011). Khader et al. (2009) destacaram a importância da quimiocina CXCL13 na organização espacial dos linfócitos no interior dos granulomas através de experimento utilizando camundongos CXCL13 -/-.

Macrófagos e linfócitos T e B são atraídos para o sítio de infecção a fim de compor a estrutura do granuloma não só pela ação das quimiocinas, mas também devido a ação orquestrada com outras citocinas, dentre as quais a principal é o TNF-alfa (ALGOOD et al., 2003; BEHAM et al., 2011; FALLAHI-SICHANI et al., 2011; HAGGE et al., 2009; HASAN et al., 2005; HASAN et al., 2009; KORBEL et al., 2008). O TNF-alfa é produzido por macrófagos em resposta ao LAM da parede celular do *M. tuberculosis* e influencia a produção das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 e CXCL13 e de seus receptores, a exemplo do CCR2 (ALGOOD et al., 2003). Adicionalmente, acredita-se que o TNF-alfa influencia não só a formação, mas também a manutenção e a correta estruturação do granuloma (BEHAM et al., 2011; FALLAHI-SICHANI et al., 2011; KORBEL et al., 2008). Flynn et al. (1995) e Bean et al. (1999) em estudo usando ratos TNFRp55 -/- e TNF-alfa -/- infectados com *M. tuberculosis* demonstraram que os granulomas nestes animais ou não eram formados ou quando formados eram desorganizados. Mohan et al. (2001) observou que quando é injetado anticorpo anti-TNF-alfa em ratos, os granulomas preexistentes são dissociados, liberando as bactérias nos pulmões e levando à doença severa.

Lin et al. (2010) realizaram um trabalho onde avaliaram os efeitos da neutralização do TNF-alfa em primatas não-humanos infectados experimentalmente com o agente da tuberculose. Administrou-se, nestes animais, drogas anti-TNF, resultando em doença fulminante e disseminada após 8 semanas de infecção. Observou-se, além de doença disseminada e alta carga bacteriana, uma estrutura granulomatosa completamente desorganizada quando estas cobaias foram comparadas com os animais-controle nos quais não foram administrados agentes anti-TNF. A neutralização de TNF ainda foi acompanhada de aumento nos níveis de IL-12, decréscimo nos de CCL4, aumento na expressão de receptores de quimiocinas e redução na produção de IFN-gama específico contra *M. tuberculosis*.

Algood et al. (2003) propôs a seguinte dinâmica de resposta imune contra o *M. tuberculosis*: após ser inalado, o *M. tuberculosis* entra nos macrófagos alveolares e do parênquima. Isto induz a produção de TNF-alfa, que age como um gatilho para a expressão de quimiocinas pelos macrófagos (e, conseqüentemente,

por outras células) no sítio da infecção. As quimiocinas expressas penetram nos pulmões em direção ao sítio da infecção, guiando células do sistema imune para o local onde estão os macrófagos infectados. Os linfócitos T recém-chegados são células efetoras ativadas, com receptores como CXCR3 e CCR5 que respondem às quimiocinas que foram induzidas pelo TNF-alfa. Monócitos e macrófagos (que se movimentam por rolamento através dos receptores CCR2 e CCR5 expressos nas paredes do endotélio) também são recrutados para o local da infecção e também incrementam a produção de quimiocinas para o futuro recrutamento de mais células. Quando todas estas células chegam ao sítio de infecção, elas se organizam e formam o granuloma. Em uma situação na qual a produção de TNF-alfa é neutralizada, a produção de quimiocinas é desregulada; conseqüentemente, embora as células possam entrar nos pulmões, elas são incapazes de migrar para o local correto. Uma esquematização dessa sistemática da resposta imune pode ser visualizada na Figura 2.

Porém, é importante ressaltar que interpretar a regulação e expressão das quimiocinas na infecção por *M. tuberculosis* e outros agentes, particularmente *in vivo*, é um desafio. Primeiro, pelo fato da produção destas moléculas ser regulada por diversas citocinas. Segundo, devido a elas agirem em um gradiente. Este último fato faz com que sua alta produção não signifique que necessariamente mais células migrarão em resposta ao sinal. Altos níveis de quimiocinas podem saturar um receptor e dessensibilizar a célula para o sinal de migração. Especificamente com estudos envolvendo o *M. tuberculosis*, a expressão de quimiocinas é muito diferente dentro do granuloma se comparado com todo o pulmão, já que estas moléculas participam da formação e manutenção desta estrutura (ALGOOD et al., 2003).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de terem sido descobertas há pouco mais de 20 anos, é evidente a importância das quimiocinas. No caso da infecção por *M. tuberculosis*, não se pode deixar de considerar a importância de tais moléculas na dinâmica da resposta imune do hospedeiro. Por este motivo, esta família de citocinas vem sendo intensamente estudada pelos cientistas, a fim de melhor elucidar os mecanismos imunes contra o *M. tuberculosis*. Tal conhecimento é de extrema importância, já que as quimiocinas e seus receptores são alvos promissores para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e profiláticas que possam ajudar no combate à tuberculose, uma das doenças infectocontagiosas mais importantes do mundo.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir. Res.*, London, v. 11, n. 1, p. 169-186, 2010.
- ALGOOD, H. et al. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.*, Oxford, v. 14, n. 6, p.467-477, 2003.

- ALY, S. et al. Interferon-gamma-dependent mechanisms of mycobacteria-induced pulmonary immunopathology: the role of angiostasis and CXCR3-targeted chemokines for granuloma necrosis. **J Pathol.**, Edinburgh, v. 212, n. 3, p. 295-305, 2007.
- ARIAS, M. A. et al. *Mycobacterium tuberculosis* antigens specifically modulate CCR2 and MCP-1/CCL2 on lymphoid cells from human pulmonary hilar lymph nodes. **J Immunol.**, Baltimore, v. 179, n. 12, p. 8381-8391, 2007.
- BARKAN, D., et al. Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chem Biol.**, London, v. 16, n. 5, p. 499-509, 2009.
- BEAN, A. G. D. et al. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol.**, Baltimore, v.162, n. 6, p. 3504-3511, 1999.
- BEHAM, A. W. et al. TNF-regulated recombinatorial macrophage immune receptor implicated in granuloma formation in tuberculosis. **PLoS Pathog.**, San Francisco, v. 7, n. 11, 2011.
- CHENSUE, S. W. Molecular machinations: chemokine signals in host-pathogen interactions. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 14, n. 4, p. 821-835, 2001.
- CHUNG, C. Y. et al. Signaling pathways controlling cell polarity and chemotaxis. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, v. 26, n. 9, p. 557-566, 2001.
- COOPER, A. M. Cell-mediated immune responses in tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 27, n. 7, p. 393-422, 2009.
- DEVRIES, M. E. et al. Defining the origins and evolution of the chemokine/chemokine receptor system. **J Immunol.**, Baltimore, v. 176, n. 1, p. 401-415, 2006.
- DHEDA, K. et al. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. **Respirology**, Carlton, v. 15, n. 3, p. 433-450, 2010.
- DIVANGAHI, M., et al. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nature Immunology**, New York, v. 10, n. 8, p. 899-906, 2009.
- FALLAHI-SICHANI, M. E. et al. Multiscale computational modeling reveals a critical role for TNF- α receptor 1 dynamics in tuberculosis granuloma formation. **J Immunol.**, Baltimore, v. 186, n. 6, p. 3472-3483, 2011.
- FLYNN, J. L. et al. Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *M. tuberculosis* in mice. **Immunity**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 561-72, 1995.
- GAO, Q. et al. Comparative expression studies of a complex phenotype: cord formation in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, Montevideo, v. 84, n. 3-4, p. 188-196, 2004.
- HAGGE, D. A. et al. Lymphotoxin-alpha and TNF have essential but independent roles in the evolution of the granulomatous response in experimental leprosy. **Am. J. Pathol.**, New York, v. 174, n. 4, p. 1379-1389, 2009.
- HASAN, Z. et al. Elevated ex vivo monocyte chemotactic protein-1 (CCL2) in pulmonary as compared with extra-pulmonary tuberculosis. **BMC Immunol.**, London, v. 6, n. 14, p. 1379-1389, 2005.
- HASAN, Z. et al. Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. **Scand. J. Immunol.**, Oslo, v. 3, n. 69, p. 259-67, 2009.
- INTEMANN, C. D. et al. MCP1 haplotypes associated with protection from pulmonary tuberculosis. **BMC Genetics**, London, v. 12, n. 1, p. 176-186, 2011.
- KANG, D. D. et al. Profiling Early Lung Immune Responses in the Mouse Model of Tuberculosis. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 1, p. 01-15, 2011.
- KHADER, S. A. et al. In a murine tuberculosis model, the absence of homeostatic chemokines delay granuloma formation and protective immunity. **J Immunol.**, Baltimore, v. 12, n.183, p. 8004-8014, 2009.
- KORBEL, D. S. et al. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. **Microbes. Infect.**, Paris, v. 10, n. 9, p. 995-1004, 2008.
- LIN, P. L. et al. TNF neutralization results in disseminated disease during acute and latent *M. tuberculosis* infection with normal granuloma structure. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v. 62, n. 2, p. 340-350, 2010.
- MÉNDEZ-SAMPERIO, P. Expression and regulation of chemokines in mycobacterial infection. **J. Infec.**, London, v. 57, n. 5, p. 374-384, 2008.
- MÉNDEZ-SAMPERIO, P. et al. *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces CCL5 secretion via the Toll-like receptor 2-NF-kappaB and -Jun N-terminal kinase signaling pathways. **Clin. Vaccine. Immunol.**, Washington, v. 15, n. 2, p. 1267-1284 2008.
- MOHAN, V. P. et al. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. **Infect. Immun.**, Washington, v. 69, n. 3, p. 1847-1855, 2001.
- MOSER, B.; WILLIMANN, K. Chemokines: role in inflammation and immune surveillance. **Ann. Rheum. Dis.**, London, v. 63, n. 3, p. 264-73, 2004.
- MOSER, B. et al. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. **Trends Immunol.**, Oxford, v.25, n 2, p.75-84, 2004.
- PETERS, W. et al. Chemokine receptor 2 serves an early and essential role in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, Washington, v. 98, n. 14, p. 7958-7963, 2001.
- PROUDFOOT, A. E. I. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. **Nat. Rev. Immunol.**, London, v. 2, n. 5, p. 106-115, 2002.
- RHOADES, E. R. et al. Chemokine response in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, Washington, v. 63, n. 10, p. 3871- 3877, 1995.
- ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokine grammar for immune cells. **Annu. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 22, n.6, p. 891-928, 2004.
- RUSSELL, D. G. et al. Tuberculosis: What We Don't Know Can, and Does, Hurt Us. **Science.**, Washington, v. 328, n. 5980, p. 852-856, 2010.
- SCOTT, H. M.; FLYNN, J. L. *Mycobacterium tuberculosis* in chemokine receptor 2-deficient mice: influence of dose on disease progression. **Infect. Immun.**, Washington, v. 70, n.11, p. 5946-5954, 2002.
- VESOSKY, B. et al. CCL5 participates in early protection against *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Leukoc. Biol.**, Winston-Salem, v. 87, n. 6, p. 1153-1165, 2010.
- VIOLA, A.; LUSTER, A. D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Palo Alto, v. 48, n. 8, p. 171-197, 2008.
- WEBER, C.; KOENEN, R. R. Fine-tuning leukocyte responses: towards a chemokine "interactome". **Trends. Immunol.**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 268-73, 2006.