

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Ana Carolina Benites Badaró

**PARTICIPAÇÃO DA SUBUNIDADE D2 DA PROTEÍNA ATPASE VACUOLAR
(ATP6V0D2) NA BIOGÊNESE DOS VACÚOLOS FORMADOS PELA INFECÇÃO
DE *COXIELLA BURNETII* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7**

São Paulo

2019

Ana Carolina Benites Badaró

**PARTICIPAÇÃO DA SUBUNIDADE D2 DA PROTEÍNA ATPASE VACUOLAR
(ATP6V0D2) NA BIOGÊNESE DOS VACÚOLOS FORMADOS PELA INFECÇÃO
DE *COXIELLA BURNETII* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pela Profa. Dra. Dyana Henriques, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Badaró, Ana Carolina Benites

Participação da subunidade D2 da proteína atpase vacuolar (ATP6V0D2) na biogênese dos vacúolos formados pela infecção de *Coxiella burnetii* em macrófagos RAW 264.7 / Ana Carolina Benites Badaró. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

58 p.

Orientação de Dyana Alves Henriques.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. ATPase vacuolar 2. *Coxiella burnetii* 3. Febre Q 4. Macrófagos 5. Vacúolos I. Henriques, Dyana Alves II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 576

Ana Carolina Benites Badaró

**PARTICIPAÇÃO DA SUBUNIDADE D2 DA PROTEÍNA ATPASE VACUOLAR
(ATP6V0D2) NA BIOGÊNESE DOS VACÚOLOS FORMADOS PELA INFECÇÃO
DE *COXIELLA BURNETII* EM MACRÓFAGOS RAW 264.7**

São Paulo, 19 de novembro de 2019.

Professora Orientadora: (Dyana Henriques)

Professor Examinador (Fabio Mitsuo Lima)

São Paulo

2019

DEDICATÓRIA

Agradeço imensamente aos meus pais e minha irmã, que me apoiaram desde o momento da escolha do curso e me deram todo tipo de suporte durante a faculdade, com muito amor, paciência e confiança. Obrigada por permanecerem ao meu lado, ouvindo diariamente todas as experiências vividas, muitas vezes sem nem conseguir compreender o que eu tentava dizer.

À todos da minha família, que sempre acreditaram em meu potencial, dizendo, cheios de esperança, que a neta/sobrinha/afilhada/prima já era quase uma biomédica. Também ao meu namorado, André, que me acompanhou, apoiando sempre com muito carinho e paciência, desde os primeiros estudos de anatomia até os experimentos mais complexos realizados na UNIFESP.

Às minhas amigas Amanda, Sophia, Nadine, Luiza e Aline, que fizeram da minha graduação um processo muito mais leve, garantindo risadas todos os dias. Nossos momentos juntas já me fazem muita falta.

Sou muito grata a todos do lab RAM, especialmente ao Renato e à Carina, grandes responsáveis por minha evolução na ciência e minha admiração pelo mundo da pesquisa.

Por fim, agradeço a todo o corpo docente do Centro Universitário São Camilo, que me transmitiu conhecimento com uma mistura de profissionalismo e amor. Especialmente à Dyana que aceitou me auxiliar, mesmo em meio a tantos compromissos, nessa difícil tarefa de elaboração do TCC.

RESUMO

A *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) é um patógeno intracelular obrigatório e agente etiológico da zoonose conhecida como febre Q. É capaz de infectar diversos tipos celulares *in vitro*, sendo abrigada em vacúolos intracelulares (Vacúolos contendo *Coxiella*, VCCs) de pH ácido, que proporcionam condições favoráveis à sua multiplicação e metabolismo. Contudo, alguns microrganismos como a *C. burnetii* são capazes de formar vacúolos e sobreviver no interior destas estruturas ácidas. Uma característica importante dos vacúolos maduros formados por infecções de patógenos é a intensa atividade de proteínas responsáveis pela acidificação vacuolar, as ATPases vacuolares (v-ATPases). As v-ATPases são organizadas em domínio V1, formado por oito subunidades, e V0 composto de cinco subunidades, nos quais são responsáveis pela acidificação dos vacúolos e estão presentes nos VCCs. Estudos realizados com macrófagos RAW 264.7 silenciados para a subunidade d2 das v-ATPases (ATP6V0d2) infectados com *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) demonstraram que estes vacúolos parasitóforos (VPs), similares morfológicamente aos VCCs, apresentaram diminuição em seu volume. Considerando que os estudos da infecção com *C. burnetii* envolvendo macrófagos são extremamente importantes para o entendimento da patogenicidade e propagação da bactéria, já que mimetizam a infecção natural *in vivo*, avaliamos a formação dos vacúolos de *C. burnetii* durante a infecção em macrófagos RAW 264.7 silenciados para a subunidade d2 das v-ATPases. Investigamos também se o crescimento vacuolar e a multiplicação da bactéria são dependentes de ATP6V0d2, assim como observado na infecção por *L. amazonensis*. Por fim, avaliamos a produção de óxido nítrico e expressão de óxido nítrico sintase 2 e arginase. Como resultado principal, verificamos que a ATP6V0d2 não possui participação ativa na biogênese dos VCCs formados durante a infecção por *C. burnetii*, diferente do ocorrido na infecção com outros patógenos como a *L. amazonensis*.

Palavras-chave: ATPase vacuolar. *Coxiella burnetii*. Febre Q. Macrófagos. Vacúolos.

ABSTRACT

Coxiella burnetii (*C. burnetii*) is a mandatory intracellular pathogen and etiologic agent of the zoonosis known as Q fever. It is capable of infecting several cell types *in vitro* living inside of intracellular vacuoles (*Coxiella* containing vacuoles, CCVs) with an acid pH, which provide favorable conditions for their multiplication and metabolism. Phagocytosis is a defense mechanism that involves the formation of phagolysosomes for pathogen degradation. However, some microorganisms such as *C. burnetii* are able to form vacuoles and survive inside acidic compartments. An important characteristic of mature vacuoles formed by pathogen infections is the intense activity of proteins responsible for vacuolar acidification, the vacuolar ATPases (v-ATPases). v-ATPases are organized in domain V1, composed by eight subunits, and V0 composed of five subunits, responsible for acidification of the vacuoles and are present in CCVs. Studies of RAW 264.7 macrophages silenced to the d2 subunit of v-ATPase (ATP6V0d2) infected with *Leishmania amazonensis* showed that these parasitophorous vacuoles, morphologically similar to CCVs, showed a decrease in their volume. Considering that studies of *C. burnetii* infection involving macrophages are important for understanding the pathogenicity and spreading of this bacteria, since they mimic natural infection *in vivo*, we evaluated the formation of *C. burnetii* containing vacuoles during infection in RAW 264.7 macrophages silenced for the v-ATPase d2 subunit. We also investigated whether the vacuolar growth and multiplication of the bacteria is ATP6V0d2 dependent, as observed in *L. amazonensis* infection. Finally, we evaluated nitric oxide production and nitric oxide synthase 2 and arginase expression. As a main result, we found that ATP6V0d2 does not play an active role in the CCVs biogenesis formed during *C. burnetii* infection, unlike infection with other pathogens such as *L. amazonensis*.

Keywords: Vacuolar ATPase. *Coxiella burnetii*. Q fever. Macrophage. Vacuoles.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Via de tráfego intracelular da <i>Coxiella burnetii</i>	18
Figura 2 – Estrutura das ATPases vacuolares (v-ATPases).....	21
Figura 3 – Imagem demonstrativa do tamanho dos VCCs classificados como espaçosos ou reduzidos	34
Figura 4 – Não houve diferença no tamanho ds VCCs ao decorrer da infecção.....	35
Figura 5 – A porcentagem de infecção não se altera ao longo do tempo entre células NS e ATP6V0d2-kd.....	36
Figura 6 – Não houve superexpressão da subunidade d1 durante a infecção com <i>C. burnetii</i>	37
Figura 7 – <i>C. burnetii</i> não induz expressão da subunidade d2.....	38
Figura 8 – A manutenção da infecção em tempos tardios foi prejudicada em células ATP6V0d2-kd.....	40
Figura 9 – Macrófagos ativados e infectados não apresentam formação de VCCs.....	41
Figura 10 – Aumento na produção de NO em células infectadas e ativadas.....	42
Figura 11 – Em células controle e <i>knock down</i> a presença da bactéria aumenta a expressão de arginase e em células previamente ativadas induz maior expressão de NOS2.....	43
Figura 12 –A ausência da subunidade d2 não influenciou na porcentagem de células infectadas e coinfectadas.....	46
Figura 13 – Diminuição da quantidade de vacúolos na infecção tardia.....	47

LISTA DE SIGLAS

ATP6V0d1 – Subunidade d1 da ATPase vacuolar

ATP6V0d2 – Subunidade d2 da ATPase vacuolar

ATP6V0d2-kd – Silenciado para a subunidade d2 da ATPase vacuolar

CCVs – *Coxiella Containing Vacuoles*

DAPI – Cloridrato de 4,6-diamindino-2-fenilindol

DMSO – Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético

EEA – Early endosome antigen

IFN- γ – Interferon-gama

LCV – *Large cell variant*

LPS – Lipopolissacarídeo

MLVA - *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis*

MST - *multispacer sequence typing*

NO – Óxido nítrico

NOS2 – Óxido nítrico sintase 2

NS – Não silenciado

p.i. – pós infecção

PBS – Tampão fosfato-salino

PFA – Paraformaldeído

RNAm – RNA mensageiro

SCV – *Small cell variant*

SFB – Soro Fetal Bovino

T4BSS – Sistema de secreção especializado tipo IVB

TGF- β – fator de crescimento transformante beta

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

v-ATPase – ATPase vacuolar

VCCs – Vacúolos Contendo *Coxiella*

VP – Vacúolo parasitóforo

LISTA DE ABREVIATURAS

C. burnetii – *Coxiella burnetii*

L. amazonensis – *Leishmania amazonensis*

S. typhimurium – *Salmonella typhimurium*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Febre Q.....	14
1.2	<i>Coxiella burnetii</i>	16
1.3	Formação e maturação dos vacúolos na infecção por <i>C. burnetii</i>	17
1.4	ATPase vacuolar H ⁺ (v-ATPase).....	20
1.5	Infecção da <i>C. burnetii</i> em macrófagos.....	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	Manutenção de células	26
3.1.1	Células RAW 264.7	26
3.1.2	Células Vero	26
3.2	<i>Coxiella burnetii</i>	27
3.2.1	Cultivo da bactéria	27
3.2.2	Purificação.....	27
3.3	Análise de vacúolos formados pela infecção de <i>C. burnetii</i>	28
3.4	Quantificação das subunidades d1 e d2 via Reação em cadeia da polimerase (PCR) Real Time quantitativa	28
3.5	Determinação da carga bacteriana	29
3.5.1	Extração de DNA de <i>C. burnetii</i>	29
3.5.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) Real Time quantitativa	30
3.6	Avaliação da produção de óxido nítrico	30
3.6.1	Dosagem de NO	31
3.6.2	Dosagem de proteína	31
3.7	Quantificação de arginase e NO sintase 2 (NOS2).....	31
3.8	Coinfecção	32
4	RESULTADOS	33
4.1	A infecção intracelular pela bactéria <i>C. burnetii</i> em macrófagos não silenciados e ATP6V0d2-kd mostraram aumento volumétrico dos VCCs de forma d2-independente	33
4.2	A porcentagem de infecção não se altera entre as células controle e ATP6V0d2-KD	35

4.3 Não há superexpressão da subunidade d1 nas células ATP6V0d2-kd independente da infecção por <i>C. burnetii</i>	36
4.4 A presença da bactéria não induz aumento da expressão de d2	37
4.5 Há redução da multiplicação da bactéria em tempos tardios de infecção em células ATP6V0d2-kd.....	39
4.6 Não há diferença na produção de NO entre as células NS e ATP6V0d2-KD	40
4.7 Aumento da expressão NOS2 e arginase em células infectadas e/ou ativadas	43
4.8 Não há diferença na porcentagem de infecção e coinfeção nas células silenciadas e controle.....	44
4.9 A infecção com <i>L. amazonensis</i> não interfere na formação de vacúolos largos em células infectadas com <i>C. burnetii</i>	46
5 DISCUSSÃO	48
6 CONCLUSÃO.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre Q

A febre Q é uma doença descrita no ano de 1937 por Derrick, em Queensland, que relatou o caso de 20 trabalhadores apresentando uma doença febril em uma fábrica de carnes situada em Brisbane (Derrick, 1983). Em 1955 Kaplan e Bertagna relataram os primeiros casos da doença na África, sendo esta mais prevalente em locais com grande quantidade de ruminantes domésticos como Mali e Nigéria (Dupont *et al.*, 1995). Atualmente, a febre Q não tem distribuição geográfica bem estabelecida e sabe-se que há casos no mundo todo, exceto na região antártica (Gurtler *et al.*, 2014). Testes sorológicos realizados em homens e animais sugerem que a infecção é mais frequente em regiões com clima tropical do que em clima temperado (Woldehiwet, 2004).

Um estudo realizado em 2006 reportou 16 casos da doença na região de Minas Gerais, mas apesar de ser considerada uma zoonose mundial, há poucos casos publicados de infecções em humanos no Brasil (Costa *et al.*, 2006). A maior epidemia de febre Q ocorreu nos países baixos, com 4026 casos notificados e confirmados em laboratórios (Hanssen *et al.*, 2019). As regiões mais afetadas pela doença foram as províncias de Noord-Brabant e de Gelderland. Em Noord-Brabant há cerca de 6,4 milhões de animais em fazendas com uma grande concentração de cabras, sendo que a proximidade destes animais em áreas urbanas contribui para a disseminação da doença (revisado por Eldin *et al.*, 2017).

O agente etiológico da febre Q é a *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*), e sua principal via de propagação é por meio da inalação do ar contaminado por dejetos e excreções de animais infectados ou pelo consumo de leite não pasteurizado e seus derivados (Woldehiwet, 2004; Lee *et al.*, 2006). Ovelhas, cabras, gado e gatos (e também cães, cavalos, coelhos e outros animais) são as fontes predominantes de infecção para os seres humanos, mas as aves também são reservatórios importantes (Woldehiwet, 2004).

Como a bactéria pode estar presente em grandes quantidades nas fezes, urina, leite, líquido amniótico e placenta de animais infectados, acomete principalmente

peças com maior contato com animais, como por exemplo veterinários e trabalhadores de abatedouros. Apesar disso, o contato direto com estes materiais não é estritamente necessário uma vez que hoje sabe-se que a *C. burnetii* pode permanecer viável por meses em alimentos desidratados (Revisado por Distel *et al.*, 2019).

Deve suspeitar-se de Febre Q quando há sintomas similares aos da gripe, pneumonias atípicas ou febres de origens desconhecidas, principalmente em indivíduos que trabalham com ruminantes parturientes em fazendas e centros de pesquisa ou pessoas que vivem perto destas instalações (Woldehiwet, 2004). O período de incubação se dá de uma a três semanas, após este período, 50 a 60% dos pacientes são assintomáticos. Dentre os casos sintomáticos, já foram descritas aproximadamente 30 síndromes clínicas diferentes, o que torna difícil o diagnóstico. As manifestações clínicas em humanos variam muito, podendo ir desde uma síndrome aguda a uma infecção crônica fatal (Revisado por Distel *et al.*, 2019).

A doença em sua forma aguda pode se apresentar como uma gripe forte, com presença de febre, dores de cabeça, fadiga, suores, tosse, mialgia e artralgias, que sem tratamento podem perdurar em média de uma a três semanas (Revisado por Distel *et al.*, 2019). Indivíduos com febre Q crônica podem apresentar mal-estar, perda de peso, fadiga, suor noturno, inflamação nos pulmões ou no fígado, hepatomegalia e esplenomegalia. Estes pacientes podem desenvolver infecção nas válvulas cardíacas resultando em um quadro de endocardite, que pode se associar ao acometimento de outros órgãos. Há casos menos frequentes de osteomielite, osteoartite, fibrose pneumônica, tumores pulmonares, aneurismas e alterações neurológicas (Revisado por Distel *et al.*, 2019).

A sorologia é o método mais comum para detectar a infecção, sendo a primeira técnica a ser utilizada quando o paciente apresenta sintomas relacionados a doença. Anticorpos de fase II estão presentes durante a infecção primária e podem ser detectados entre 7 e 15 dias após sintomas clínicos (Anderson *et al.*, 2013), já os anticorpos de fase I são encontrados somente em infecções persistentes (Fournier *et al.*, 1998).

1.2 *Coxiella burnetii*

A *C. burnetii* é uma bactéria intracelular obrigatória, Gram-negativa, pertencente à família Rickettsiaceae do gênero *Rickettsia* e é capaz de replicar-se intracelularmente em diferentes tipos celulares (Hackstadt e Williams, 1981). Morfologicamente, se apresenta como um cocobacilo altamente pleomórfico, medindo de 0,2 a 0,4 µm de largura e 0,4 a 1 µm de comprimento (Revisado por Distel *et al.*, 2019).

Esta bactéria pode ser classificada em seis grupos genômicos, de acordo com a análise de polimorfismo do comprimento dos fragmentos de restrição e eletroforese *pulse-field* de 32 cepas distintas. Estes grupos estão associados principalmente com a fase da doença (aguda ou crônica). Os grupos I, II e III estão relacionados com a fase aguda, os grupos IV e V com a fase crônica da infecção e o grupo VI apresenta baixa virulência em cobaias (revisado por Van Schaik *et al.*, 2013). Outras técnicas têm auxiliado na caracterização genotípica desta bactéria como *multispacer sequence typing* (MST) que é capaz de estabelecer uma relação entre o genótipo e a manifestação da doença por meio da análise de plasmídeos. Por exemplo, os plasmídeos QpH1 e QpDV estão associados com a manifestação aguda e o plasmídeo QpRS com a forma crônica da doença (Glazunova *et al.*, 2005). Técnicas como o *Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis* (MLVA) possibilitam o desenvolvimento de *primers* que analisam repetições em tandem e que detectam diferenças genéticas entre os grupos isolados responsáveis pela doença aguda ou crônica (Svraka *et al.*, 2006).

A *C. burnetii* pode ser classificada de acordo com a sua virulência, associando à presença ou ausência do antígeno O em seu lipopolissacarídeo (LPS). A fase I é conhecida como fase virulenta e o antígeno O está presente no LPS junto a outros açúcares, como a virenose; já a fase II representa a fase avirulenta em imunocompetentes e não possui o antígeno O na camada de LPS (revisado por Eldin *et al.*, 2017; Distel *et al.*, 2019). Segundo Gurtler estas duas fases não podem ser distinguidas morfolologicamente, mas podem ser identificadas por meio da coloração com fucsina e hematoxilina (Gurtler *et al.*, 2014).

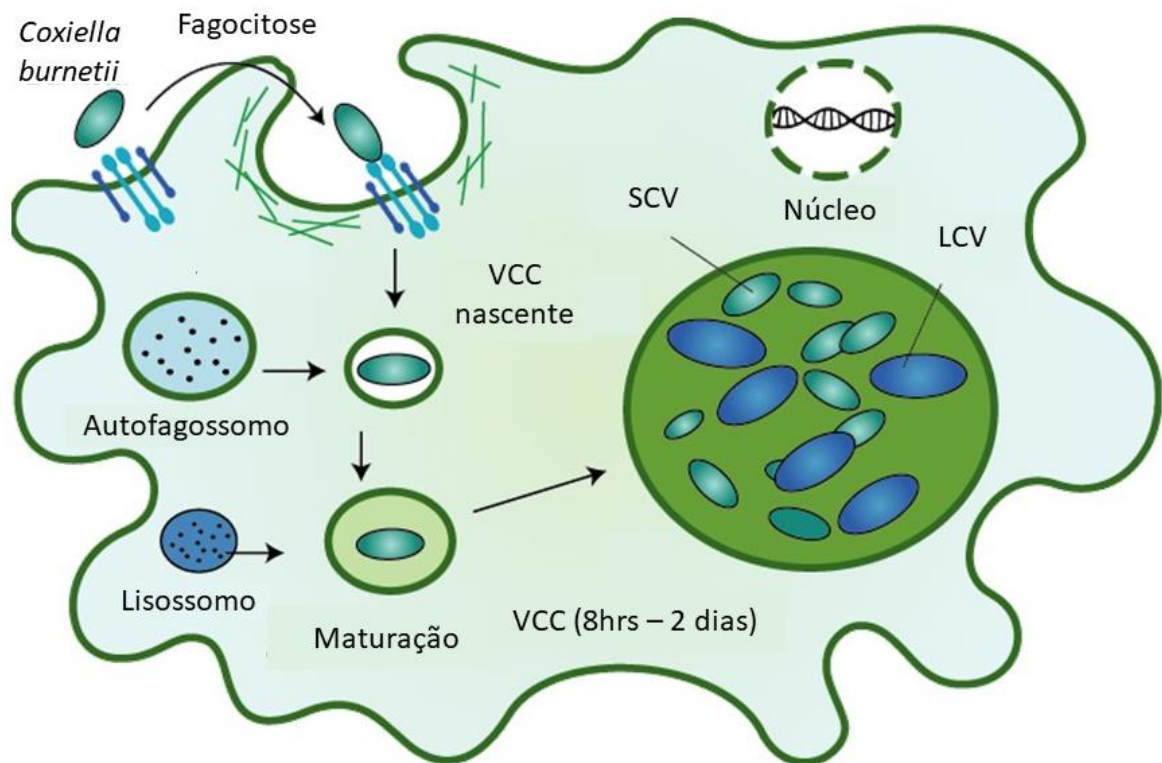
Esta bactéria é capaz de sobreviver no meio ambiente por um longo período devido ao seu desenvolvimento bifásico que consiste na transição de dois estágios

distintos que se diferem morfológicamente. O primeiro estágio é conhecido como *small cell variant* (SCV) que são estruturas mais compactas nas quais o metabolismo da bactéria está inativo, sem replicação bacteriana e há maior resistência às condições externas podendo resistir a pressões osmóticas extremas (Mccaul e Williams, 1981). Devido a isso, é a forma infectante e mais prevalente no ambiente externo (Revisado por Distel *et al.*, 2019). A mudança para o segundo estágio, ou *large cell variant* (LCV) ocorre após a invasão das células hospedeiras durante a acidificação do fagossomo, onde a bactéria torna-se metabolicamente ativa e capaz de realizar sua multiplicação. Esta forma tem ativo o sistema de secreção tipo IV B, mais conhecido como T4SS, essencial para a formação do nicho intracelular da bactéria (Revisado por Distel *et al.*, 2019).

1.3 Formação e maturação dos vacúolos na infecção por *C. burnetii*

Durante o processo de fagocitose, as bactérias são capturadas por uma invaginação da membrana plasmática, resultando na formação de fagossomos (estruturas delimitadas por uma membrana formada a partir da membrana plasmática). Este compartimento tem inicialmente um pH próximo do neutro que durante o processo de maturação, é rapidamente acidificado e funde-se a endossomos e lisossomos originando os fagolisossomos (revisado por Ndjamen *et al.*, 2010; Kissing *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 1- Tráfego intracelular da *Coxiella burnetii*.



Fonte: Adaptado de Van Schaik et al., 2013. A formação dos VCCs se inicia com o processo de fagocitose e consequente formação de um fagossomo. Este inicia rapidamente seu processo de acidificação e maturação vacuolar, fundindo-se a outras vesículas intracitoplasmáticas como autofagossomos e lisossomos. Com isso, vai aumentando seu volume podendo ocupar quase por completo o citoplasma da célula hospedeira.

As GTPases da família Rab regulam a maturação e internalização dos fagossomos. Segundo Seixas *et al.* 2012, cerca de 20 proteínas desta família participam deste processo interagindo com outras proteínas conhecidas como “efetoras” quando são ativadas. Inicialmente, os endossomos adquirem marcadores precoces como Rab5 e *Early Endosome Antigen* (EEA-1). Conforme seu amadurecimento durante a via endocítica clássica, passam a ser substituídos por marcadores tardios como Rab7 e glicoproteínas associadas a lisossomos (LAMPs, LIMPs) (Seixas *et al.*, 2012).

Após a transmissão, a bactéria *C. burnetii* é fagocitada por monócitos e macrófagos ficando no interior dos fagolisossomos. De acordo com Romano e colaboradores, a invasão desta bactéria na célula hospedeira ocorre pela via clássica de fagocitose, envolvendo aumento de EEA-1 e redução de Rab5 entre 40 e 60

minutos após a infecção. Os Vacúolos contendo *Coxiella* (VCCs) recém-formados recrutam o marcador autofagossomal LC3, o que sugere a interação com a via autofágica em momentos iniciais da infecção. Essa interação persiste em tempos mais tardios da infecção, diferentemente da expressão de Rab5, que diminui com o passar da infecção sendo posteriormente substituída pela Rab7 (Romano *et al.*, 2007).

A manipulação do tráfego intracelular é uma importante estratégia empregada pela *C. burnetii* para promover a biogênese dos vacúolos contendo *Coxiella* (Larson e Heinzen, 2017). Os VCCs podem fundir-se com outros VCCs, lisossomos, endossomos, fagolisossomos e outros compartimentos intracelulares, formando assim o vacúolo espaçoso característico (Distel *et al.*, 2019). Os vacúolos formados são largos com filamentos nucleoides bacterianos que se apresentam de forma dispersa no citoplasma e podem também se desenvolver em cultura celular (Mccaul e Williams, 1981; Coleman *et al.*, 2004).

Para investigar as organelas celulares e vesículas que interagem com os vacúolos de *C. burnetii*, Heinzen e colaboradores, usaram uma grande variedade de marcadores para a via lisossomal. Eles observaram que esta bactéria reside em vacúolos ácidos lisossomais caracterizados pelos marcadores LAMP-1, LAMP-2 e enzimas lisossomais como fosfatase ácida e catepsina D, concluindo assim que *C. burnetii* reside em um fagolisossomo típico (Heinzen *et al.*, 1996) e hidroliticamente competente, pois o pH baixo deste microambiente, ativa enzimas que medeiam morte e degradação de patógenos (Kissing *et al.*, 2018).

Como a *C. burnetii* é naturalmente resistente à atividade lisossômica dos macrófagos (Cockrell *et al.*, 2017), após a fagocitose desta bactéria, são formados os VCCs, que aumentam consideravelmente de tamanho após 8 horas a 2 dias de infecção, podendo ocupar por completo o citoplasma da célula hospedeira. Um fator importante para a manutenção do vacúolo é o citoesqueleto de actina, já que estudos demonstraram que células infectadas e tratadas com despolimerizador de actina resultam em vacúolos reduzidos (Aguilera *et al.*, 2009).

A biogênese do VCC e o sucesso da infecção dependem também da manipulação de funções da célula hospedeira por proteínas efetoras liberadas pela bactéria. O sistema de secreção especializado Dot/Icm tipo IV B (T4BSS), que media as interações entre o VCC e também a via de autofagia, parece beneficiar o

crescimento da bactéria (Beare *et al.*, 2011; Cockrell *et al.*, 2017; Latomanski e Newton, 2018). Segundo Cockrell e Beare, T4BSS também está relacionado com a resistência das células hospedeiras a indutores de apoptose, uma vez que quatro proteínas efetoras T4BSS podem exercer efeitos pró-sobrevida. Esse pode ser considerado um fator de virulência importante que permite o crescimento lento da bactéria no interior dos VCCs, uma vez que a célula se mantém viva por mais tempo (Beare *et al.*, 2011; Cockrell *et al.*, 2017). *C. burnetii* também pode prolongar a sobrevivência da célula hospedeira inibindo as vias de sinalização de apoptose ou por meio da ativação de proteínas ERK1, ERK2 e AKT mantendo a estabilidade genômica e a viabilidade da célula hospedeira (Beare *et al.*, 2011; Cockrell *et al.*, 2017).

Bem como a *C. burnetii*, outros patógenos como o parasita protozoário *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*), ao serem fagocitados pelo hospedeiro, são capazes de formar vacúolos chamados parasitóforos (VPs), de características ácidas lisossomais e sobreviver em seu interior, trocando prótons passivamente adquiridos por substratos necessários com a ajuda de ATPases da membrana plasmática (Veras *et al.*, 1995). Interessantemente, Veras e colaboradores demonstraram que *L. amazonensis* pode, pelo menos temporariamente, sobreviver, replicar e diferenciar-se dentro dos vacúolos de *C. burnetii*. Assim pode-se inferir que há grande similaridade entre os mesmos, não só em sua morfologia, mas também em seus componentes que permitem a sobrevivência tanto da bactéria quanto do parasita (Veras *et al.*, 1995).

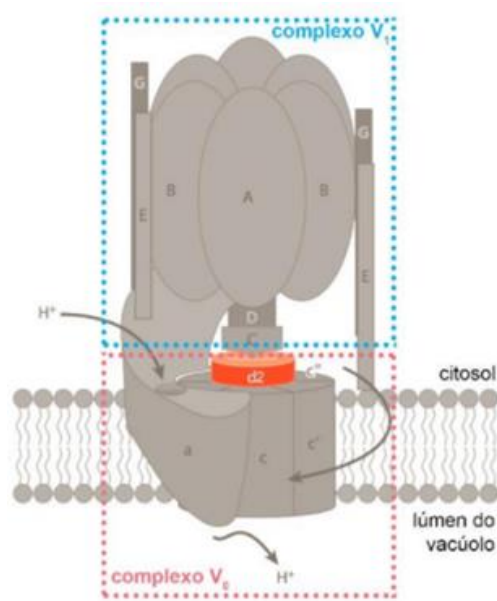
1.4 ATPase vacuolar H⁺ (v-ATPase)

As ATPases vacuolares H⁺ (v-ATPases) são enzimas multiméricas responsáveis pelo controle da acidificação das vesículas intracelulares como lisossomos, endossomos e fagolisossomos (Kissing *et al.*, 2018;). Elas se localizam na membrana dessas estruturas, e sua função canônica de acidificação de compartimentos intracelulares é decorrente da capacidade de bombear prótons do citossol para o lúmen destas organelas, de maneira dependente de ATP (Revisado por Forgac, 2007).

Este complexo multiproteico é composto por estruturas organizadas em dois domínios V1 e V0. O domínio V1, de 650 kDa, fica localizado na parte citoplasmática

da membrana e é responsável pela hidrólise do ATP, formado por oito subunidades (A-H). Já o domínio V₀, que é inserido na membrana e tem 260 kDa, é responsável pela translocação de prótons através da membrana na direção do citoplasma para o lúmen ou o meio extracelular, sendo composto por cinco subunidades (a, d, c, c' e c'') (Figura 2) (revisado por Manolson *et al.*, 1994; Forgac, 2007).

Figura 2 - Estrutura das ATPases vacuolares (v-ATPases)



Fonte: Adaptado de Forgac, 2007. O complexo da bomba ATPase vacuolar é composto de um domínio periférico (V₁, mostrado azul) e um domínio integral de membrana (V₀, mostrado em rosa). O centro do domínio V₁ é composto de um arranjo hexamérico que alterna as subunidades A e B que participam na ligação e hidrólise do ATP. A subunidade d faz a conexão entre os dois complexos, sendo expressa e acoplada à v-ATPase ora em sua isoforma ubíqua d1, ora em sua isoforma d2 (em laranja), expressa em determinadas linhagens celulares e tecidos.

Estudos comprovam a atuação de subunidades específicas em funções celulares como a subunidade C1 do domínio V₁, expressa em osteoclastos, que auxilia na reabsorção óssea por meio da formação de anéis de actina (Feng *et al.*, 2009) e a subunidade a do domínio V₀ que pode ser expressa em 4 isoformas diferentes, apresentadas em células distintas e organelas diferentes (Marshansky e Futai, 2008).

A subunidade d (ATP6V0d) que pertence ao domínio V₀, conecta os dois domínios do complexo v-ATPase, e pode ocorrer como duas isoformas variantes em humanos e camundongos. A ATP6V0d1 participa do processo de bombeamento de

prótons das v-ATPases e é mais ubíqua em relação à isoforma alternativa ATP6V0d2 (Smith *et al.*, 2005).

A isoforma d2 de 38 kDa, alvo do nosso estudo, tem expressão restrita a certos tecidos como ossos, rins e pulmões (Smith *et al.*, 2005) e células como osteoclastos (Wu *et al.* 2009) e macrófagos (Lizio *et al.*, 2015). Ela foi descrita por Wu e colaboradores como uma isoforma importante para a fusão de pré-osteoclastos provenientes da medula óssea de camundongos e não somente para a acidificação intracelular de organelas (Wu *et al.*, 2009).

As v-ATPases são responsáveis pela acidificação de fagolisossomos em macrófagos e outros fagócitos profissionais (Revisado por Forgac, 2007). Devido a isso, uma característica importante dos vacúolos maduros formados por infecções de patógenos é a intensa atividade deste complexo (Kissing *et al.*, 2018). Visto que a manutenção do pH ácido controlado pela v-ATPase é importante para a ação de enzimas digestivas e produção de espécies reativas de oxigênio envolvidos na degradação de patógenos (Vieira *et al.*, 2002), determinados microrganismos intracelulares desenvolveram estratégias como a subversão das funções da v-ATPase para reverter a ação degradativa dos fagolisossomos. Essa subversão pode envolver interferência em uma ou mais subunidades, inibindo a função de bombeamento de prótons ou fazendo com que a v-ATPase atinja outras organelas como lisossomos ou endossomos (Huynh e Grinstein, 2007).

As bactérias *Mycobacterium tuberculosis* e *Legionella pneumophila*, desenvolveram mecanismos que favorecem sua sobrevivência no interior dos vacúolos em que estão contidas, bloqueando a acidificação dessas estruturas por meio da secreção de fatores de virulência, que se dirigem especificamente para a subunidade H do domínio V1 da v-ATPase da célula hospedeira inibindo a atividade da v-ATPase e aumentando o pH dos vacúolos em que estão contidas (Grundner *et al.*, 2005; Soldati e Neyrolles, 2012).

Heinzen e colaboradores relataram a presença da subunidade H1 das v-ATPases na membrana dos VCCs, atestando assim sua presença nos mesmos. Segundo este grupo, a acidificação dos vacúolos formados pela *C. burnetii* está de fato relacionada com a bomba de prótons v-ATPase (Heinzen *et al.*, 1996; Nishi *et al.*, 2003). Neste mesmo trabalho também concluíram que a acidificação do vacúolo (pH

4.5 a 5.0) é importante para o crescimento da bactéria já que na presença de bafilomicina A (inibidor específico de v-ATPases) ocorreu uma inibição do crescimento bacteriano. Quando o inibidor foi removido do meio de cultura por 48 horas e adicionado meio sem bafilomicina A, o crescimento da bactéria foi restabelecido. Assim, os dados acima demonstram que o vacúolo ácido é um componente importante para a patogênese da bactéria (Heinzen *et al.*, 1996).

1.5 Infecção da *C. burnetii* em macrófagos

A bactéria *C. burnetii* é um patógeno intracelular obrigatório capaz de infectar diversos tipos celulares *in vitro* e formar VCCs com baixo pH que proporcionam condições favoráveis à sua multiplicação e metabolismo (Hackstadt e Williams, 1981). Alguns tipos celulares estão bem estabelecidos e são amplamente estudados na interação *Coxiella*-hospedeiro como as células Vero (célula epitelial renal de macaco verde africano), BHK-21 (fibroblasto renal de hamster), L-929 (fibroblasto murino), HEL (fibroblasto embrionário de pulmão humano), HeLa (célula epitelial cervical humana) e CHO (fibroblasto de ovário de hamster chinês) (revisado por Voth e Heinzen, 2007). Embora muitos modelos celulares estejam bem estabelecidos na literatura, na infecção natural a bactéria tem tropismo por células do sistema mononuclear-fagocítico, principalmente por macrófagos da via aérea, sendo esta uma das principais vias de transmissão da doença (Fernandes *et al.*, 2016). Conseqüentemente, algumas células primárias e de linhagens macrofágicas têm sido amplamente utilizadas para mimetizar a infecção natural *in vivo*, o que tem colaborado para um avanço nos estudos da patogenidade da bactéria.

Estudo recente mostrou que *C. burnetii* cepa *Nine Mile* fase II foi rapidamente internalizada por macrófagos primários de camundongos C57BL/6 e replicou abundantemente em vacúolos positivos para LAMP-1 ao longo de 6 dias (Cockrell *et al.*, 2017). Fernandes e colaboradores também estudaram a replicação de *C. burnetii* em vacúolos formados pela infecção em macrófagos. Eles observaram que macrófagos alveolares provenientes de camundongos C57BL/6 são altamente permissivos à multiplicação *in vitro* e que essas células suportam a replicação bacteriana durante 12 dias de infecção em cultura, similarmente às células hospedeiras altamente suscetíveis como THP-1 (monócito humano) e Vero (Fernandes *et al.*, 2016). Também observaram que macrófagos alveolares deficientes

em óxido nítrico são mais permissíveis à replicação bacteriana no interior dos VCCs quando comparados com os macrófagos *wild-type*, sugerindo que tais macrófagos teriam importante função no controle da disseminação da doença (Fernandes *et al.*, 2016).

Para avaliar a importância dos largos vacúolos na multiplicação de *C. burnetii* e diferenças na restrição da bactéria dependendo do macrófago utilizado em estudo, Zamboni analisou o aumento bacteriano nos vacúolos provenientes da infecção em macrófagos primários de camundongos BALB/c, A/J e C57BL/6. Ele observou que o número de bactérias viáveis no interior dos vacúolos foi maior em macrófagos BALB/c e A/J quando comparados com os macrófagos de camundongos C57BL/6J de culturas infectadas por 4 a 6 dias (Zamboni, 2004).

Considerando que os estudos da infecção com *C. burnetii* envolvendo macrófagos são extremamente importantes para o entendimento da patogenicidade e propagação da bactéria, estudamos componentes importantes para o desenvolvimento dos vacúolos maduros de *C. burnetii* em macrófagos de linhagem RAW 264.7, depletados para a subunidade d2 da proteína ATPase vacuolar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Examinar se o crescimento volumétrico dos VCCs e a multiplicação intracelular da bactéria *C. burnetii* em macrófagos depende da subunidade d2 da ATPase vacuolar.

2.2 Objetivos específicos

1) Comparar o volume dos vacúolos desenvolvidos pela infecção da *C. burnetii* em macrófagos silenciados e controle para ATP6V0d2;

2) Avaliar a expressão da subunidade d1 e d2 nas células silenciadas para ATP6V0d2 e controle, ativadas ou não por IFN- γ (interferon-gama) e LPS na infecção por *C. burnetii*;

3) Comparar a sobrevivência e multiplicação das bactérias internalizadas pelas células silenciadas para ATP6V0d2 e controle, ativadas ou não por IFN- γ no decorrer da infecção;

4) Avaliar a produção de óxido nítrico em células ativadas ou não por IFN- γ , infectadas ou não com *C. burnetii*;

5) Avaliar a expressão de óxido nítrico sintase 2 e arginase após 48 horas de infecção por *C. burnetii*.

6) Verificar a similaridade estrutural entre os VCCs e VPs de *L. amazonensis*, analisando a interação parasita-célula e parasita-parasita em células ativadas ou não com IFN- γ e LPS, mono ou coinfectedas com *C. burnetii* e *L. amazonensis*;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção de células

3.1.1 Células RAW 264.7

A linhagem de células RAW 264.7 (células macrofágicas, origem de BALB/c e doadas pelo Prof. Michel Rabinovitch, EPM-UNIFESP, São Paulo) foi utilizada em todos os ensaios do projeto. Estas células foram cultivadas na presença de meio RPMI com 10% de soro fetal bovino (meio completo) e 100 µg/ml de penicilina e estreptomicina e mantidas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. A cada 5 dias os macrófagos RAW 264.7 mantidos em garrafas de cultura celular de 75 cm² foram transferidos para outras garrafas de cultura de mesma dimensão, contendo meio completo. Para remoção e passagem, as células foram cultivadas por 20 minutos a 37 °C, 5% CO₂ em solução em PBS (tampão fosfato-salino) suplementado com EDTA (ácido etilenodiamino tetra acético) 1%; em seguida as células foram removidas por jateamento da solução de PBS pré-aquecido, coletadas em tubos de 50 ml, centrifugadas a 300 x g, 10 minutos a 4 °C, ressuspensas em meio completo e contadas em câmara de Neubauer para a utilização nos experimentos. As células RAW 264.7 *knock-down* (silenciadas) para a subunidade d2 e as células não silenciadas (controle) foram mantidas da mesma maneira que as células RAW 264.7 *wildtype* citadas acima, adicionando-se o antibiótico de seleção puromicina (10 µg/ml) na cultura. As células knock-down foram provenientes do trabalho de mestrado da aluna Carina Carraro Pessoa, que utilizou para o silenciamento a técnica de shRNAi (do inglês *RNA interference*), estando as mesmas disponíveis para outros projetos no laboratório (Pessoa *et al.*, 2019).

3.1.2 Células Vero

Células Vero (Instituto Adolfo Lutz – Núcleo de cultura de células) foram cultivadas na presença de meio completo e 100 µg/ml penicilina/estreptomicina/gentamicina (Sigma-Aldrich) e mantidas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. A cada 2 dias, as células Vero mantidas em garrafas de cultura celular de 75 cm² foram desaderidas e mantidas na mesma garrafa. Para a remoção, as células foram lavadas em solução de PBS, incubadas com 1ml de ATV

(solução de tripsina 0,2% e EDTA 0,02% - Instituto Adolfo Lutz – Núcleo de cultura de células) e foram mantidas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 5 minutos. Em seguida as células foram removidas por jateamento de meio completo e contadas em câmara de Neubauer para serem plaqueadas e utilizadas nos experimentos de infecção de *C. burnetii*.

3.2 *Coxiella burnetii*

3.2.1 Cultivo da bactéria

Foram plaqueadas 7×10^5 células Vero em garrafas de cultura de 150 cm² contendo meio RPMI sem antibiótico suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). No dia seguinte foram descongeladas alíquotas contendo 300 µl de *C. burnetii* (cepa Nine Mile fase II, doada pelo Prof. Michel Rabinovitch, EPM-UNIFESP, São Paulo) e sonicadas durante 5 minutos para desagregação das bactérias. Em seguida, as mesmas foram utilizadas para infecção em garrafas contendo células Vero aderidas anteriormente e incubadas a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, as garrafas foram lavadas com PBS 1X para remoção de bactérias não internalizadas e mantidas em meio RPMI sem antibiótico e 5% SFB. Em dias alternados, o meio das garrafas infectadas com *C. burnetii* foi trocado e estas mantidas por 6 dias sem tripsinizar até a observação de numerosos vacúolos largos contendo grande quantidade de bactérias.

3.2.2 Purificação

As garrafas de células Vero contendo vacúolos de *C. burnetii* (mantidas por 6 dias sem tripsinizar) foram lavadas duas vezes com PBS 1X gelado. Em seguida, incubados 10 ml de água purificada pelo sistema – MilliQ – água MilliQ autoclavada gelada por 10 minutos, para a lise hipotônica dos vacúolos de *C. burnetii* e liberação das bactérias. Durante este período foi observado no microscópio se as células foram lisadas e depois foram acrescentados 10ml de RPMI sem SFB e sem antibiótico junto à água MilliQ dentro da garrafa. Então, o conteúdo foi transferido para tubo de 50 ml e centrifugado a 300 x g por 10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo e ultracentrifugado a 40.000 x g por 30 min. Após este período, o sobrenadante foi

desprezado, o *pellet* ressuspendido em 1,8 ml de meio de congelamento (90% SBF e 10% de dimetilsulfóxido - DMSO), e alíquotas de 300 µl em tubos (contendo 10⁹ bactérias/ml) e armazenados -80 °C.

3.3 Análise de vacúolos formados pela infecção de *C. burnetii*

Para análise dos vacúolos formados por *C. burnetii* foram utilizados macrófagos RAW 264.7 silenciados ou não para ATP6V0d2. Uma suspensão de células foi plaqueada em placa de 24 poços contendo lamínulas em meio RPMI completo e incubada *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, uma suspensão de 300 µl contendo 10⁸/ml de bactéria foi adicionada junto às células plaqueadas anteriormente em uma proporção de 20:1 (bactéria:célula) e incubadas a 37°C em estufa de CO₂. Após 24 horas de infecção, as lamínulas contendo células foram lavadas com PBS 1X e fixadas com paraformaldeído (PFA) 4 % nos pontos de 24, 48 e 96 horas pós infecção. Para a contagem dessas células e visualização da bactéria no interior de VCCs, as lamínulas foram incubadas em solução de bloqueio contendo PGN-Saponina (Gelatina 0,25%, NaN₃ 0,1% e saponina 0,1% em PBS 1X) e triton 2,5 % durante 15 minutos e então por mais 30 minutos na presença de 10 µM de cloridrato de 4',6-diamindino-2- fenilindol (DAPI) para marcação do material genético celular e bacteriano. Após esse período, as lamínulas foram lavadas em PBS 1X, montadas em glicerol tamponado com Tris 0,1M pH 8.6 e *p*-fenilenodiamina 0,1 % e examinadas em microscópio direto de epifluorescência (Olympus BX5).

3.4 Quantificação das subunidades d1 e d2 via Reação em cadeia da polimerase (PCR) Real Time quantitativa

Para avaliar a expressão das subunidades d1 e d2, 2,5x10⁵ das células em estudo foram ativadas ou não por IFN-γ e LPS e infectadas por *C. burnetii* ou não e então ressuspendidas em 1ml de reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA) segundo recomendações do fabricante. O RNA extraído foi ressuspendido em água MilliQ livre de RNase I e a dosagem realizada por NanoDrop ND-1000 UV-Vis. A integridade das amostras foi avaliada pela razão ou *score* 260/280 obtida pelo aparelho em unidades

arbitrárias. Amostras cujo *score* estava abaixo do limite de 1,8 foram descartadas; amostras com *score* entre 1,8 e 2 foram utilizadas e ajustadas para a concentração de 100 ng/μL. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit High Capacity cDNA *Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram conservadas a -20°C até o uso. Para a detecção da v-ATPase (subunidade ATP6V0d2) utilizamos iniciadores (*primers*) de amplificação específicos construídos a partir do GenBank (número de acesso: NM_175406), *Forward* 5'- TGT GTC CCA TTC TTG AGT TTG AGG -3' e *Reverse* 5'- AGG GTC TCC CTG TCT TCT TTG CTT -3' do RNA mensageiro de camundongos para a proteína em questão. Para a detecção da subunidade d1 de v-ATPase foram utilizados os iniciadores que foram construídos a partir do GenBank (número de acesso: NM_0134773), *Reverse*: 5'-GTC GTT CTT CCC GGA GCT CTA TTT-3' *Forward*: 5'-ATTGGCCAGGAAGTTGCCATAAT-3'. Os iniciadores do gene constitutivo da β-actina (iniciador controle) foram construídos a partir do GenBank (número de acesso: NM_00739), *Forward* 5` GCC TTC CTT CTT GGG TAT GGA ATC 3´ e *Reverse* 5´ ACG GAT GTC AAC GTC ACA CTT CAT 3´. Para a reação de PCR foi utilizado 1μL de cDNA adicionado com 12,5 μL do reagente SYBR® Green (Applied Biosystems, EUA), 1μL de cada primer a 5,0 pM e 9,5 μL de água purificada pelo sistema MilliQ e autoclavada. A quantificação relativa da expressão do RNA mensageiro (RNAm) foi avaliada comparando o Threshold cycle (Ct) do gene alvo (ATP6V0d1 ou ATP6V0d2) com o gene constitutivo β-actina (Pfaffl 2001). Essa etapa do trabalho foi feita em colaboração com o Laboratório da Profa. Hiro Goto, o IMT-USP-SP com o auxílio da Dra. Luiza de Campos Reis.

3.5 Determinação da carga bacteriana

3.5.1 Extração de DNA de *C. burnetii*

10⁵ células não silenciadas e silenciadas para ATP6V0d2 foram plaqueadas em meio RPMI sem antibiótico + 5% de SFB em placas de 24 poços para os pontos de 24 e 48 horas e 4x10⁴ células para o ponto de 120 horas. Após 24 horas, as células foram ativadas ou não com IFN-γ, e no dia seguinte infectadas com *C. burnetii* na proporção de 20 bactérias por célula. Após 24 horas de infecção, os poços foram lavados 4 vezes com PBS 1X para a retirada das bactérias do sobrenadante. Para a lise celular, foi adicionado 0,5mL de água MilliQ autoclavada por poço, transferido para

microtubo juntamente com 0,5mL de meio RPMI sem SFB e centrifugado a 21.000 x g por 30 minutos para a obtenção do *pellet* contendo as bactérias. O DNA foi então extraído com o kit DNeasy® Blood & Tissue Kit da QUIAGEN seguindo as recomendações do fabricante. O DNA extraído foi ressuspenso em água MilliQ livre de RNase I e estocado em -20°C.

3.5.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) Real Time quantitativa

A determinação da carga bacteriana em células RAW 264.7 infectadas com *Coxiella burnetii* foi realizada pela técnica de PCR em tempo real quantitativo (qPCR *real time*) com base em curva padrão utilizando quantidades conhecidas de cópias da bactéria.

A curva padrão para a determinação da carga bacteriana de *C. burnetii* foi realizada por meio de diluições seriadas na razão de 1:10, partindo-se de 10^7 bactérias até 10 bactérias. O DNA extraído conforme supra descrito foi quantificado via NanoDrop ND-1000 UV-Vis e a integridade das amostras foi avaliada pela razão ou *score* 260/280 obtida pelo aparelho em unidades arbitrárias. A partir da concentração por ng/ μ l foi determinado o número de cópias da bactéria pelo programa <http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realttime-pcr>.

A PCR em tempo real foi realizada usando EvaGreen (Fermentas) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à amplificação do DNA em termociclador (Applied Biosystem StepOne Plus Real Time PCR System) aos seguintes ciclos: 95°C por 15 minutos; 95°C por 15 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, submetidos a 40 ciclos. Os primers utilizados foram: *Forward* 5' - GCGCAATACGCTCAATCACA – 3' e *Reverse* 5' - CCATGGCCCCAATTCTCTT – 3'. Essa etapa do trabalho também foi realizada em colaboração com o Laboratório da Profa. Hiro Goto, o IMT-USP-SP com o auxílio da Dra. Luiza de Campos Reis.

3.6. Avaliação da produção de óxido nítrico

Para avaliar a produção de NO, 10^5 das células em estudo foram plaqueadas em placas de 24 poços em meio RPMI completo e incubadas a 37°C em estufa de CO₂. Em seguida, foram ativadas ou não com LPS (1 μ g/mL) + IFN- γ (20 ng/mL), e após 24 horas infectadas ou não com *C. burnetii* na proporção de 20:1

(bactéria:célula). Após 24 horas de infecção, os poços foram lavados com PBS 1X para a retirada do excesso de bactérias. No dia seguinte, os sobrenadantes foram retirados para a dosagem de NO, e as células foram então incubadas com tampão de lise (Tris-HCl pH 7.4 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%) contendo coquetel de inibidor de proteases (Halt Protease Inhibitor Cocktail 100X) por 30 minutos a 4°C, centrifugadas em rotação máxima por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante utilizado para a dosagem de proteínas.

3.6.1. Dosagem de NO

A dosagem de NO foi realizada em placa de 96 poços, contendo a curva padrão de NaNO₂ nas concentrações: 125 - 62,5 - 31,25 - 15,6, - 7,8 - 3,9 e 1,95µM. Foi adicionado na placa o sobrenadante proveniente da cultura de células, em triplicata, e em seguida o reagente de Griess (proporção de 1:1). A leitura foi realizada no leitor de Elisa Labsystems Multiskan MS no comprimento de onda de 540nm.

3.6.2. Dosagem de proteína

A dosagem de proteínas foi também realizada em placa de 96 poços, contendo curva padrão de BSA contendo as concentrações: 800, 400, 200, 100, 50, 25 e 12,5µg/mL e branco. O lisado foi diluído na proporção 1:10 e plaqueados em triplicata. Foi adicionado então o reagente de Bradford diluído na proporção 1:5 e a leitura realizada no leitor de Elisa Labsystems Multiskan MS no comprimento de onda de 620nm.

3.7. Quantificação de arginase e NO sintase 2 (NOS2)

2,5x10⁵ macrófagos foram ativados ou não por IFN-γ e LPS e/ou infectados ou não por *C. burnetii* e após 48 horas de infecção ressuspendidos em 1ml de reagente TRIZOL (Invitrogen, EUA) segundo recomendações do fabricante. O RNA extraído foi ressuspendido em água MilliQ- livre de RNase I e a dosagem realizada por NanoDrop ND-1000 UV-Vis. A integridade das amostras foi avaliada pela razão ou *score* 260/280 obtida pelo aparelho em unidades arbitrárias. Amostras cujo *score* estava abaixo do limite de 1,8 foram descartadas; amostras com *score* entre 1,8 e 2 foram utilizadas e ajustadas para a concentração de 100 ng/µL. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit High Capacity cDNA *Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems) de acordo com o protocolo do fabricante. As amostras foram conservadas a -20°C até o uso.

A PCR em tempo real foi realizada usando EvaGreen® de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram submetidas à amplificação do DNA em termociclador (Applied Biosystem StepOne Plus Real Time PCR System) e os primers utilizados foram: Arginase 1 (número de acesso NM_007482.3) Forward: 5'-AGC ACT GAG GAA AGC TGG TC- 3' e Reverse: 5'-CAG ACC GTG GGT TCT TCA CA-3'; NOS2 (número de acesso: NM_010927.4) Forward: 5'- AGA GCC ACA GTC CTC TTT GC- 3' e Reverse: 5'- GCT CCT CTT CCA AGG TGC TT- 3'.

3.8. Coinfecção

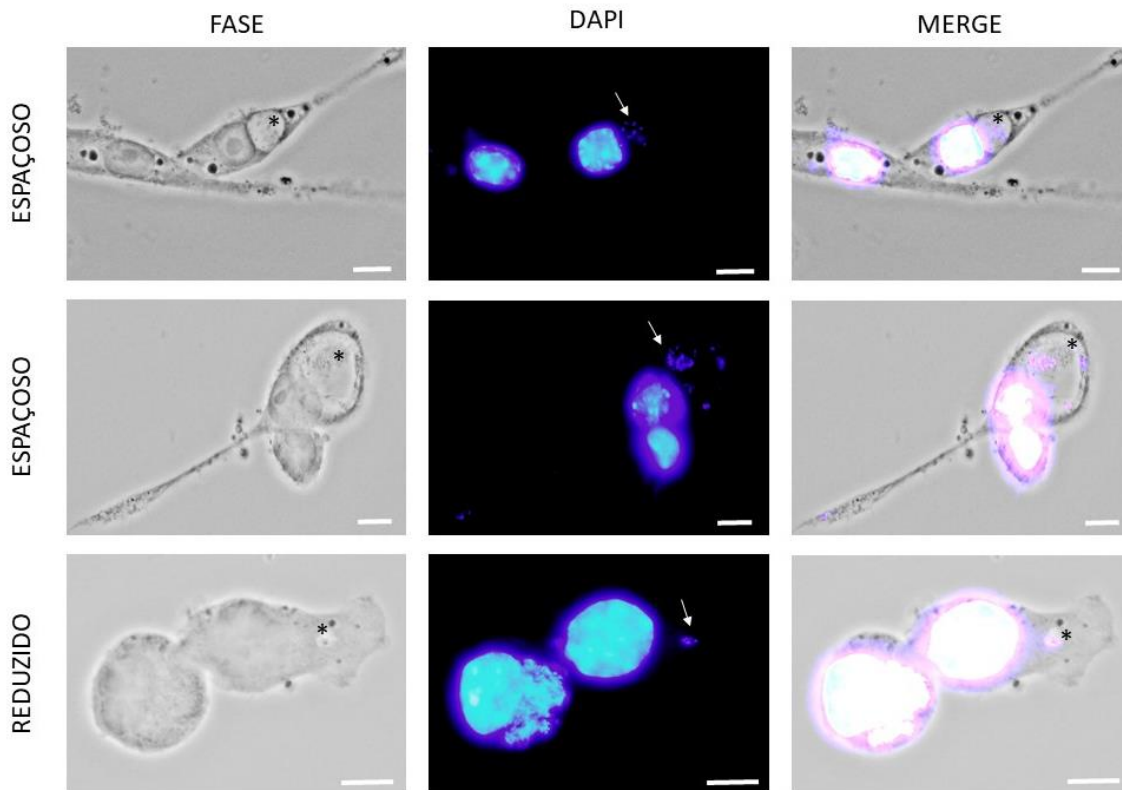
Foram plaqueadas, em placas de 24 poços contendo lamínulas em meio RPMI sem antibiótico, 5×10^4 e $2,5 \times 10^4$ células para avaliar a infecção em tempos iniciais e tardios respectivamente. As células foram ativadas ou não com LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$) + IFN- γ ($20 \text{ ng}/\text{mL}$) e no dia seguinte infectadas ou não com *C. burnetii mCherry* na proporção de 20:1 (bactéria:célula). 24 horas depois, as lamínulas foram lavadas com PBS 1X. Após 48 horas de infecção, foi adicionada, ou não, *L. amazonensis* na proporção 20:1 (parasita:célula). Após 6 horas da infecção com *L. amazonensis* as lamínulas foram lavadas com PBS 1X. No dia seguinte, as lamínulas contendo 5×10^4 células foram lavadas e fixadas com PFA 4 %. O mesmo foi realizado com as lamínulas contendo $2,5 \times 10^4$ células após 72 e 144 horas de infecção com *C. burnetii*. Para a contagem dessas células e visualização da bactéria e protozoário no interior dos vacúolos, as lamínulas foram incubadas em solução de bloqueio contendo PGN Saponina (Gelatina 0,25%, NaN3 0,1% e saponina 0,1% em PBS 1X) e Triton X-100 2,5% durante 15 minutos e então por mais 30 minutos na presença de $10 \mu\text{M}$ de cloridrato de DAPI para marcação de material genético celular, bacteriano e do parasita. Após esse período, as lamínulas foram lavadas em PBS 1X, montadas em glicerol tamponado com Tris 0,1 M pH 8.6 e p-fenilenodiamina 0,1 % e examinadas em microscópio direto de epifluorescência (Olympus BX5).

4 RESULTADOS

4.1 A infecção intracelular pela bactéria *C. burnetii* em macrófagos não silenciados e ATP6V0d2-kd mostraram aumento volumétrico dos VCCs de forma d2-independente

Pessoa e colaboradores demonstraram que a expansão volumétrica dos vacúolos parasitóforos de *L. amazonensis* é dependente de ATP6V0d2 (Pessoa *et al.*, 2019). Para avaliar se a isoforma d2 possui papel semelhante no crescimento dos VCCs, realizamos experimentos utilizando células não silenciadas (NS) e silenciadas para a subunidade d2 (ATP6v0D2-kd), ambas infectadas com *C. burnetii*. Os pontos de 24, 48 e 96 horas após infecção foram fixados, corados com DAPI e observados ao microscópio de fluorescência. Realizamos então uma contagem de 100 células por campo, quantificando as células não infectadas e infectadas. Os vacúolos foram classificados em espaçosos ou reduzidos, levando em consideração o tamanho relativo ao núcleo. Maiores ou iguais ao núcleo foram classificados como espaçosos, e os menores como reduzidos (Figura 3).

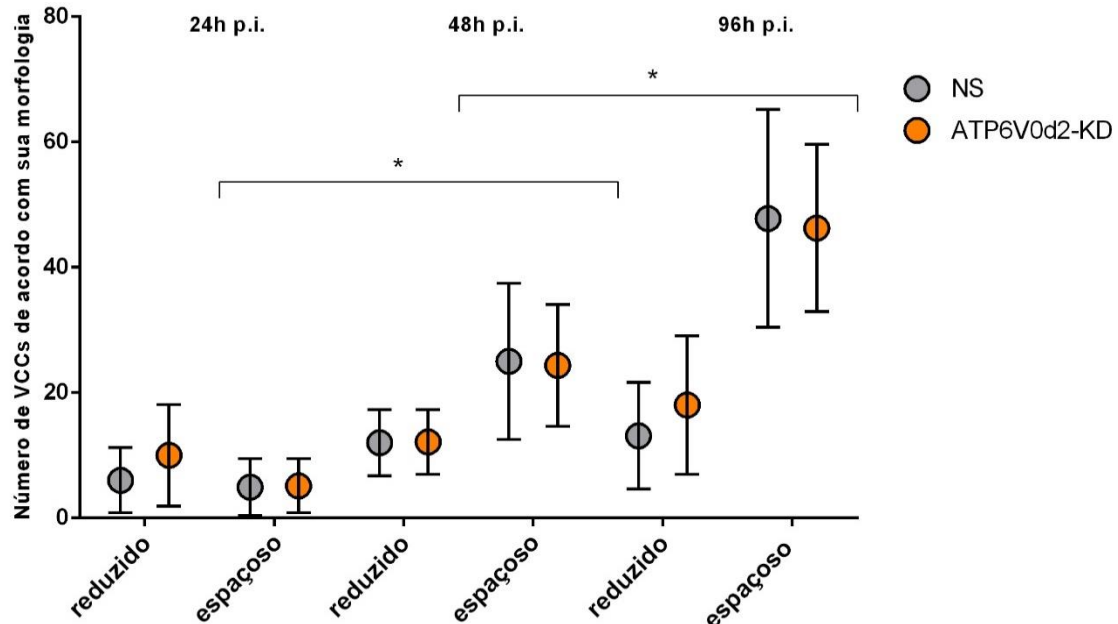
Figura 3 - Imagem demonstrativa do tamanho dos VCCs classificados como espaçosos ou reduzidos.



Células RAW 264.7 foram plaqueadas e infectadas com *C. burnetti*, fixadas e analisadas em microscópio de fluorescência direta. Os painéis superior e central apresentam células com VCCs espaçosos, enquanto o inferior apresenta célula com VCC reduzido. O material genético, tanto das células quanto das bactérias, estão marcados com DAPI (azul) e as setas indicam presença da bactéria no interior dos VCCs. As imagens merge são formadas pela sobreposição das imagens da fase com o DAPI e mostram as bactérias no interior dos vacúolos. Barra: 10 μ m.

A análise dos dados obtidos mostrou que nos três pontos de tempo não houve diferença significativa no número de VCCs de acordo com sua morfologia entre as células silenciadas e controle. No período de 24 horas pós infecção (p.i.), observamos nos dois grupos de células, em média 10 vacúolos reduzidos e 5 espaçosos a cada 100 células contadas. No ponto de 48h p.i., os reduzidos aumentam para aproximadamente 15 e os espaçosos para 30, enquanto que na infecção tardia (96h p.i.) há aproximadamente 20 reduzidos e o número de vacúolos espaçosos aumenta para 50. A análise estatística demonstrou diferença significativa no número de VCCs espaçosos entre os pontos de 24 e 48h p.i. e entre os pontos de 48 e 96h p.i., demonstrando que há o crescimento dos VCCs formados ao decorrer da infecção (Figura 4).

Figura 4 - Não houve diferença no tamanho dos VCCs ao decorrer da infecção.

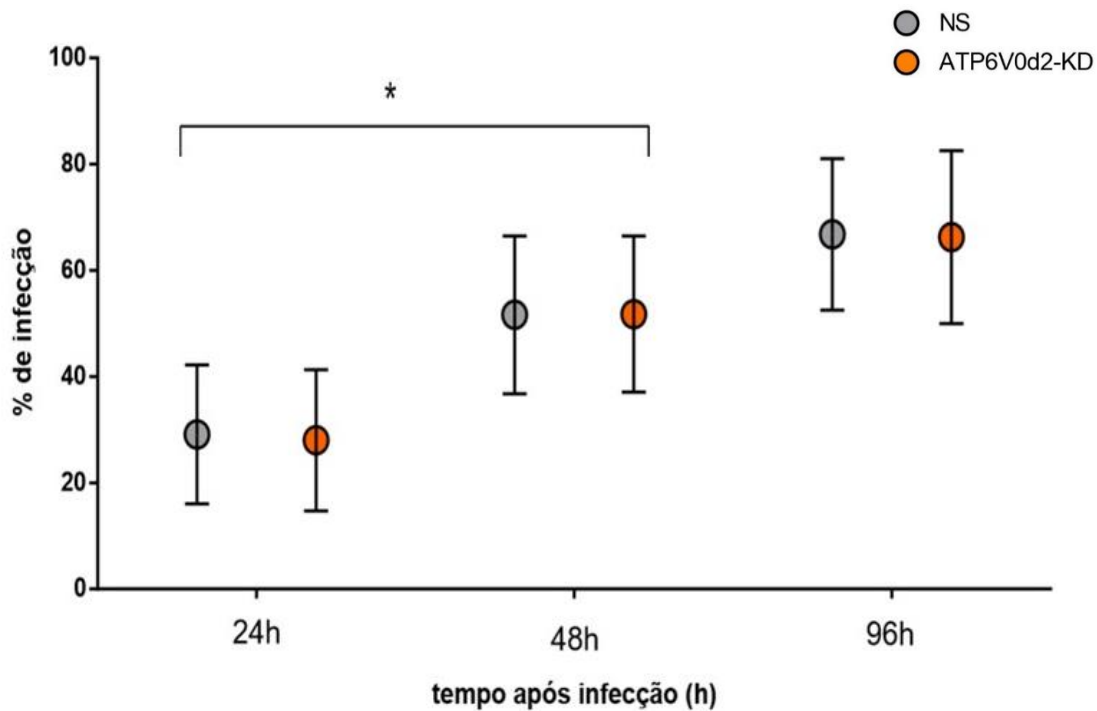


Células RAW 264.7 não silenciadas (NS, em cinza) e silenciadas para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) foram plaqueadas, infectadas com *C. burnetii*, fixadas nos pontos de 24, 48 e 96 horas após a infecção, coradas com DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência. Durante a análise, os VCCs maiores que o núcleo foram classificados como espaçosos e os menores como reduzidos. A quantidade de vacúolos espaçosos aumentou com o passar do tempo, entretanto sem diferença significativa entre células NS e ATP6V0d2-kd, sugerindo que a subunidade d2 não está diretamente relacionada com a formação e crescimento dos VCCs. Foram contadas 100 células/lamínula em triplicata de três experimentos. - ANOVA, * $p < 0.0001$

4.2 A porcentagem de infecção não se altera entre as células controle e ATP6V0d2-KD

Além da classificação dos vacúolos espaçosos ou reduzidos, o mesmo experimento nos permitiu determinar a porcentagem de infecção. Foram contadas 100 células por lamínula, sendo separadas em infectadas e não infectadas. Mais uma vez sem diferença significativa entre as células Não silenciadas e silenciadas para a subunidade d2, no ponto de 24 horas a infecção estava em torno de 30%, aumentando significativamente por cerca de 55% no ponto de 48 horas. Não foi observado aumento estatisticamente significativo na infecção de 96 horas em ambas as populações celulares (Figura 5).

Figura 5 - A porcentagem de infecção não se altera ao longo do tempo entre células NS e ATP6V0d2-kd.



Células não silenciadas (NS, em cinza) e células silenciadas para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) foram plaqueadas em placa de 24 poços, infectadas com *C. burnetii*, fixadas nos pontos de 24, 48 e 96 horas pós infecção, marcadas com DAPI e observadas em microscópio de fluorescência, onde foram contadas 100 células por lamínula. Ao longo do tempo, a taxa de infecção aumentou, como esperado, entretanto não houve diferença significativa entre ATP6V0d2-kd e NS, sugerindo que a subunidade d2 não está relacionada com a internalização das bactérias em estudo. Foram realizados três experimentos em triplicata. - ANOVA, * $p < 0.0001$

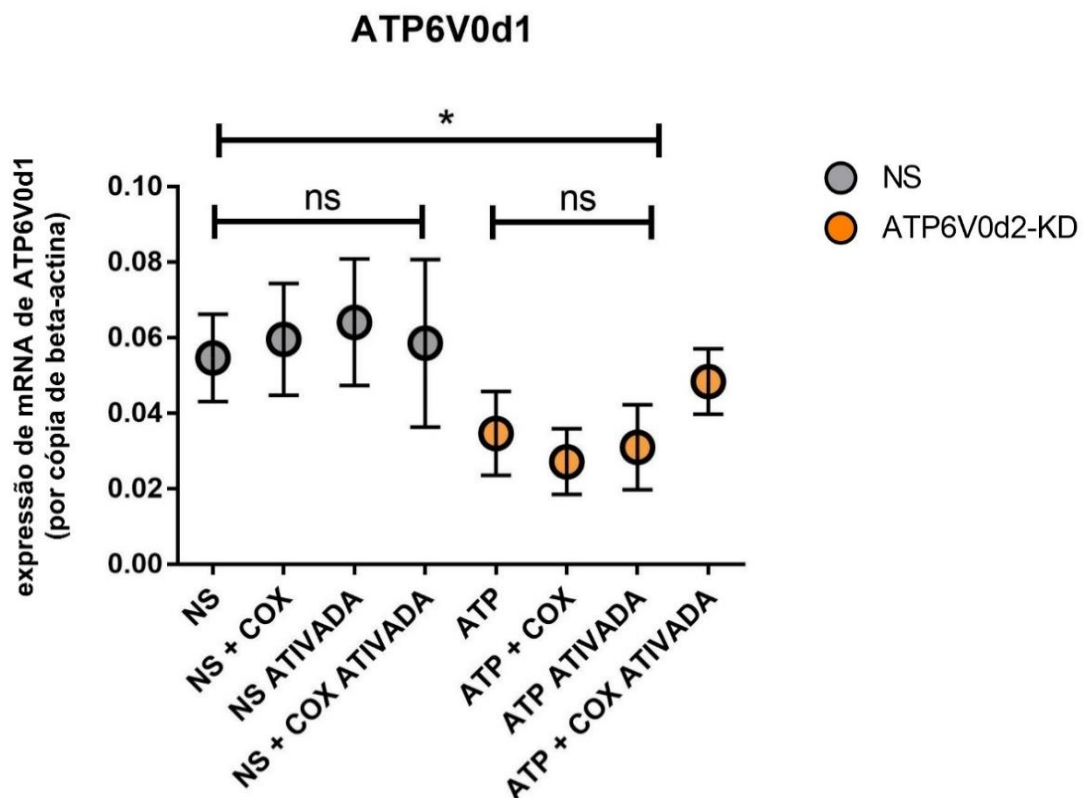
4.3 Não há superexpressão da subunidade d1 nas células ATP6V0d2-kd independente da infecção por *C. burnetii*

A fim de observar se a infecção com *C. burnetii* pode interferir na expressão das subunidades em estudo, analisamos a expressão dos transcritos de mRNA das subunidades d1 e d2 em células NS e ATP6V0d2-kd, ativadas com IFN- γ + LPS ou não, infectadas com *C. burnetii* ou não, após 48 horas de infecção.

Os resultados obtidos pela reação de qPCR *real time* da subunidade ATP6V0d1 mostram que as células controle não apresentaram diferença significativa na expressão de transcritos mRNA desta subunidade, independentemente da infecção e/ou ativação. O mesmo foi observado nas células silenciadas para a subunidade ATP6V0d2, entretanto houve diferença entre os grupos de NS e ATP6V0d2-kd sendo

maior a expressão nas células não silenciadas. Estes resultados mostram que o silenciamento da subunidade d2 não induz aumento na expressão da subunidade d1 (Figura 6).

Figura 6 - Não houve superexpressão da subunidade d1 durante a infecção com *C. burnetii*.



Células RAW 264.7 não silenciadas (NS, em cinza) e silenciadas para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) foram plaqueadas em placa de 24 poços, ativadas com IFN- γ + LPS ou não, posteriormente infectadas com *C. burnetii*, ou não. Após 48 horas de infecção foi adicionado Trizol® e então extraído o RNA para a PCR quantitativa. Os dados obtidos não mostram diferenças na expressão de d1 durante a infecção, sugerindo que a bactéria não modula a expressão desta subunidade. Além disso, em macrófagos silenciados houve diminuição da expressão, portanto não parece haver mecanismo de compensação relacionado ao aumento de d1 na ausência de d2. Foram analisados quatro experimentos em triplicata. ANOVA, * $p < 0.0001$.

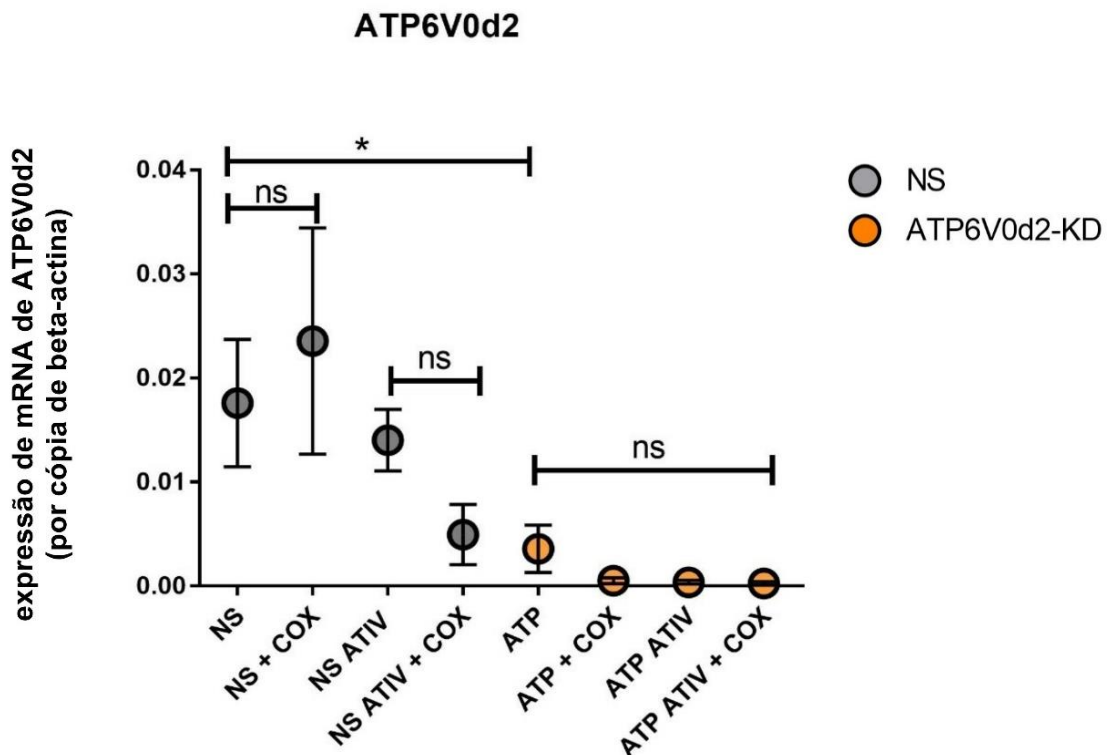
4.4 A presença da bactéria não induz aumento da expressão de d2

Assim como para a subunidade d1, realizamos o experimento de PCR quantitativa para determinar a expressão da subunidade d2. Comprovando principalmente que o silenciamento das células ATP6V0d2-kd foi eficiente, uma vez

que a expressão dos transcritos de mRNA da subunidade d2 por cópia de β -actina foi próxima a zero em todos os grupos das células silenciadas (Figura 7).

Em relação às células não silenciadas, houve diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos NS ativadas vs NS não ativadas. As células NS infectadas não apresentaram aumento significativo na expressão da subunidade d2 em relação as células NS não infectadas. O mesmo ocorreu entre os grupos de células NS ativadas infectadas e ativadas não infectadas, mostrando que a presença da bactéria não induz aumento da expressão da subunidade d2.

Figura 7 - *C. burnetii* não induz expressão da subunidade d2.

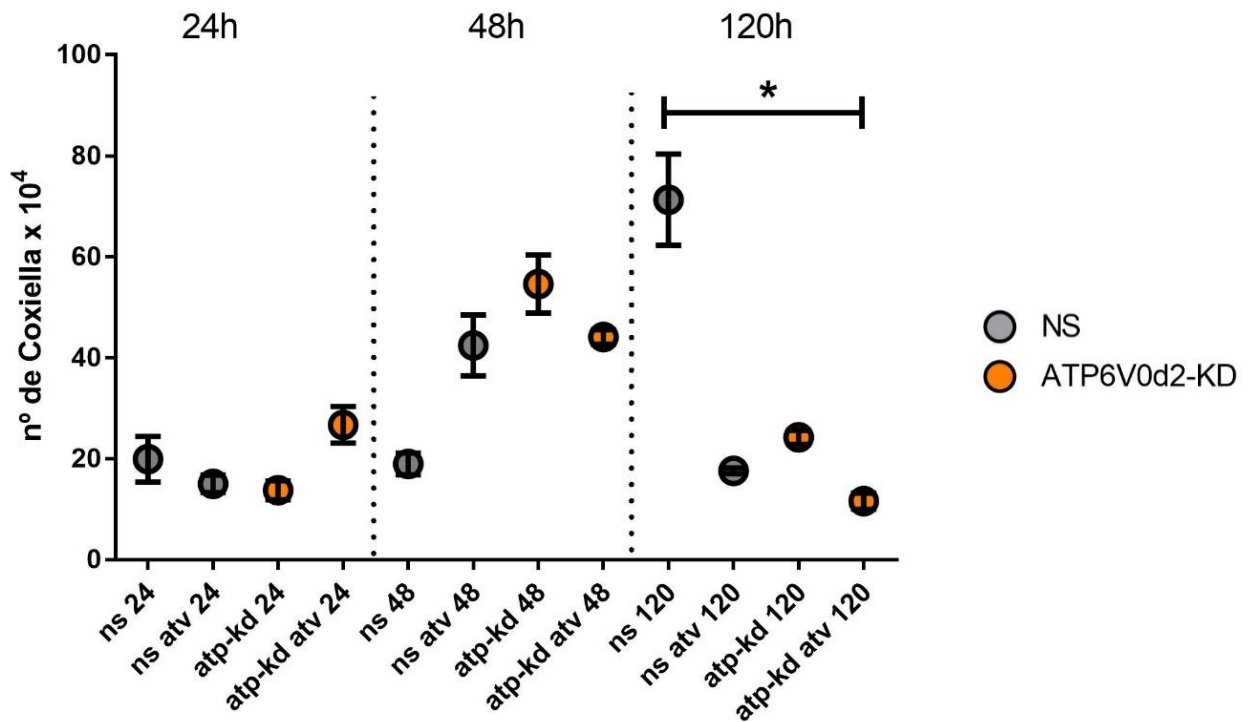


Células RAW 264.7 não silenciadas (NS, em cinza) e silenciadas para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) foram plaqueadas em placa de 24 poços, ativadas com IFN- γ + LPS ou não, posteriormente infectadas com *C. burnetii*, ou não. Após 48 horas de infecção foi adicionado Trizol® e então extraído o RNA para a PCR quantitativa. Os dados obtidos confirmam o silenciamento da subunidade d2 nas células ATP6V0d2-kd, além de demonstrarem que a presença da bactéria não induz o aumento da expressão desta subunidade. Foram analisados quatro experimentos em triplicata. ANOVA, * $p < 0.0001$.

4.5 Há redução da multiplicação da bactéria em tempos tardios de infecção em células ATP6V0d2-kd

Realizamos experimentos de qPCR *real time* para verificar se a ATP6V0d2, apesar de não interferir na biogênese dos VCCs, poderia afetar o processo de multiplicação bacteriana no interior dos macrófagos. Os resultados obtidos mostraram que após 24 horas de infecção, a carga bacteriana nos grupos estudados é semelhante, independente do silenciamento ou ativação com IFN- γ . No ponto de 48 horas há um aumento na quantidade de bactérias, provavelmente devido à sua multiplicação no interior dos VCCs formados. Interessantemente, no ponto de 120 horas, que caracteriza uma infecção tardia, houve uma queda na carga de *C. burnetii* em todos os grupos estudados, exceto nas células sem ativação, que tiveram um aumento notável na quantidade de bactérias (Figura 8). Acreditamos que tanto a ativação por tempo prolongado quanto a ausência da subunidade d2 tornem os macrófagos mais inflamatórios, culminando na não sustentação da infecção.

Figura 8 - A manutenção da infecção em tempos tardios foi prejudicada em células ATP6V0d2-kd.

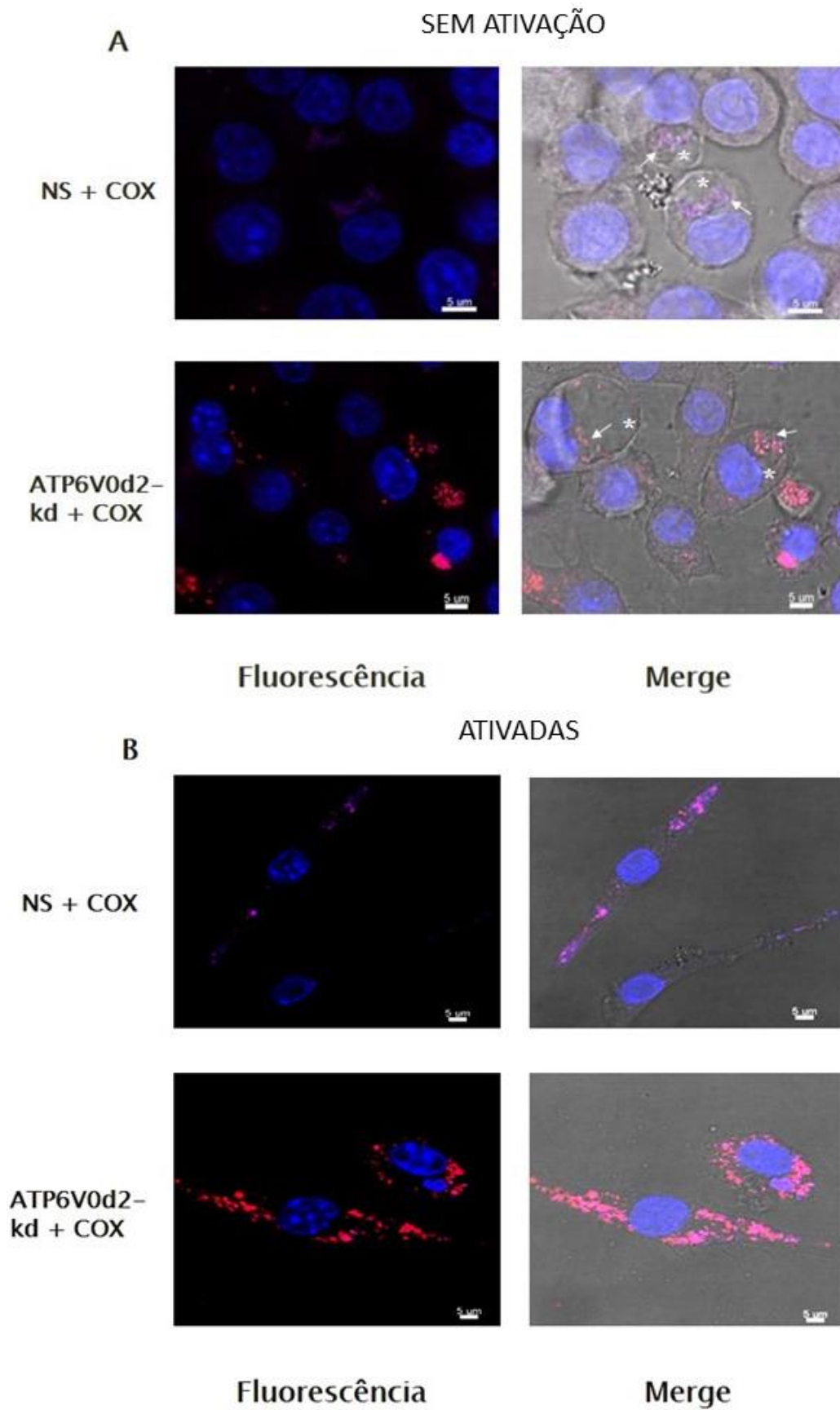


Macrófagos RAW 264.7 não silenciados (NS, em cinza) e silenciados para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) fora plaqueados em placa de 24 poços, após 24 horas ativados ou não com IFN- γ e no dia seguinte infectados com *C. burnetii*. Após 24, 48 e 120 horas de infecção, foi realizada a extração e armazenamento do DNA para a PCR quantitativa. Os resultados obtidos mostraram que a ATP6V0d2-kd parece interferir na capacidade dos macrófagos de controle da infecção em tempos tardios. Foram analisados três experimentos em triplicata. ANOVA, * $p < 0.0001$.

4.6 Não há diferença na produção de NO entre as células NS e ATP6V0d2-KD

Ao decorrer de nossos experimentos, observamos a não formação de VCCs espaçosos em células infectadas previamente ativadas com IFN- γ + LPS (Figura 8). Dados da literatura relacionaram este fato com o aumento da produção de óxido nítrico (NO) (Howe *et al.*, 2002). Desta forma, avaliamos a produção de NO por dosagem com reagente de Griess, em células ativadas ou não, infectadas ou não no período de 48 horas pós infecção, utilizando como normalizador a dosagem de proteínas.

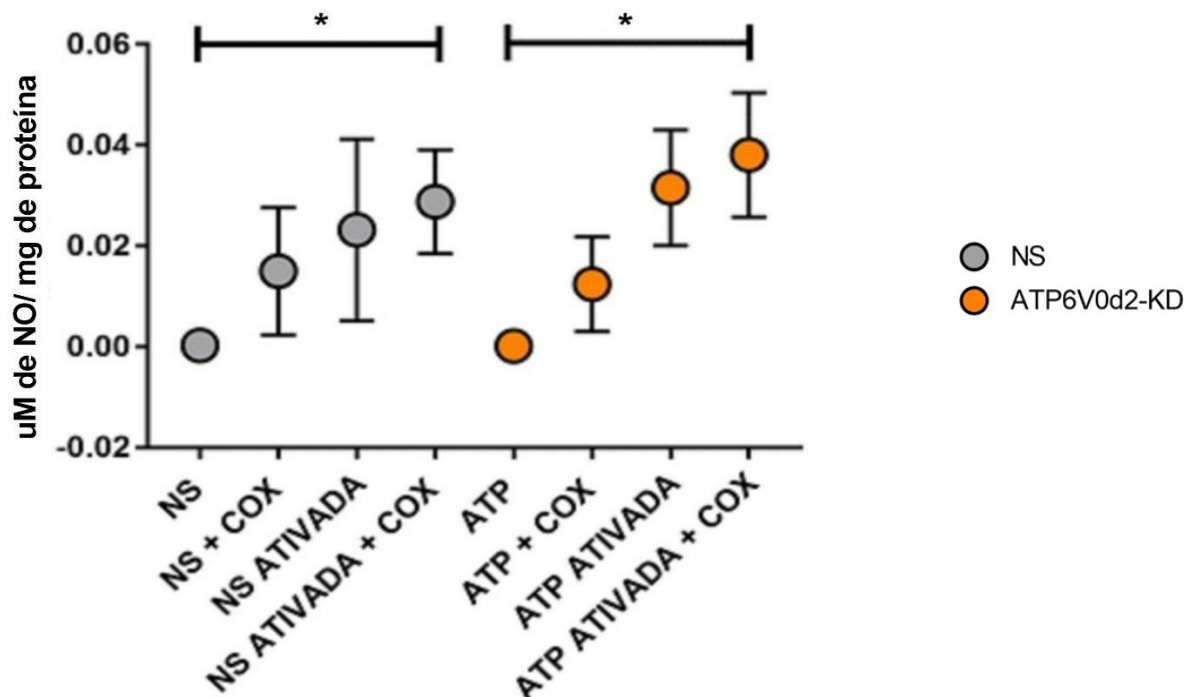
Figura 9 - Macrófagos ativado e infectados não apresentam formação de VCCs.



Células NS e ATP6V0d2-kd foram plaqueadas em lamínulas, em seguida ativadas ou não, e posteriormente infectadas com *C. burnetii m. Cherry*. Após 48 horas de infecção, as lamínulas foram fixadas e marcadas com DAPI e então observadas em microscopia confocal. Os núcleos celulares estão marcados com DAPI (em azul), as bactérias aparecem em vermelho (mCherry), os asteriscos indicam os vacúolos e as setas apontam a presença das bactérias no interior do VCC. As imagens merge são formadas pela sobreposição das imagens da fase com o DAPI e mostram as bactérias no interior dos vacúolos. **A.** O painel superior e o inferior mostram células NS (superior) e ATP6V0d2-kd (inferior), respectivamente, não ativadas com a formação de vacúolos largos contendo *C. burnetii*. **B.** Os painéis mostram células NS (superior) e ATP6V0d2-kd (inferior) ativadas com a presença de grande quantidade de bactérias, porém sem a formação de vacúolos. Barra: 5µm.

Os dados obtidos mostraram que não há diferença na produção de NO entre as células ATP6V0d2-kd e NS. Porém observamos que, quando não infectadas, ambas produzem uma quantidade mínima de óxido nítrico, que aumenta para em torno de 0,02 µM quando infectada com a bactéria. A ativação induz ainda mais a produção, ficando em torno de 0,035 µM, chegando a 0,04 µM nas células infectadas previamente ativadas com IFN-γ + LPS (Figura 10).

Figura 10 - Aumento na produção de NO em células infectadas e ativadas.



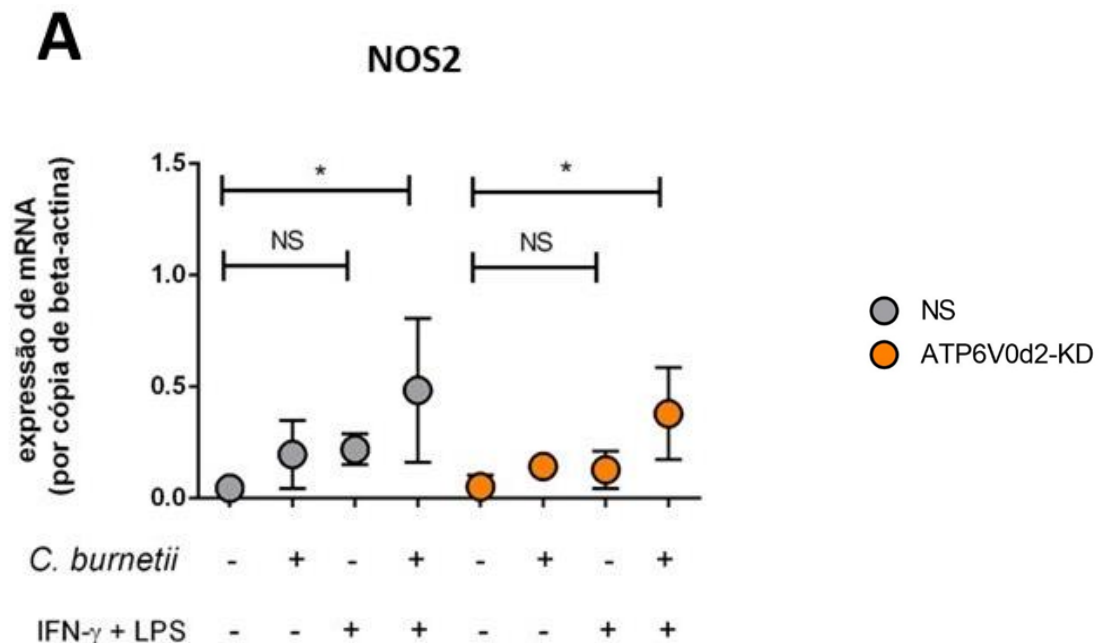
Foram plaqueadas células RAW 264.7 em placa de 24 poços em meio RPMI, que foram ou não ativadas e/ou infectadas com *C. burnetii*. O sobrenadante foi coletado após 48 horas de infecção e submetido a reação com reagente de Griess para a dosagem de NO. Foi realizada uma relação utilizando a dosagem de proteínas como normalizador. Os dados obtidos não mostram diferença entre ATP6V0d2-kd (em laranja) e NS (em cinza), porém observamos aumento na produção quando infectadas, ativadas e aumento considerável quando infectadas e ativadas, podendo justificar a não observação de vacúolos nas mesmas. ANOVA, * $p < 0,0001$

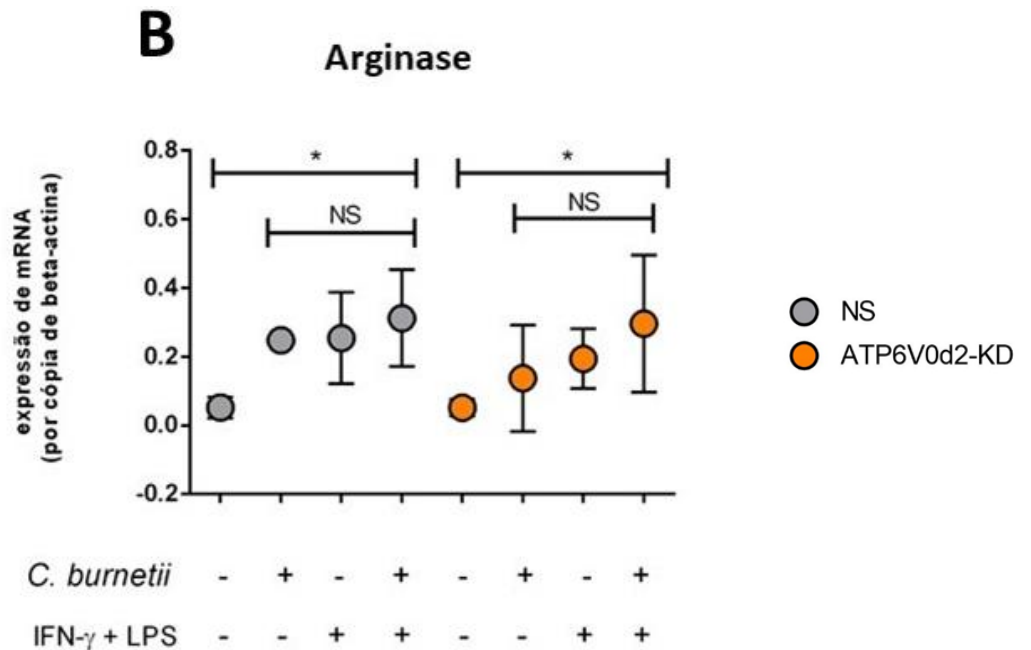
4.7 Aumento da expressão NOS2 e arginase em células infectadas e/ou ativadas

A NO sintase 2 (NOS2) produz grandes quantidades de NO, que exerce efeitos antimicrobianos e antitumorais. Esta enzima pode ser regulada por mais de 30 citocinas sendo elas inibitórias, como o Fator de Crescimento Transformador-beta (TGF- β), ou ativantes como IFN- γ (Macmicking *et al.*, 1997). Além disso, substâncias como LPS induzem sua superexpressão em macrófagos, tendo sinergia com IFN- γ , dependendo da concentração encontrada (Gao *et al.*, 1998).

Tendo em vista os fatos acima apresentados e nossos resultados referentes ao aumento da produção de óxido nítrico em macrófagos infectados por *C. burnetii* e ativados com IFN- γ +LPS, realizamos experimentos para determinar a expressão de transcritos de mRNA da isoforma indutível de óxido nítrico sintase (NOS2) e da arginase, uma enzima liberada durante a inflamação e capaz de regular negativamente a síntese de NO em macrófagos infectados (Gaur *et al.*, 2007).

Figura 11 - Em células controle e *knock down* a presença da bactéria aumenta a expressão de arginase e em células previamente ativadas induz maior expressão de NOS2.





Células RAW 264.7 não silenciadas (NS, em cinza) e silenciadas para a subunidade d2 (ATP6V0d2-kd, em laranja) foram plaqueadas em placa de 24 poços, ativadas com IFN- γ + LPS ou não, posteriormente infectadas com *C. burnetii*, ou não. Após 48 horas de infecção foi adicionado Trizol® e então extraído o RNA para a PCR quantitativa. Os dados obtidos sugerem que a bactéria, assim como a ativação, induz a expressão de arginase tanto em células controle quanto em *knock down* (A). Além disso, células infectadas previamente ativadas com IFN- γ + LPS apresentaram aumento na expressão de NOS2, independente do silenciamento de ATP6V0d2 (B). ANOVA, * $p < 0.0001$.

Os dados obtidos mostram, de forma similar entre as células controle e *knock down*, aumento significativo na expressão de transcritos de mRNA de NOS2 em células infectadas previamente ativadas com INF- γ + LPS, sugerindo um ambiente altamente inflamatório (Figura 11A). Em relação a arginase, a expressão foi menor apenas nas células controle, indicando que a presença da bactéria, assim como a ativação, induz aumento de sua expressão como mecanismo contra o ambiente inflamatório (Figura 11B).

4.8 Não há diferença na porcentagem de infecção e coinfeção nas células silenciadas e controle

Há grande similaridade morfológica e funcional entre os vacúolos formados pela infecção de *C. burnetii* e *L. amazonensis* em macrófagos, entretanto nossos resultados sugerem divergência na participação da subunidade d2 na biogênese e crescimento dos mesmos. Levando em consideração que *L. amazonensis* pode co-habitar no VCCs e uma vez em seu interior, é capaz de sobreviver, se diferenciar e

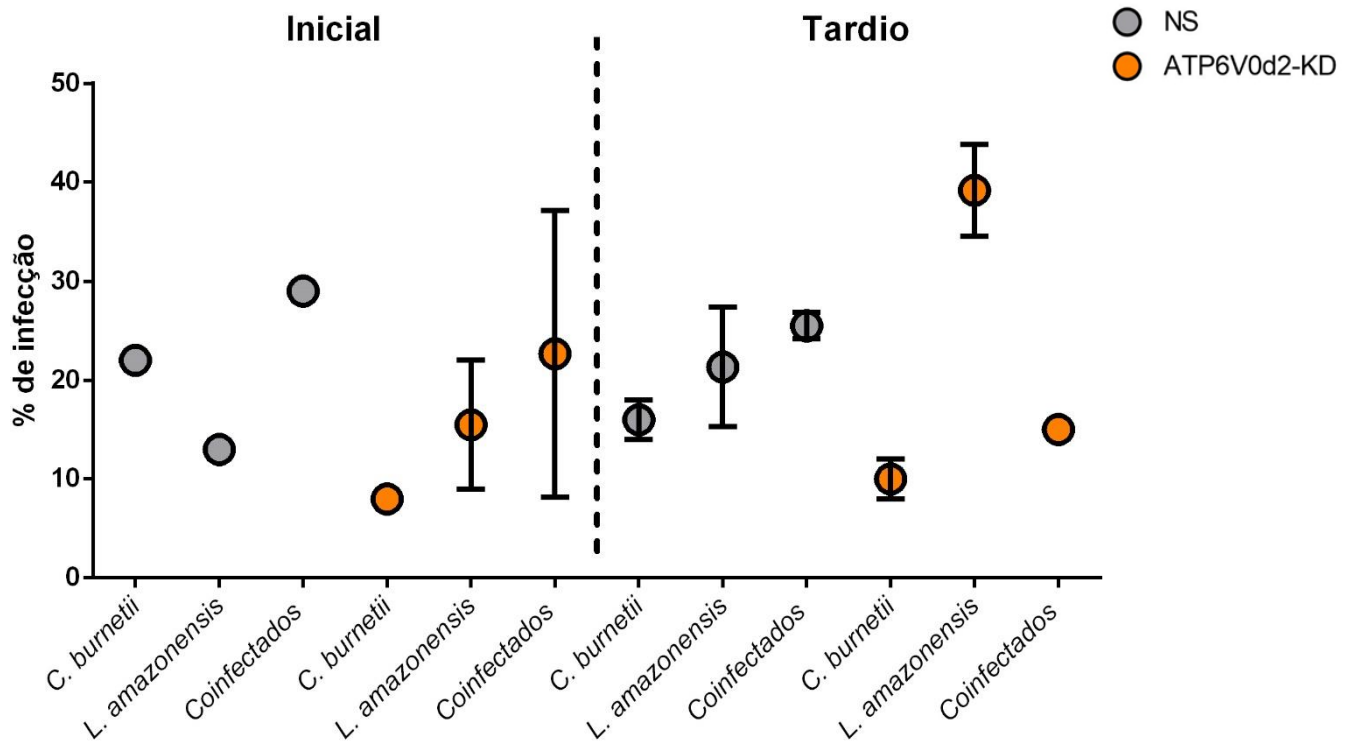
replicar-se (Veras *et al.*, 1995), decidimos realizar experimentos de coinfeção de *C. burnetii* e *L. amazonensis* a fim de observar a interação parasita-célula e parasita-parasita, bem como determinar qual seria a característica prevalente quando ambos coabitam a mesma célula hospedeira.

Para isso, utilizamos placa de 24 poços com lamínulas contendo macrófagos NS e ATP6V0d2-kd mono infectados com *C. burnetii mCherry* ou co infectados com *C. burnetii mCherry* + *L. amazonensis* ativados ou não com LPS+ IFN- γ . Em relação as células co infectadas, o parasita foi adicionado após 48 horas de infecção da bactéria, quando já eram observados vacúolos espaçosos que poderiam ser coabitados pela *L. amazonensis*. As lamínulas foram fixadas nos períodos de 72 horas (infecção inicial) e 144 horas (infecção tardia) pós infecção. Então, as lamínulas foram marcadas com DAPI e observadas no microscópio de fluorescência direto para a análise da porcentagem de infecção e formação dos vacúolos.

A partir da análise de um único experimento, observamos que as células NS e ATP6V0d2-kd nos tempos iniciais apresentaram predominância de células co infectadas, sendo o segundo lugar ocupado pela mono infecção de *C. burnetii* nas células NS e pela mono infecção de *L. amazonensis* nas células ATP6V0d2-kd.

Na infecção tardia, as células NS permanecem com a predominância de células co infectadas, entretanto há uma elevação na quantidade de células mono infectadas com *L. amazonensis*, ultrapassando a mono infecção com *C. burnetii*. As células *knock down* apresentaram aumento significativo na mono infecção com *L. amazonensis*, chegando a aproximadamente 40%, ficando as co infectadas e mono infectadas com *C. burnetii* em torno de 15% e 10%, respectivamente (Figura 12).

Figura 12 – A ausência da subunidade d2 não influenciou na porcentagem de células infectadas e coinfectadas.



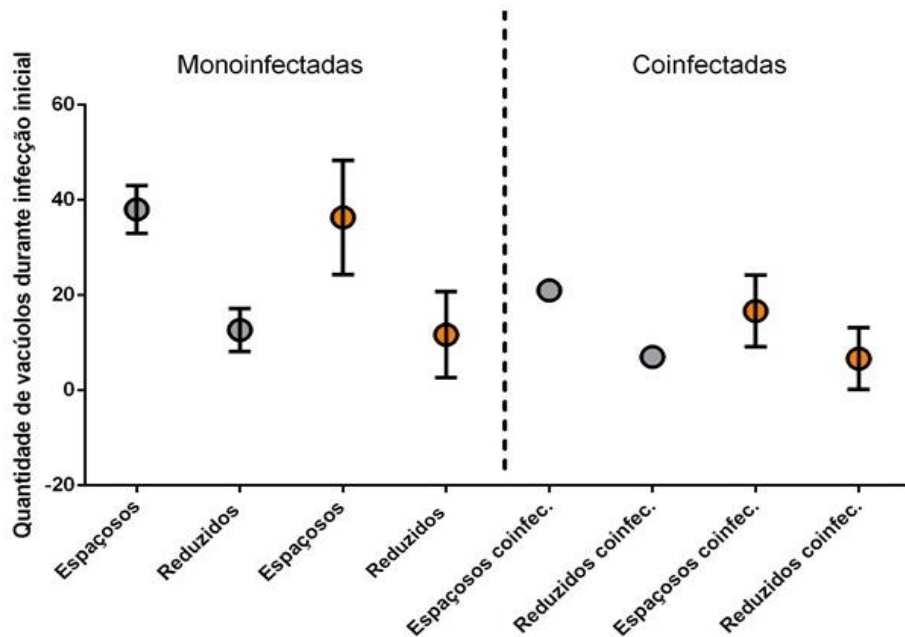
Macrófagos NS (em cinza) e ATP6V0d2-kd (em laranja) foram plaqueados, ativados e/ou infectados com *C. burnetii mCherry*. Após 48 horas de infecção com a bactéria, foi adicionada *L. amazonensis*. As lamínulas foram então fixadas nos tempos de infecção inicial (72 horas pós infecção de *C. burnetii*) e tardia (144 horas pós infecção de *C. burnetii*). Após marcação com DAPI, as células foram contadas e separadas em grupos de acordo com a infecção: *Infecção com C. burnetii*, *L. amazonensis* ou ambos. Após a contagem de 100 células por lamínula em um único experimento, não observamos diferença quando comparados os dois tipos celulares após 144 horas de coinfeção, entretanto houve maior multiplicação de *L. amazonensis* nas células *knock down* na infecção tardia.

4.9 A infecção com *L. amazonensis* não interfere na formação de vacúolos largos em células infectadas com *C. burnetii*

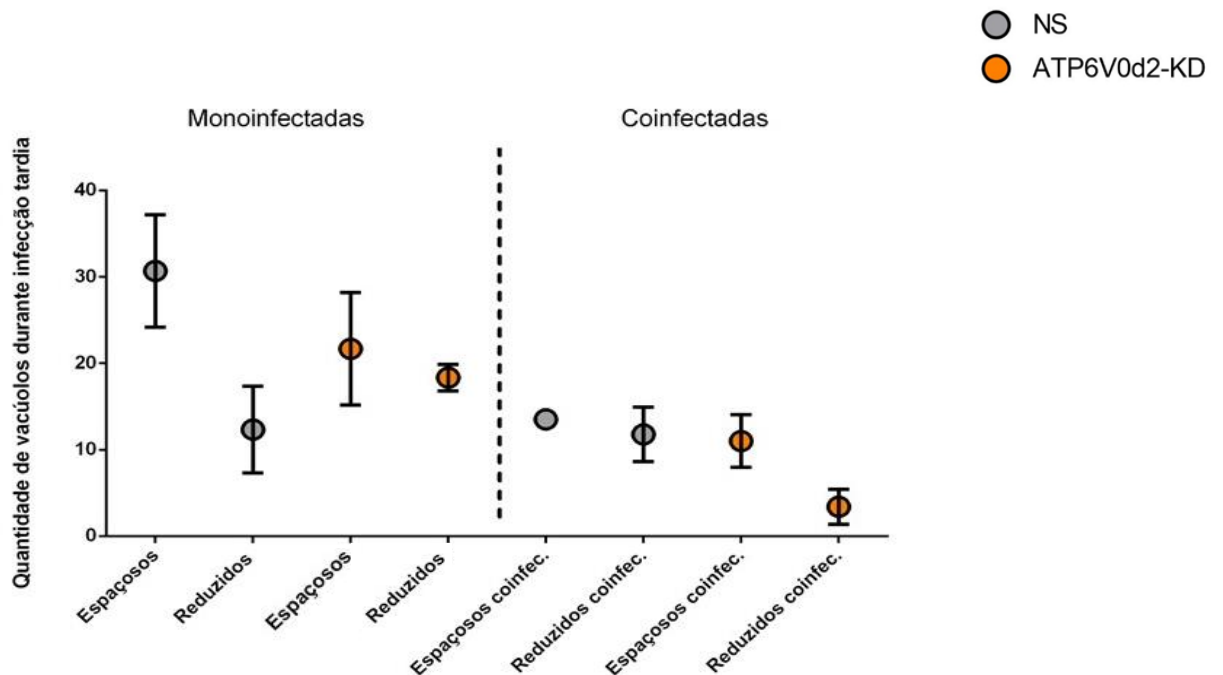
Com o mesmo experimento descrito acima, analisamos também a formação de vacúolos mono infectados e coinfectados na infecção inicial (Figura 13A) e tardia (Figura 13B). Tanto no tempo inicial quanto no tardio, todos os grupos estudados apresentaram maior quantidade de vacúolos espaçosos, independente do silenciamento da subunidade d2, sendo menor a quantidade total de vacúolos nos tempos tardios.

Figura 13 – Diminuição da quantidade de vacúolos na infecção tardia.

A



B



Macrófagos NS (em cinza) e ATP6V0d2-kd (em laranja) foram plaqueados, ativados e infectados com *C. burnetii mCherry*. Após 48 horas de infecção com a bactéria, foi adicionada *L. amazonensis*. As lamínulas foram então fixadas nos tempos de infecção inicial (72 horas pós infecção de *C. burnetii*) (A) e tardia (144 horas pós infecção de *C. burnetii*) (B). Após marcação com DAPI, foram analisadas 100 células por lamínula e os vacúolos observados foram classificados em espaçosos, reduzidos, espaçosos coinfecados (espaçosos coinfec.) e reduzidos coinfecados (reduzidos coinfec.). **A e B.** Comparando os dados obtidos a partir da análise da infecção inicial (A) e tardia (B), observamos diminuição na quantidade de vacúolos espaçosos na infecção tardia. Pode-se notar também que a quantidade de vacúolos espaçosos é maior quando comparados com os vacúolos reduzidos em todos os grupos estudados, independente da coinfecção.

5 DISCUSSÃO

A partir de dados da literatura onde autores relataram que a subunidade ATP6V0d2 possui grande importância na infecção de macrófagos pelo amastigota de *L. amazonensis*, um parasita protozoário, capaz de formar vacúolos largos e ácidos semelhantes aos da *C. burnetii* (Osorio Y Fortea *et al.*, 2009; Pessoa *et al.*, 2019), entendemos que d2 poderia estar envolvida no desenvolvimento de largos vacúolos, como os VCCs, permitindo que tais patógenos se multipliquem mesmo em um ambiente altamente hostil e inflamatório.

Os dados apresentados por Pessoa e colaboradores, demonstraram que o crescimento do vacúolo de *L. amazonensis* foi visivelmente prejudicado em células ATP6V0d2-kd, independente da ativação com IFN- γ + LPS (Pessoa *et al.*, 2019). No entanto, diferentemente dos estudos supracitados, nossos resultados de contagem de vacúolos demonstraram que não há diferença na quantidade nem no tamanho, em média, dos VCCs desenvolvidos entre as células controle e *knock down* ao longo da infecção. Adicionalmente, a quantificação de ATP6V0d2 ao decorrer da infecção mostrou que a presença da *C. burnetii* não induz o aumento da expressão da subunidade d2. Portanto, neste trabalho inferimos que o crescimento vacuolar durante a infecção da bactéria *C. burnetii* em macrófagos ocorre de maneira d2-independente, embora os vacúolos formados na infecção destes dois patógenos possuam não somente similaridade morfológica, mas também tem como característica o pH ácido e a intensa atividade das bombas v-ATPases (Veras *et al.*, 1995).

Ao analisarmos a porcentagem de infecção de *C. burnetii* nos macrófagos silenciados e não silenciados para a subunidade d2 ao decorrer do tempo, encontramos a mesma proporção de células NS e ATP6V0d2-kd infectadas, demonstrando que a deficiência da subunidade d2 não afeta o processo de fagocitose dos macrófagos RAW 264.7. Xia e colaboradores, que analisaram a infecção por *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*) em macrófagos derivados de medula óssea com expressão restrita de ATP6V0d2, relataram resultados indicando que a ATP6V0d2 é necessária para o *clearance* das bactérias fagocitadas, uma vez que as células deficientes em ATP6V0d2 apresentaram maior quantidade de *S. typhimurium* em seu interior (Xia *et al.*, 2019), diferentemente de nossos resultados com a infecção de *C. burnetii*. Entretanto, também realizaram experimentos com macrófagos incubados com FITC-dextran e não relataram diferença na marcação de FITC entre

as células controle e as deficientes para a subunidade d2, indicando, assim como nós, que a subunidade ATP6V0d2 não diminui a capacidade fagocítica dos macrófagos (Xia *et al.*, 2019).

No processo supracitado de fagocitose e degradação de patógenos, há participação das duas isoformas da subunidade **d** da v-ATPase H⁺, dado que a ATP6V0d1 participa ativamente da acidificação vacuolar (Wu *et al.*, 2009), necessária para a atividade de enzimas degradativas e a ATP6V0d2 tem papel importante no processo de fusão de membranas, (Forgac, 2007; Xia *et al.*, 2019). Neste trabalho investigamos se, em decorrência do silenciamento da ATP6V0d2, poderia ocorrer superexpressão da isoforma d1 como mecanismo de compensação, entretanto nossa análise demonstrou o contrário do esperado, uma vez que em células ATP6V0d2-kd houve uma diminuição, e não o aumento da expressão de ATP6V0d1. Acreditamos que isso possa ser explicado pelo fato de que as duas isoformas apresentam papéis complementares, porém diferentes na via de autofagia (Xia *et al.*, 2019), desta forma, a diminuição da expressão de uma não seria capaz de induzir a superexpressão da outra, uma vez que este processo não seria suficiente para completar a via autofágica e conseqüentemente resultar na degradação dos microrganismos.

Em nossos experimentos, somente as células ativadas e infectadas apresentaram expressão aumentada de ATP6V0d1, similar à quantidade encontrada nas células controle. Uma vez que isoforma d1 é implicada na atividade regular da v-ATPase de bombeamento de prótons, tendo participação ativa no processo de acidificação das organelas e conseqüentemente na homeostase do pH das mesmas (Smith *et al.*, 2005), sugerimos que a ativação juntamente com a presença da bactéria pode modular a expressão celular desta subunidade como resposta ao ambiente inflamatório altamente desfavorável.

A análise dos dados obtidos pela quantificação de *C. burnetii* nos permitiu observar que no ponto de 120 horas pós infecção, as células não silenciadas apresentaram carga bacteriana notavelmente maior que as *knock down*, mostrando que a falta desta subunidade faz com que não ocorra a sustentação da infecção em tempos tardios.

Sugerimos que a contenção da infecção em células silenciadas para a subunidade d2 da v-ATPase ocorra devido ao aumento da atividade inflamatória

destes macrófagos, uma vez que ATP6V0d2 possui atividade anti-inflamatória (Murase *et al.*, 2018). Corroborando com Pessoa e colaboradores, que relataram aumento na expressão de ATP6V0d2 em macrófagos durante a infecção por *L. amazonensis*, sendo esta uma resposta induzida pelo parasita para permitir sua sobrevivência no ambiente hostil e inflamatório dos VPs (Pessoa *et al.*, 2019).

Nossos dados sobre a ausência de VCCs em macrófagos infectados com *C. burnetii* e ativados com LPS e IFN- γ , corroboram com os dados encontrados por Howe e colaboradores, que observaram que o óxido nítrico inibe a replicação de *C. burnetii* e a maturação do VCCs em experimentos com células murinas L-929 infectadas com *C. burnetii* e simultaneamente incubadas com TNF- α + IFN- γ ou com 2,2'-(hydroxynitrosohydrazino) bis-ethanamina, um composto doador de óxido nítrico. Nestes experimentos, células com aumento de óxido nítrico endógeno (pela ativação com TNF- α + IFN- γ) ou exógeno (pela presença do composto doador de NO) não apresentaram formação de vacúolos espaçosos, característicos pela infecção por *C. burnetii*. Entretanto, quando adicionado inibidor de iNOS, a formação de vacúolos foi restabelecida (Howe *et al.*, 2002). Nossos resultados mostraram que a produção de NO após 48 horas de infecção com *C. burnetii* nas células NS e ATP6V0d2-kd é próxima de zero, porém ambas seguem o mesmo padrão, aumentando nos grupos infectados nas células somente ativadas. Quando realizamos simultaneamente a ativação e a infecção com *C. burnetii*, a produção chega em seu ponto mais alto, podendo ser responsável pela inibição da formação de VCCs observada em nossos experimentos, corroborando os dados obtidos por Howe e colaboradores.

Para complementar nossos dados sobre produção de NO e entender melhor seu papel durante a infecção por *C. burnetii*, realizamos experimentos quantificando a expressão de transcritos de mRNA de NOS2 (enzima produtora de grandes quantidades de NO) (Macmicking *et al.*, 1997) e arginase (enzima capaz de regular negativamente a produção deste composto) (Gaur *et al.*, 2007), bem como realizado por Pessoa e colaboradores (Pessoa *et al.*, 2019). A análise dos dados obtidos nos permite observar expressão significativamente maior de NOS2 em células infectadas submetidas a ativação com IFN- γ + LPS, corroborando com nossos resultados supracitados que mostraram pico de produção de NO justamente no mesmo grupo de células, mais uma vez sem interferência do silenciamento da subunidade ATP6V0d2. Diferente de nós, Pessoa e colaboradores observaram pico de expressão de NOS2

em células somente ativadas, principalmente nas *knock down*, sendo a expressão diminuída com a presença do protozoário *L. amazonensis* após 6 horas de infecção (Pessoa *et al.*, 2019), mostrando mais uma vez, diferenças no curso da infecção de *C. burnetii* e *L. amazonensis*.

Tanto nas células NS quanto nas ATP6V0d2-kd, a expressão de arginase foi significativamente inferior apenas nas células sem tratamento com IFN- γ + LPS nem infecção com *C. burnetii*, sugerindo que o aumento de sua expressão seja um mecanismo do próprio macrófago para tentativa de balanço do ambiente inflamatório causado pela presença da bactéria e/ou ativação com IFN- γ e LPS. Contradizendo mais uma vez os dados apresentados por Pessoa e colaboradores, que observaram, após 72 horas de infecção, pouca expressão de arginase em macrófagos, independente da ativação, sendo sua expressão aumentada apenas na presença de *L. amazonensis*, sugerindo que o parasita é capaz de induzir superexpressão desta enzima para tornar o ambiente menos inflamatório e conseqüentemente favorável para sua sobrevivência e multiplicação (Pessoa *et al.*, 2019).

Para comprovar a similaridade entre os vacúolos de *C. burnetii* e *L. amazonensis*, realizamos um único experimento de coinfeção que demonstrou principalmente que a *L. amazonensis* é capaz de invadir e se manter no interior dos VCCs formados na infecção prévia por *C. burnetii*, assim como observado por Veras e colaboradores (Veras *et al.*, 1995). Observamos também um aumento considerável na infecção por *L. amazonensis* nos tempos tardios, presumimos que este fato pode estar relacionado com a discrepância da velocidade de multiplicação dos dois patógenos, sendo a taxa de divisão da bactéria mais lenta, com tempo de geração de aproximadamente 10-12 horas (Heinzen *et al.*, 1999). Acreditamos que, como o protozoário *L. amazonensis* tem a capacidade de se multiplicar mais rapidamente, com tempo de geração de aproximadamente 7 horas (Da Silva *et al.*, 2013), é capaz de romper a célula hospedeira, podendo assim infectar maior número de células em tempos mais tardios de infecção.

Por fim, verificamos que a quantidade de vacúolos espaçosos em todos os casos analisados é superior à quantidade de vacúolos reduzidos, sugerindo que a presença da *L. amazonensis* não impede nem auxilia na formação de vacúolos largos pela bactéria. Apesar disso, notamos diminuição na quantidade de vacúolos totais

formados durante a coinfeção, acreditamos que pode ser decorrente do sofrimento celular ao suportar a presença dos dois patógenos e conseqüentemente menor multiplicação das mesmas. Contudo, seriam necessárias repetições dos experimentos de coinfeção para a realização das análises estatísticas e obtenção de resultados mais concretos da interação entre os dois patógenos neste ambiente inflamatório.

6 CONCLUSÃO

A ATP6V0d2 não tem participação ativa na biogênese dos VCCs formados durante a infecção por *C. burnetii*. Uma vez que os macrófagos *knock down* infectados com a bactéria apresentaram VCCs espaçosos e numerosos, mesma porcentagem de infecção das células não silenciadas e não superexpressaram a subunidade d2 na presença da bactéria. Apesar disso, o silenciamento de ATP6V0d2 torna os macrófagos mais inflamatórios, acarretando assim no controle da infecção e consequentemente diminuição da carga bacteriana. Por fim, sugerimos também que o pico de produção de óxido nítrico em macrófagos concomitantemente infectados e ativados com IFN- γ + LPS, relacionado com a maior expressão de NOS2, é responsável pela inibição da formação de VCCs espaçosos.

REFERENCIAS:

AGUILERA, M. et al. **Actin dynamics and Rho GTPases regulate the size and formation of parasitophorous vacuoles containing *Coxiella burnetii***. Infect Immun, v. 77, n. 10, p. 4609-20, Oct 2009. ISSN 1098-5522 (Electronic) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19635823> >.

ANDERSON, A. et al. **Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group**. MMWR Recomm Rep, v. 62, n. RR-03, p. 1-30, Mar 29 2013. ISSN 1545-8601 (Electronic) 1057-5987 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23535757> >.

BEARE, P. A. et al. **Dot/Icm type IVB secretion system requirements for *Coxiella burnetii* growth in human macrophages**. MBio, v. 2, n. 4, p. e00175-11, 2011. ISSN 2150-7511 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21862628> >.

COCKRELL, D. C. et al. **Robust growth of avirulent phase II *Coxiella burnetii* in bone marrow-derived murine macrophages**. PLoS One, v. 12, n. 3, p. e0173528, 2017. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28278296> >.

COLEMAN, S. A. et al. **Temporal analysis of *Coxiella burnetii* morphological differentiation**. J Bacteriol, v. 186, n. 21, p. 7344-52, Nov 2004. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489446> >.

COSTA, P. S.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. **Questing one Brazilian query: reporting 16 cases of Q fever from Minas Gerais, Brazil**. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, v. 48, n. 1, p. 5-9, Jan-Feb 2006. ISSN 0036-4665 (Print) 0036-4665 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16547572> >.

DA SILVA, M. S. et al. ***Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle**. PLoS One, v. 8, n. 11, p. e81397, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24278433> >.

DERRICK, E. H. **"Q" fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation**. Rev Infect Dis, v. 5, n. 4, p. 790-800, Jul-Aug 1983. ISSN 0162-0886 (Print) 0162-0886 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6622891> >.

DISTEL, J. S.; BERON, W.; FLORES, R. M. O. ***Coxiella burnetii*: living inside the host cell**. BIOCELL, 2019.

DUPONT, H. T. et al. **Prevalence of antibodies to *Coxiella burnetii*, *Rickettsia conorii*, and *Rickettsia typhi* in seven African countries**. Clin Infect Dis, v. 21, n. 5, p. 1126-33, Nov 1995. ISSN 1058-4838 (Print) 1058-4838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8589132> >.

ELDIN, C. et al. **From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change.** Clin Microbiol Rev, v. 30, n. 1, p. 115-190, Jan 2017. ISSN 1098-6618 (Electronic) 0893-8512 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27856520> >.

FENG, S. et al. **Atp6v1c1 is an essential component of the osteoclast proton pump and in F-actin ring formation in osteoclasts.** Biochem J, v. 417, n. 1, p. 195-203, Jan 01 2009. ISSN 1470-8728 (Electronic) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18657050> >.

FERNANDES, T. D. et al. **Murine Alveolar Macrophages Are Highly Susceptible to Replication of *Coxiella burnetii* Phase II In Vitro.** Infect Immun, v. 84, n. 9, p. 2439-48, Sep 2016. ISSN 1098-5522 (Electronic) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27297388> >.

FORGAC, M. **Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology.** Nat Rev Mol Cell Biol, v. 8, n. 11, p. 917-29, Nov 2007. ISSN 1471-0080 (Electronic) 1471-0072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17912264> >.

FOURNIER, P. E.; MARRIE, T. J.; RAOULT, D. **Diagnosis of Q fever.** J Clin Microbiol, v. 36, n. 7, p. 1823-34, Jul 1998. ISSN 0095-1137 (Print) 0095-1137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9650920> >.

GAO, J. J. et al. **Autocrine/paracrine IFN- α mediates the lipopolysaccharide-induced activation of transcription factor Stat1 α in mouse macrophages: pivotal role of Stat1 α in induction of the inducible nitric oxide synthase gene.** J Immunol, v. 161, n. 9, p. 4803-10, Nov 1 1998. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9794412> >.

GAUR, U. et al. **An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis.** J Immunol, v. 179, n. 12, p. 8446-53, Dec 15 2007. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056391> >.

GLAZUNOVA, O. et al. ***Coxiella burnetii* genotyping.** Emerg Infect Dis, v. 11, n. 8, p. 1211-7, Aug 2005. ISSN 1080-6040 (Print) 1080-6040 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102309> >.

GRUNDNER, C.; NG, H. L.; ALBER, T. ***Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB structure reveals a diverged fold and a buried active site.** Structure, v. 13, n. 11, p. 1625-34, Nov 2005. ISSN 0969-2126 (Print) 0969-2126 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16271885> >.

GURTLER, L. et al. ***Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever.** Transfus Med Hemother, v. 41, n. 1, p. 60-72, Feb 2014. ISSN 1660-3796 (Print) 1660-3796 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659949> >.

HACKSTADT, T.; WILLIAMS, J. C. **Biochemical stratagem for obligate parasitism of eukaryotic cells by *Coxiella burnetii*.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 78, n. 5, p. 3240-4, May

1981. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6942430> >.

HANSEN, D. A. T. et al. **Notification data and criteria during a large Q-fever epidemic reassessed.** Epidemiol Infect, v. 147, p. e191, Jan 2019. ISSN 1469-4409 (Electronic) 0950-2688 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31364550> >.

HEINZEN, R. A. et al. **Differential interaction with endocytic and exocytic pathways distinguish parasitophorous vacuoles of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia trachomatis*.** Infect Immun, v. 64, n. 3, p. 796-809, Mar 1996. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8641784> >.

HEINZEN, R. A. et al. **Developmental biology of *Coxiella burnetii*.** Trends In Microbiology, [s.l.], v. 7, n. 4, p.149-154, abr. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x\(99\)01475-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0966-842x(99)01475-4).

HOWE, D. et al. **Nitric oxide inhibits *Coxiella burnetii* replication and parasitophorous vacuole maturation.** Infect Immun, v. 70, n. 9, p. 5140-7, Sep 2002. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183564> >.

HUYNH, K. K.; GRINSTEIN, S. **Regulation of vacuolar pH and its modulation by some microbial species.** Microbiol Mol Biol Rev, v. 71, n. 3, p. 452-62, Sep 2007. ISSN 1092-2172 (Print) 1092-2172 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17804666> >.

KISSING, S.; SAFTIG, P.; HAAS, A. **Vacuolar ATPase in phago(lyso)some biology.** Int J Med Microbiol, v. 308, n. 1, p. 58-67, Jan 2018. ISSN 1618-0607 (Electronic) 1438-4221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28867521> >.

LARSON, C. L.; HEINZEN, R. A. **High-Content Imaging Reveals Expansion of the Endosomal Compartment during *Coxiella burnetii* Parasitophorous Vacuole Maturation.** Front Cell Infect Microbiol, v. 7, p. 48, 2017. ISSN 2235-2988 (Electronic) 2235-2988 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28293541> >.

LATOMANSKI, E. A.; NEWTON, H. J. **Interaction between autophagic vesicles and the *Coxiella*-containing vacuole requires CLTC (clathrin heavy chain).** Autophagy, v. 14, n. 10, p. 1710-1725, 2018. ISSN 1554-8635 (Electronic) 1554-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29973118> >.

LEE, S. H. et al. **v-ATPase V0 subunit d2-deficient mice exhibit impaired osteoclast fusion and increased bone formation.** Nat Med, v. 12, n. 12, p. 1403-9, Dec 2006. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128270> >.

LIZIO, M. et al. **Gateways to the FANTOM5 promoter level mammalian expression atlas.** Genome Biol, v. 16, p. 22, Jan 5 2015. ISSN 1474-760X (Electronic) 1474-7596 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25723102> >.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. **Nitric oxide and macrophage function.** Annu Rev Immunol, v. 15, p. 323-50, 1997. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143691> >.

MANOLSON, M. F. et al. **STV1 gene encodes functional homologue of 95-kDa yeast vacuolar H(+)-ATPase subunit Vph1p.** J Biol Chem, v. 269, n. 19, p. 14064-74, May 13 1994. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7514599> >.

MARSHANSKY, V.; FUTAI, M. **The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function.** Curr Opin Cell Biol, v. 20, n. 4, p. 415-26, Aug 2008. ISSN 0955-0674 (Print) 0955-0674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511251> >.

MCCAUL, T. F.; WILLIAMS, J. C. **Developmental cycle of *Coxiella burnetii*: structure and morphogenesis of vegetative and sporogenic differentiations.** J Bacteriol, v. 147, n. 3, p. 1063-76, Sep 1981. ISSN 0021-9193 (Print) 0021-9193 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7275931> >.

MURASE, M. et al. **Intravesicular Acidification Regulates Lipopolysaccharide Inflammation and Tolerance through TLR4 Trafficking.** J Immunol, v. 200, n. 8, p. 2798-2808, Apr 15 2018. ISSN 1550-6606 (Electronic) 0022-1767 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29540576> >.

NDJAMEN, B. et al. **Leishmania parasitophorous vacuoles interact continuously with the host cell's endoplasmic reticulum; parasitophorous vacuoles are hybrid compartments.** Cell Microbiol, v. 12, n. 10, p. 1480-94, Oct 2010. ISSN 1462-5822 (Electronic) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20497181> >.

NISHI, T.; KAWASAKI-NISHI, S.; FORGAC, M. **Expression and function of the mouse V-ATPase d subunit isoforms.** J Biol Chem, v. 278, n. 47, p. 46396-402, Nov 21 2003. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963731> >.

OSORIO Y FORTEA, J. et al. **Transcriptional signatures of BALB/c mouse macrophages housing multiplying *Leishmania amazonensis* amastigotes.** BMC Genomics, v. 10, p. 119, Mar 20 2009. ISSN 1471-2164 (Electronic) 1471-2164 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302708> >.

PESSOA, C. C. et al. **ATP6V0d2 controls *Leishmania* parasitophorous vacuole biogenesis via cholesterol homeostasis.** PLoS Pathog, v. 15, n. 6, p. e1007834, Jun 2019. ISSN 1553-7374 (Electronic) 1553-7366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31199856> >.

ROMANO, P. S. et al. **The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell.** Cell Microbiol, v. 9, n. 4, p. 891-909, Apr 2007. ISSN 1462-5814 (Print) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17087732> >.

SEIXAS, E. et al. **Bacteria and protozoa differentially modulate the expression of Rab proteins.** PLoS One, v. 7, n. 7, p. e39858, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22911692> >.

SMITH, A. N. et al. **Vacuolar H⁺-ATPase d2 subunit: molecular characterization, developmental regulation, and localization to specialized proton pumps in kidney and bone.** J Am Soc Nephrol, v. 16, n. 5, p. 1245-56, May 2005. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15800125> >.

SOLDATI, T.; NEYROLLES, O. **Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)!** Traffic, v. 13, n. 8, p. 1042-52, Aug 2012. ISSN 1600-0854 (Electronic) 1398-9219 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22462580> >.

SVRAKA, S. et al. **Establishment of a genotyping scheme for *Coxiella burnetii*.** FEMS Microbiol Lett, v. 254, n. 2, p. 268-74, Jan 2006. ISSN 0378-1097 (Print) 0378-1097 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16445755> >.

VAN SCHAİK, E. J. et al. **Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*.** Nat Rev Microbiol, v. 11, n. 8, p. 561-73, Aug 2013. ISSN 1740-1534 (Electronic) 1740-1526 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23797173> >.

VERAS, P. S. et al. **Entry and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes within phagolysosome-like vacuoles that shelter *Coxiella burnetii* in Chinese hamster ovary cells.** Infect Immun, v. 63, n. 9, p. 3502-6, Sep 1995. ISSN 0019-9567 (Print) 0019-9567 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642284> >.

VIEIRA, O. V.; BOTELHO, R. J.; GRINSTEIN, S. **Phagosome maturation: aging gracefully.** Biochem J, v. 366, n. Pt 3, p. 689-704, Sep 15 2002. ISSN 0264-6021 (Print) 0264-6021 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12061891> >.

VOTH, D. E.; HEINZEN, R. A. **Lounging in a lysosome: the intracellular lifestyle of *Coxiella burnetii*.** Cell Microbiol, v. 9, n. 4, p. 829-40, Apr 2007. ISSN 1462-5814 (Print) 1462-5814 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17381428> >.

WOLDEHIWET, Z. **Q fever (coxiellosis): epidemiology and pathogenesis.** Res Vet Sci, v. 77, n. 2, p. 93-100, Oct 2004. ISSN 0034-5288 (Print) 0034-5288 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15196898> >.

WU, H.; XU, G.; LI, Y. P. **Atp6v0d2 is an essential component of the osteoclast-specific proton pump that mediates extracellular acidification in bone resorption.** J Bone Miner Res, v. 24, n. 5, p. 871-85, May 2009. ISSN 1523-4681 (Electronic) 0884-0431 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19113919> >.

XIA, Y. et al. **The macrophage-specific V-ATPase subunit ATP6V0D2 restricts inflammasome activation and bacterial infection by facilitating autophagosome-**

lysosome fusion. Autophagy, v. 15, n. 6, p. 960-975, Jun 2019. ISSN 1554-8635 (Electronic) 1554-8627 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30681394> >.

ZAMBONI, D. S. **Genetic Control of Natural Resistance of Mouse Macrophages to *Coxiella burnetii* Infection In Vitro: Macrophages from Restrictive Strains Control Parasitophorous Vacuole Maturation.** INFECTION AND IMMUNITY, v. 72, 2004.