EDUARDO PINHEIRO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA MICOBACTERIANA E
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DURANTE
A INFECÇÃO POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium bovis E *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2011

EDUARDO PINHEIRO AMARAL

**AVALIAÇÃO DA VIRULÊNCIA MICOBACTERIANA E
MODULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE DURANTE
A INFECÇÃO POR ISOLADOS CLÍNICOS DE
Mycobacterium bovis E *Mycobacterium tuberculosis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria Regina D'Império Lima

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Amaral, Eduardo Pinheiro.

Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis* / Eduardo Pinheiro Amaral. – São Paulo, 2011.

Orientador: Maria Regina D'Império Lima.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Interação patógeno X hospedeiro.

Versão do título para o inglês: Evaluation of the mycobacterial virulence and modulation of the immune response during infection by clinical isolate of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*

Descritores: 1. Tuberculose 2. *Mycobacterium* sp 3. Virulência 4. Resposta imune I. Lima, Maria Regina D'Império II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB054/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Eduardo Pinheiro Amaral.

Título da Dissertação: Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium tuberculosis*.

Orientador(a): Maria Regina D'Império Lima.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **26** nas fls. **68** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Maria Regina D'Império Lima, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Modelo animal para análise da patogenicidade de cepas de Mycobacterium bovis e avaliação da resposta imune celular e humoral a isolados patogênicos** do qual participou o(s) alunos **Eduardo Pinheiro Amaral e a pesquisadora Elena Lassounskaia**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **09.04.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de abril de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

UENF

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

**GOVERNO DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**

Reitoria
Comissão de Ética de Uso
de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Investigação da virulência, patogenicidade e apoptose induzida por micobactérias de genótipos determinados"**, protocolo nº 20, sob a responsabilidade das Dras Elena Lassounskaia e Thereza L. Kipnis, **Laboratório de Biologia do Reconhecer do Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA – UENF) em reunião de 26/09/2006. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 26/09/2010.

Campos dos Goytacazes, 26 de Setembro de 2006.

Dr. Milton M. Kanashiro
Presidente da CEUA-UENF

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - CEP: 28 013 - 600
Tel.: (22) 2726-1457 - Fax: (22) 2726-1520 - e-mail: kmilton@uenf.br

UNIVERSIDADE PÚBLICA DE QUALIDADE – DIREITO DO CIDADÃO, DEVER DO ESTADO

UENF

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

GOVERNO DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO

Comissão Interna de
Biossegurança

C-CIBio/UENF-03/07

Campos dos Goytacazes, em 03 de maio de 2007.

À

Diretoria Executiva do CNPq
BRASILIA – D.F.

Ass.: Biossegurança / Projeto de pesquisa / Edital DECIT/CNPq-25/06.

Exmo. Sr. Diretor

De posse do projeto de pesquisa “**Caracterização das Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Isoladas no Rio de Janeiro e Região Petrolífera da Bacia de Campos em Relação de Genótipos Prevalentes, Virulência das Cepas e Distribuição Espacial dos Pacientes**”, a ser desenvolvido no “**Laboratório de Biologia do Reconhecer**” (LBR), da UENF, esta Comissão tem a informar, após reunir-se com as Professoras Elena Lassounskaia (Coordenadora) e Tereza Liberman Kipnis (Pesquisadora) e inspecionar as instalações do LBR, que este cumpre os preceitos legais de Biossegurança (Lei 11.105 de 24/03/05):

Todos os procedimentos envolvendo o *Mycobacterium tuberculosis* (cultivo, preparação dos inóculos, infecção *in vitro* e *in vivo* e manuseio de animais, manipulação das amostras infectadas etc...) serão levadas a efeito no Biotério com biossegurança nível 3, do LBR / UENF e ainda, como asseveram a Coordenadora e a Professora Tereza, no Laboratório (nível 3) do Professor Célio Lopes da Silva, no CPT da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP).

Os descartes de materiais e de animais seguirão os padrões ditados pelas normas de Biossegurança (BS3), já estabelecidos na UENF e, por informação, no CPT / FMRP.

Sem mais para o momento, somos

Respeitosamente

Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiróz de Carvalho
(Coordenador da CIBio./UENF)

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Departamento de Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Maria Regina D'Império Lima, em colaboração com o Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociência e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense em Campos dos Goytacazes/RJ, sob responsabilidade da Prof.^a Dr.^a Elena Lassounskaia. O presente projeto recebeu auxílio financeiro da FAPESP (Fundação de amparo à Pesquisa do estado de São Paulo), projeto número – 2010/51150-4, e bolsa, processo número 2009/02696-7.

*À Deus,
meus pais, familiares, amigos
e aos meus professores.*

Agradecimentos...

À DEUS, por sempre ter erguido Sua mão poderosa sobre minha vida e me ensinado a andar em Seus caminhos nos momentos de luta e tribulação.

Aos meus pais, Hamilton e Elisabeth, meus irmãos, Thiago e Higor e minha avó Eunice por sempre ter me ajudado nos momentos mais difíceis e se alegrando comigo dos momentos felizes. Louvo à Deus por ter me concedido uma bela família. Amo vocês!!!

À Silvia, uma pessoinha que Deus colocou na minha vida para caminhar comigo, me apoiando em tudo que faço. Te amo!!!

Aos Elenetes: Simone (Sisi), Verônica (Vevê), Marcelle, Fabrício, Giliane e Marlon... porque apesar da distância, sempre seremos um grande grupo de AMIGOS. Em especial, à Vevê, Marcelle e Sisi, que sempre estiveram dispostas em ajudar-me nestes experimentos malucos e também pela nossa grande amizade!!!

Ao pessoal da república Fabrício, Antônio, Renné e David, que abriram as portas de sua casa para mim. Durante o tempo que estive na casa de vocês descobri em vocês, grandes amigos.

Ao grupo da malária: Érika, Sheyla, Henrique, Raquel, Cláudia e Sandra, pela amizade e toda a força que vocês me deram durante estes anos. Ao Rogério e Meire por todo apoio técnico e pela amizade de vocês.

Aos amigos da igreja metodista do Bonfiglioli que me aceitaram com um filho junto aos seus. Em especial à família da D. Edmilsa e à família do Pr. Washington. Muito obrigado!!!

Ao professor Mário Hirata, por ter contribuído para o desenvolvimento deste projeto, cedendo o espaço do laboratório nível 3 de biossegurança para que eu pudesse trabalhar aqui em São Paulo.

Ao prof.^o Eulógio, por ter me ajudado e ensinado, todos esses anos, a trabalhar com cortes histológicos. Muito obrigado!!!

À professora Elena Lassounskaia, pela co-orientação, paciência, dedicação e apoio científico. Sou muito grato por todas as discussões, opiniões e conselhos que a senhora me deu. Muito obrigado!!!

À professora Regina D'Império Lima, por ter acreditado nos objetivos deste projeto e aceito desenvolver este estudo juntos. Muito obrigado pela sua paciência e apoio científico. Com certeza a senhora contribuiu muito para o meu crescimento científico.

Aos demais amigos e professores do departamento de imunologia da USP. Obrigado pela amizade e companheirismo!

Aos membros da banca por aceitarem participar deste grande momento da minha vida!!!

Valeu!!!

*"We dance round in a ring and suppose,
but the secret sits in the middle and knows"*

Robert Frost
1874 - 1963

RESUMO

Amaral EP. Avaliação da virulência micobacteriana e modulação da resposta imune durante a infecção por isolados clínicos de *Mycobacterium bovis* E *Mycobacterium tuberculosis*. [Dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A tuberculose é considerada um problema emergente de saúde pública. O genoma de *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) é 99,95% idêntico em sequência de nucleotídeo ao *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Apesar disto, estas duas espécies apresentam diferenças em suas propriedades biológicas que determinam ampla adaptação de *Mbv* para diferentes mamíferos, e *Mtb*, principalmente, para humano. Este estudo tem como objetivo avaliar a associação da patogenicidade/virulência e propriedades imunomoduladoras de isolados clínicos de *Mbv* (cepas B2 e MP287/03) e *Mtb* (cepa Beijing 1471), e da cepa de *Mtb* H37Rv, como referência de virulência. A virulência das micobactérias foi avaliada em camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com baixa dose de infecção (~100 bacilos). Os parâmetros utilizados foram índice de sobrevivência, avaliação da carga bacteriana (UFC, unidade formadora de colônia) e análise histopatológica dos pulmões, baço e fígado. Os isolados, MP287/03 e *Beijing* 1471, apresentaram maior virulência em relação às demais cepas, levando os camundongos à morte ainda na fase aguda de infecção. As cepas menos virulentas (B2 e H37Rv) induziram infecção crônica nos camundongos. A patologia induzida pelos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 foi mais severa, apresentando intenso infiltrado celular, alveolite e áreas de necrose pulmonar. A patologia exacerbada foi associada com o aumento do número de bactérias no pulmão, em relação aos bacilos de menor virulência, equivalente a $2-3 \log_{10}$ após 3 semanas de infecção. Para investigar os mecanismos responsáveis pelas diferenças na patogenicidade, avaliamos a modulação da resposta imune protetora durante a infecção. Citocinas pró- e anti-inflamatórias, consideradas importantes para controle da infecção, foram quantificadas a partir das culturas de células pulmonares obtidas 28 dias após a infecção. A cepa H37Rv induziu o padrão de citocinas pró-inflamatórias que é considerado como protetor, promovendo o controle do crescimento do bacilo durante a infecção. O perfil de citocinas induzidas pelo isolado B2 foi similar ao observado na infecção pela cepa H37Rv, o que contribuiu para controle da infecção durante a fase aguda. Apesar disto, houve a reativação da infecção nestes animais, o que levou à morte dos camundongos ao redor do dia 150 de infecção. Diferentes propriedades imunomodulatórias foram observadas durante a infecção pelos isolado hipervirulentos. Foi verificada baixa produção de mediadores pró-inflamatórios nos camundongos infectados com o isolado MP287/03, enquanto nos infectados com o isolado *Beijing* 1471 os níveis destes mediadores foram exacerbados. O desbalanço na produção das citocinas pró-inflamatórias pode ter contribuído para morte precoce dos animais. Em camundongos deficientes em IFN- γ (IFN- γ KO), todos os isolados bacterianos foram capazes de induzir morte dos animais. Interessantemente, a taxa de mortalidade dos camundongos IFN- γ KO infectados com as cepas hipervirulentas foi similar à observada nos camundongos selvagens infectados. As propriedades de hipervirulência dos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 foram confirmadas no modelo

de infecção *in vitro*. Ambos isolados apresentaram maior crescimento nos macrófagos e alta taxa de indução de morte destas células em relação à cepa H37Rv. Baseado nesse estudo, nós podemos concluir que as propriedades que conferem hipervirulência aos isolados clínicos de *Mbv* e *Mtb* estão principalmente relacionadas à alta capacidade de crescimento intracelular das bactérias, que parece ser pouco alterada pela presença de citocinas pró-inflamatórias. Sendo assim, as infecções por isolados hipervirulentos podem acarretar consequências semelhantes, mesmo quando associadas a diferentes padrões de modulação da resposta imune.

Palavra-chave: Tuberculose. *Mycobacterium sp.* Virulência. Resposta imune.

ABSTRACT

Amaral EP. Evaluation of the mycobacterial virulence and modulation of the immune response during infection by clinical isolates of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. [Masters Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Tuberculosis is an emergent problem of public health. *Mycobacterium bovis* (*Mbv*) genome is 99.95% identical in sequence to that of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). In spite of this, these species show considerable differences in their biological properties that determine the adaptation of *Mbv* in different mammals, and *Mtb*, mainly, in humans. This study aimed to evaluate the association between pathogenicity/virulence and immunomodulatory ability of *Mbv* (B2 and MP287/03) and *Mtb* (*Beijing* 1471) clinical isolates, using H37Rv strain as reference of virulence. The virulence was assessed in C57BL/6 mice infected with a low dose of bacilli (~100 bacteria) via intratracheal route. We used as parameters the survival rate, analysis of bacterial load (CFU, colony forming units) and histopathological analysis of the spleen, lungs and liver. MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates showed higher virulence than all others strains, leading to mice death during the acute phase of infection. The strains of lower virulence (B2 and H37Rv) induced chronic infection in mice. The pathology induced by MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates was the most severe, showing pulmonary necrosis, alveolitis and intense cellular infiltrate. This exacerbate pathology was associated with an increase of bacterial numbers in the lung, in comparison to the less virulent mycobacteria, equivalent to 2-3log₁₀ after 3 weeks of infection. To investigate the mechanisms responsible for the differences in pathogenicity, we evaluated the modulation of the protective immune response during 3-4 weeks after infection. Pro- and anti-inflammatory cytokines, considered to be important for infection control were measured in pulmonary cell culture supernatants 28 days after infection. The H37Rv strain induced the pro-inflammatory cytokine profile that is considered protective, promoting the control of bacteria growth during the infection. The cytokines profile induced by B2 isolate was similar to that observed in the infection by H37Rv strain, which contributed to the control of infection during the acute phase. Despite this, there was an infection reactivation in these mice, which led to mice death around day 150 of infection. Different immunomodulatory properties were observed during the infection by hypervirulent isolates. It was verified low production of pro-inflammatory mediators in mice infected by MP287/03 bacteria, whereas in mice infected by *Beijing* 1471 bacteria were observed exacerbated levels of pro-inflammatory mediators. The disbalance in the pro-inflammatory cytokine production may have contributed to the early mouse death. In IFN- γ deficient mice, all the bacteria isolates were capable to induce animal death. Interestingly, the mortality rate of IFN- γ deficient mice infected by hypervirulent

strains was similar to that of wild-type mice. The hypervirulent properties of the MP287/03 and *Beijing* 1471 isolates were confirmed using an *in vitro* model of infection. Both isolates showed higher growth in macrophages and induced higher cell death than the H37Rv strain. Based on this study, we concluded that the properties that confer hypervirulence to *Mbv* and *Mtb* clinical isolates are primarily related to the high intracellular growth capacity of the bacteria, which seems to be marginally affected by the presence of pro-inflammatory cytokines. Therefore, the infection by hypervirulent isolates can lead to similar outcomes, even when associated to different patterns of modulation of the immune response.

Keywords: Tuberculosis. *Mycobacterium sp.* Virulence. Immune response.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da via evolutiva proposto para os bacilos da tuberculose.....	29
Figura 2. Representação do envelope celular de <i>M. tuberculosis</i>	31
Figura 3. Cinética da carga micobacteriana nos pulmões e sobrevivência de camundongos infectados com <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	55
Figura 4. Análise macroscópica dos pulmões de camundongos infectados com isolados de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	57
Figura 5. Análise histopatológica dos pulmões e fígado de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	61
Figura 6. Quantificação de citocinas e NO secretados <i>ex vivo</i> por células dos pulmões de camundongos infectados com <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> aos 28 dias de infecção.....	62
Figura 7. Análise macroscópica dos pulmões de camundongos IFN- γ KO e WT infectados com <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	65
Figura 8. Cinética da carga bacteriana nos pulmões de camundongos WT e deficientes em IFN- γ infectados com isolados clínicos <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	66
Figura 9. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos IFN- γ KO e WT infectados com <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	67
Figura 10. Avaliação da suscetibilidade micobacteriana à ação do NO.....	70
Figura 11. Crescimento micobacteriano em meio 7H9 Middlebrook e taxa de fagocitose induzida por isolados de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	73

Figura 12. Avaliação do crescimento intracelular micobacteriano e capacidade citotóxica em macrófagos.....	74
---	-----------

Figura 13. Modelo esquemático sugerido para modulação da resposta imune na fase aguda e crônica de infecção por micobactérias virulentas e hipervirulentas.....	85
--	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos complexos *Mycobacterium tuberculosis* e *M. avium*.....28

Tabela 2 - Análise da carga bacilar nos pulmões dos camundongos infectados com isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*.....54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC – albumina, dextrose, catalase

AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida (*Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome*)

APC – célula apresentadora de antígeno

BAAR – bacilo álcool-ácido resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

BMDM – Macrófagos derivados da medula óssea

CFP-10 – (*10-kDa Culture Filtrate Protein*)

CFU – (*colony forming unit*)

CpG – DNA metilado

CR – receptor de complemento

DC – células dendríticas

DC-SIGN – (*Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*)

DMF – dimetilformamida

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade ótica

ESAT-6 – (*Early-secreted Target Antigen*)

Fas – (*TNF Superfamily Member 6*)

FasL – (*TNF Superfamily Member 6 Ligand*)

HIV – vírus da imunodeficiência adquirida (*Human Immunodeficiency Virus*)

IFN- γ - interferon γ

IL – interleucina

IS – (*Insertion Sequence*)

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

GM-CSF – (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*)

GSNO – S-nitrosoglutathione

KO – nocaute (*knockout*)

LAM – lipoarabinomannana

LPS – lipopolissacarídeo

MAC – complexo *Mycobacterium avium-intracellulare*

Man-LAM – lipoarabinomanana manosilada

MBL – lectina ligante de manose

M-CSF – (*Monocyte-cell Stimulate Factor*)

MCP-1 – (*Monocyte Chemotactic Protein 1*)

MDR-TB – tuberculose multidroga resistente (*Multidrug-resistant Tuberculosis*)

MIP – proteína inflamatória de macrófagos

MOI – multiplicidade de infecção

MTT – (“3’-[4,5-*dimethylthiazol-2yl*] 2,5-*diphenyltetrazolium bromide*”)

NF κ B – fator de transcrição nuclear κ b

NO – óxido nítrico

NOD – (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*)

OADC – oleato, albumina, dextrose e catalase

PAMPs – padrões moleculares associados à patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PBS – salina fosfatada tamponada

PDIM – pitioglicerol dimicoserato

PG – peptídeooglicano

PGL – glicolipídios fenólicos

pHSP – (*heat-shock protein*)

PIAS1 – (*Protein Inhibitor of Activated Stat1*)

PRA – (*PCR Restriction Enzyme Analysis*)

PRRs – (*Pattern-Recognition Receptors*)

Ptpn1 – (*Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 1*)

Ptpns1 – (*Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type Substrate 1*)

RANTES – (*Regulated upon Activation of Normal T cell Expressed and Secreted*)

RD – regiões de diferenças

RFLP – (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

RNAP – (*RNA Polymerase*)

RNI – intermediário reativo do nitrogênio

ROI – intermediário reativo do oxigênio

ROS – espécies reativas do oxigênio

SDS – dodecilsulfato de sodio

SFB – soro fetal bovino

SHP – proteínas com atividade de fosfatases

Sig – fator sigma

SIG – (*Small Inducible Gene*)

SOCS – (*Suppressors of Cytokine Signaling*)

TACO – (*tryptophan-aspartate containing coat protein*)

TB – tuberculose

TGF- β – fator de crescimento tumoral- β

Th – célula auxiliary (T *helper*)

TLR – receptores semelhantes a Toll

TNF- α – fator de necrose tumoral α

UFC – unidade formadora de colônia

WHO – (*World Health Organization*) - Organização Mundial da Saúde

WT – animal selvagem (*wild-type*)

XDR-TB – (*Extensively Drug-resistant Tuberculosis*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	Desenvolvimento da tuberculose.....	24
1.1.1	<i>Aspectos epidemiológicos da tuberculose</i>	25
1.2	Tuberculose bovina.....	26
1.3	Gênero <i>Mycobacterium</i>	27
1.4	Virulência micobacteriana.....	31
1.5	Resposta imune contra micobactérias.....	35
2	OBJETIVOS.....	40
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1	Animais.....	43
3.2	Analgesia	43
3.3	Crescimento bacteriano.....	43
3.4	Viabilidade bacteriana.....	44
3.5	Preparação do lisado de <i>M. bovis</i> BCG.....	45
3.6	Infecção dos camundongos.....	45
3.7	Histologia.....	45
3.7.1	<i>Método de Coloração com Hematoxilina-eosina</i>	45
3.7.2	<i>Método de Ziehl-Neelsen</i>	46
3.8	Obtenção dos bacilos e células presentes no pulmão.....	47
3.9	Cultura de células.....	47
3.9.1	<i>Obtenção de precursores da medula óssea e diferenciação para macrófagos</i>	48
3.9.2	<i>Infecção dos macrófagos</i>	48
3.9.2.1	<i>Avaliação da viabilidade dos macrófagos nas culturas infectadas com M. bovis e H37Rv</i>	49
3.9.2.2	<i>Avaliação do crescimento micobacteriano nos macrófagos infectados</i>	49
3.9.2.3	<i>Quantificação de NO pela Reação de Griess</i>	50
3.10	Método de atividade microbica com o doador de óxido nítrico GSNO.....	50
3.10.1	<i>Obtenção de precursores da medula óssea e diferenciação para macrófagos</i>	50
3.11	ELISA E BIOPLEX.....	51
3.12	Considerações metodológicas finais.....	51
3.13	Análises Estatísticas.....	51
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Número de UFCs nos pulmões e sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com isolados clínicos de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	53
4.2	Análises macro e microscópicas dos pulmões, baço e fígado dos camundongos infectados com isolados clínicos de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	56

4.3	Avaliação da resposta imune contra isolados clínicos com diferentes graus de virulência de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i>	60
4.4	Efeito do IFN- γ na fase aguda de infecção por isolados clínicos micobacterianos.....	63
4.5	Avaliação da suscetibilidade micobacteriana à ação microbicida por meio do doador de NO S-nitroglutathione (GSNO).....	68
4.6	Crescimento dos isolados virulentos de <i>M. bovis</i> e <i>M. tuberculosis</i> em 7H9 Middlebrook e intracelular em macrófagos derivados da medula óssea.....	71
5	DISCUSSÃO.....	75
6	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento da tuberculose

A tuberculose, uma doença causada por bacilos bacterianos álcool-ácido resistentes, possui alta prevalência em todo o mundo. Este mal constitui um grande problema de saúde pública em países subdesenvolvidos e/ou em desenvolvimento, representando 80% dos casos mundiais de tuberculose.

A transmissão da tuberculose ocorre mais frequentemente através da via respiratória, a partir de aerossóis produzidos no ato da tosse, fala e espirro de pessoas na fase bacilífera. As gotículas de aerossol, contendo partículas infectantes, são inaladas por indivíduos saudáveis e desta forma, os bacilos alojam-se nos alvéolos pulmonares e, posteriormente, contidos em granulomas (Center for Diseases Control and Prevention, 2008). Em virtude da redução da resistência orgânica (desnutrição, estresse ou associação com outras doenças imunossupressoras), o bacilo tende a proliferar intensamente e pode levar o indivíduo à morte, caso não haja tratamento adequado. Com a doença instalada o indivíduo portador é capaz de contaminar terceiros.

No passado a doença se disseminou pelos fluxos migratórios em decorrência das guerras e da colonização de novos continentes e/ou terras a partir do século XV. Naquele momento os tratamentos eram desempenhados de forma precária levando a uma alta taxa de mortalidade. Com o desenvolvimento dos quimioterápicos, estreptomicina (década de 1940), pirazinamida (1952), isoniazida (1952), etambutol (1961), e rifampicina (1966), houve uma grande expectativa em torno da cura e esperança em sua erradicação. Porém, devido a fatores externos associados à pobreza, a doença continuou a se propagar dentre os indivíduos. Tal situação agravou-se com o aparecimento de bacilos resistentes aos quimioterápicos habituais, fruto, na maioria das vezes, de tratamentos irregulares com grandes percentuais de abandono.

Os sintomas mais frequentes são febre vespertina, sudorese noturna, falta de apetite e emagrecimento. Podem ocorrer também dor torácica e tosse inicialmente seca, subsequente, acompanhada ou não, de escarro com presença de sangue (Brasil, 2010).

A prevenção contra a tuberculose no Brasil é feita na infância com inoculação

da vacina BCG (Bacilo Calmette Guérin), desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin. A vacina BCG consiste de uma cultura de bacilos vivos atenuados, numa concentração pré-determinada, que devido à sua capacidade imunogênica preservada, induz uma resposta imune protetora. O sistema imune saudável controla a infecção e desenvolve uma resposta protetora. Em indivíduos imunocomprometidos esta vacina pode gerar a reativação do bacilo e o desenvolvimento da doença.

Diversos fatores colaboram para diminuição da eficácia da vacina BCG como, por exemplo, a diversidade gênica das populações vacinadas e a qualidade das cepas de BCG. Embora a BCG previna as formas disseminadas da tuberculose em jovens, ela não protege contra a forma comum da doença, a tuberculose pulmonar em adultos, e também contra reinfecções (Kaufmann, 2001a).

1.1.1 Aspectos epidemiológicos da tuberculose

A tuberculose é uma doença que está diretamente ligada a fatores socioeconômicos, sendo de alta prevalência em países pobres e/ou populosos. Entre os países com maior incidência da doença estão Índia, China, Indonésia, Bangladesh, Nigéria, Paquistão, Filipinas, Congo, Rússia e Brasil (World Health Organization, 2007).

Estima-se que um terço da população mundial está infectado pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, mas somente 10% destes indivíduos desenvolvem a doença (Kaufmann, 2001a). A partir dos anos 80, o crescimento dos casos de tuberculose decorre, em grande parte, devido ao aumento dos casos de AIDS (do inglês, *Acquired Immunodeficiency Disease Syndrome*), mal esse que compromete o sistema imune e favorece o estabelecimento de várias doenças infecciosas, incluindo a tuberculose. Assim, a incidência de novos casos de tuberculose atingiu 9,4 milhões (139 casos/100.000 habitantes) em 2009, sendo estimado, dentre estes, 1,4 milhões de indivíduos positivos para o HIV (do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) e 2 milhões de mortes (WHO, 2009b). Presume-se que nos últimos 100 anos, 100 milhões de pessoas tenham morrido devido à tuberculose (WHO, 2007). Um importante fator a se ressaltar é o aparecimento de cepas resistentes ao tratamento

pelos quimioterápicos de primeira linha, como rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, denominadas MDR-TB (do inglês, *Multidrug-resistant Tuberculosis*), sendo estas cepas responsáveis por cerca 4,8% dos casos de tuberculose no mundo (WHO, 2009a). Recentemente, casos de tuberculose desencadeados por bacilos resistentes à segunda linha de quimioterápicos (capreomicina, canamicina, amicacina e fluoroquinolona), denominados XDR-TB (do inglês, *Extensively Drug-resistant Tuberculosis*), vêm sendo registrados, estando as opções de tratamento seriamente limitadas (WHO, 2007). Um estudo da Organização Mundial de Saúde, realizado em seis países e concluído no ano 2000, indica que um de cada três medicamentos usados no combate à tuberculose não é eficaz no tratamento de 90% dos pacientes.

O Brasil é o 19º país em número de notificações da doença com incidência de 38 novos casos/100.000 habitantes em 2007, sendo que 7 a 10% dos doentes não respondem aos medicamentos utilizados no tratamento (Corbett et al., 2003; WHO, 2009a, 2010).

1.2 Tuberculose bovina

A tuberculose bovina é uma zoonose de caráter inflamatório, infecto-contagiosa, causada pelo *Mycobacterium bovis*, cujo hospedeiro primário é o bovino. O agente infeccioso não acomete apenas o bovino, mas também o homem, cão, gato, porco, ovelha, cabra e cavalo (Matthias, 1998), assim como animais silvestres como macacos, elefantes, leões, tigres, camelos, búfalos, equinos, roedores selvagens, entre muitos outros, sendo alguns cativos em zoológicos e parques (Dankner et al., 1993; Abrahão, 1999). O *M. bovis* é tão patogênico para o homem quanto o *M. tuberculosis*, determinando as mesmas formas clínicas e lesões patológicas (Abrahão, 1999; Rua-Domenech, 2006). No passado dava-se pouca importância a essas fontes de infecção, mas estudos apontam que animais silvestres infectados contribuem para a persistência da tuberculose bovina no mundo (Abrahão, 1999).

Além das perdas econômicas geradas pela infecção do rebanho bovino, o interesse por esta patologia se deve também à da suscetibilidade do homem ao *M.*

bovis, que ao consumir produtos de origem animal contaminados pelo *M. bovis* pode desenvolver a tuberculose intestinal, sendo considerada a principal causa de manifestação da doença não-pulmonar em regiões rurais (Grange e Yates, 1994). A infecção humana pelo *M. bovis* foi primeiramente descrita no final do século XIX. Estima-se que ela tenha sido responsável por cerca de 10-18% de todos os casos de tuberculose, existindo uma associação entre o número de casos humanos identificados e a prevalência da tuberculose na população bovina local (Abrahão, 1999). Após a pasteurização do leite, no início do século XX, a incidência de tuberculose induzida pelo *M. bovis* apresentou grande queda (Rua-Domenech, 2006), mas os registros de tuberculose causada por este agente têm sido descritos entre indivíduos idosos e imunocomprometidos, provavelmente, devido à reativação de infecções primárias latentes ou por contato com reservatórios deste patógeno (Grange, 2001; Rua-Domenech, 2006; de Kantor et al., 2008; Rodriguez et al., 2010). Além disso, a transmissão do bacilo bovino de humano para humano também tem sido notificada (Torgerson, 2008; Shrikrishna et al., 2009). Desta forma, ambas as espécies, *M. bovis* e *M. tuberculosis*, possuem grande importância clínica para a saúde pública.

Devido à dificuldade dos laboratórios em isolar e diferenciar o agente etiológico causador da patologia, a fração de humanos acometidos com tuberculose atribuída à infecção por *M. bovis*, nos países em desenvolvimento, ainda é amplamente desconhecida, embora se espere que seja mais elevada do que nos países desenvolvidos (Cosivi et al., 1998; Ayele et al., 2004). No Brasil, não existe um programa específico para o controle da tuberculose bovina; essa atividade está inserida num programa genérico denominado Programa de Controle das Doenças Animais, desenvolvido pelo Ministério da Agricultura, Secretarias Estaduais de Agricultura e entidades afins. Entre os fatores que dificultariam a implantação do programa de controle encontra-se a dimensão do rebanho bovino brasileiro, o maior rebanho comercial do mundo.

1.3 Gênero *Mycobacterium*

O gênero *Mycobacterium* é composto por bactérias na forma de bacilo, não-esporulantes, álcool-ácido resistentes e imóveis, apesar de relatada mobilidade para

as espécies *M. smegmatis* e *M. avium* (Barrera, 2007). Sua parede celular é rica em lipídeos tornando-a hidrofóbica, além de ser responsável por muitas das características desse gênero como antigenicidade, crescimento lento, resistência a colorações laboratoriais simples, álcool, ácidos, detergentes e antibióticos comuns. Em condições favoráveis, o *M. tuberculosis* divide-se a cada 12 a 16 horas, o que explica o fato do desenvolvimento de doença crônica (Kaufmann e Andersen, 1998).

O gênero *Mycobacterium* é composto por dois grandes complexos denominados, complexo *M. tuberculosis* e complexo *M. avium*. O complexo *M. tuberculosis* é constituído de várias espécies, dentre elas, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. prinnipedii* e *M. microti*. A tabela 1 mostra a classificação taxonômica do gênero *Mycobacterium*.

Tabela 1 - Classificação taxonômica dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*.

Reino	Bactéria	
Filo	Actinobacteria	
Classe	Actinobacteria	
Subclasse	Actinobacteridae	
Ordem	Actinomycetales	
Subordem	Corynobacterineae	
Família	Mycobacteriaceae	
Gênero	Mycobacterium	
Espécies	<i>M. tuberculosis</i>	Complexo <i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. bovis</i>	
	<i>M. africanum</i>	
	<i>M. Canetti</i>	
	<i>M. caprae</i>	
	<i>M. prinnipedii</i>	
	<i>M. microti</i>	
	<i>M. avium-avium</i>	Complexo <i>M. avium</i> (MAC)
	<i>M. avium-intracellulare</i>	
	<i>M. avium-paratuberculose</i>	
	<i>M. avium-silvaticum</i>	

Fonte: Baseado em Barrera (2007)

Estudos genéticos recentes propõem uma via evolutiva para micobactérias do complexo *M. tuberculosis*, baseada em pequenas regiões do cromossomo e em sequências polimórficas de genes selecionados. Por muitos anos, acreditava-se que o *M. bovis* poderia ser o progenitor da espécie *M. tuberculosis*. Porém, análises de regiões do genoma micobacteriano denominadas regiões de diferenças (RD) sugerem que *M. bovis* não é o progenitor de *M. tuberculosis*. Isto porque foi encontrada uma ampla linhagem de *M. tuberculosis* que antecedia as linhagens de *M. bovis* (Gordon et al., 2009). Hughes et al. (2002) basearam-se na observação de ampla diversidade de nucleotídeos em um pequeno grupo de um *loci*, o que os levou a postular que a linhagem *M. tuberculosis* emergiu há aproximadamente 35.000 anos atrás (Hughes et al., 2002). Por outro lado, cepas de *M. bovis* pertencem a uma linhagem comum a *M. africanum* e *M. microti*. Esta linhagem é caracterizada por deleção da região RD9, e por subsequente perda de RD7, RD8 e RD11 (Figura 1) (Brosch et al., 2002).

Figura 1. Esquema da via evolutiva proposto para os bacilos da tuberculose. Esta figura ilustra perdas sucessivas de regiões de diferenças no genoma micobacteriano representado pelas caixas cinzas.
Fonte: Gordon et al.(2009).

O *M. bovis* e o *M. tuberculosis*, por exemplo, possuem 99,95% do genoma idêntico em nível de nucleotídeo (Garnier et al., 2003). Apesar das semelhanças, estas duas espécies mostram consideráveis diferenças em suas propriedades biológicas como, por exemplo, o hospedeiro. O *M. tuberculosis* tem como hospedeiro natural o humano, já o *M. bovis* possui como reservatórios animais silvestres, domésticos e humanos (Matthias, 1998). Outra diferença é a forma de transmissão, onde o *M. tuberculosis* é transmitido principalmente por aerosol, enquanto o *M. bovis* pode ser transmitido por produtos derivados de animais, bem como por aerosol (Ayele et al., 2004).

As micobactérias apresentam seu envelope celular composto por uma membrana plasmática, uma parede celular e uma camada externa semelhante à cápsula não aderida. Esta pseudocápsula se faz presente na estrutura da *M. tuberculosis* durante o crescendo em meio líquido ou dentro das células humanas. Em condição de estresse fisiológico esta pseudocápsula desprende-se da parede bacteriana. Estudos sugerem que este componente presente na superfície bacteriana seja protetor e bioativo (Barrera, 2007).

A parede celular é típica de uma bactéria gram-positiva, composta por uma camada interna de peptideoglicanos (PG), conferindo forma e integridade estrutural à bactéria. Esta camada de PG encontra-se covalentemente ligada a um polissacarídeo ramificado, a arabinogalactana, esterificadas em sua porção externa com ácidos graxos de alto peso molecular, os ácidos micólicos. Os ácidos micólicos específicos do *M. tuberculosis* estão na conformação alfa, beta, ceto e metoximicolatos. A camada externa é recoberta por lipídeos livres, como pitioglicerol dimicoserato (PDIM), glicolipídeos fenólicos (PGL), polipeptídeos e lipoproteínas (Barrera, 2007). As cadeias de peptídeos presentes na camada externa da parede correspondem a 15% de seu peso e consiste em importantes antígenos.

Outros lipídeos e glicolipídeos estão associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria, sendo muitos destes potentes moduladores das funções dos macrófagos e DCs como, por exemplo, o lipoarabinomanana (LAM). O complexo *M. tuberculosis* apresenta alteração na molécula de LAM estando esta manossilada, sendo denominada Man-LAM (do inglês, *Mannosylated Lipoarabinomannan*) (Figura 2) (Glickman e Jacobs Jr, 2001; Barrera, 2007).

Figura 2. Representação do envelope celular de *M. tuberculosis*.

Fonte: Baseado em Riley (2006).

1.4 Virulência micobacteriana

A capacidade de um microrganismo persistir no hospedeiro é conferida por fatores ligados à virulência do patógeno, permitindo a evasão do sistema imune e a sua proliferação (Kaufmann, 2001b). Tais fatores envolvidos em mecanismos de reprogramação transcricional, baixo metabolismo catalítico e capacidade imunomoduladora são responsáveis pelo sucesso do *M. tuberculosis* em adaptar-se ao hospedeiro (Sachdeva et al., 2010). O sequenciamento completo do cromossomo circular da cepa H37Rv de *M. tuberculosis* em 1998 por Cole et al. (1998) foi de suma importância para auxiliar a compreensão acerca da patogenia induzida pelo complexo *M. tuberculosis* (Cole e Barrell, 1998; Cole et al., 1998).

A identificação de genes envolvidos na regulação da virulência micobacteriana se faz importante para o entendimento de mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da doença, bem como para a elaboração de

novos quimioterápicos. A definição de fatores de virulência pode ser controversa e irá depender do tipo de abordagem experimental utilizada. Do ponto de vista do patógeno a virulência pode ser determinada pelo número de organismos requeridos para estabelecer uma infecção, taxa de crescimento bacteriano, disseminação, persistência crônica e transmissibilidade. Do ponto de vista do hospedeiro a virulência pode ser verificada pela suscetibilidade a infecção, patologia tecidual, severidade dos sintomas da doença, taxa de progressão da doença e frequência de mortalidade. Sendo assim, o conhecimento de alguns desses fatores pode auxiliar no *screening* de virulência micobacteriana (Cosma et al., 2003).

O complexo *M. tuberculosis* não possui fatores de virulência clássicos como os que promovem doença induzida por outros patógenos, por exemplo, toxinas produzidas por *Corynebacterium diphtheriae*, *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella dysenteriae*, e *Vibrio cholerae*.

A regulação da expressão gênica é crucial para determinar a manutenção da virulência micobacteriana. A expressão gênica na bactéria é regulada primariamente ao nível de iniciação transcricional conferida por holoenzimas RNA polimerase (RNAP, do inglês, *RNA Polymerase*) (Sachdeva et al., 2010). Esta holoenzima é formada por 5 subunidades e uma subunidade dissociável denominada subunidade sigma (σ). O fator σ é responsável por muitos dos determinantes responsáveis pela especificidade promotora da RNAP. Foi descrito que a expressão diferencial e temporal de reguladores controlados pela indução de um ou mais fatores σ permitem ao *M. tuberculosis* manter-se por múltiplos estágios de interação com o hospedeiro, incluindo adesão, invasão, replicação intracelular e disseminação para outros órgãos (Smith, 2003). O *M. tuberculosis* possui 13 fatores σ , sendo o fator sigma A (SigA, σ^A) o mais importante. Este fator é indispensável para o crescimento micobacteriano. A descoberta do efeito destes reguladores e do papel efetor de cada gene foi possível através do desenvolvimento de mutantes deficientes para estes fatores ou para moléculas codificadas por eles ou ainda por superexpressão dos mesmos. Desta forma foi possível verificar que bacilos deficientes para o fator σ^A apresentavam atenuação da virulência, sendo o fator σ^A incapaz de interagir com o fator de transcrição acessório WhiB3. A inativação do gene *WhiB3* leva à perda da virulência em modelos animais, porém sem afetar a capacidade de crescimento do

bacilo (Steyn et al., 2002; Wu et al., 2004).

Outros fatores σ também são importantes para a manutenção da virulência tais como: SigB, responsável por regular a expressão de ESAT-6 (do inglês, *6-kDa Early-secreted Target Antigen*), proteína ribossomal 50S, proteínas da família PE, cetoacil sintase e algumas proteínas reguladoras de transcrição, como WhiB2, IdeR e o próprio σ^B ; SigE não é essencial para o crescimento micobacteriano, mas sua deleção aumenta a suscetibilidade ao estresse oxidativo e resistência à pH ácido; SigH e SigC são responsáveis por manutenção de funções extracitoplasmáticas, sendo descrito por mediar a transcrição de genes envolvidos na expressão de proteínas *heat-shock*, além de gerar imunopatologia (Cosma et al., 2003).

A RD-1 é uma região do genoma micobacteriano responsável por codificar fatores intrínsecos à virulência micobacteriana (Guinn et al., 2004). Análises comparativas do genoma de H37Rv e H37Ra cepas virulenta e avirulenta de *M. tuberculosis*, respectivamente, e *M. bovis* virulenta e *M. bovis* atenuada (BCG), possibilitaram constatar a importância desta região para manutenção da virulência ao longo da evolução. Esta região é responsável por codificar as proteínas ESAT-6 e CFP-10 (do inglês, *10-kDa Culture Filtrate Protein*), consideradas de alta imunogenicidade (Ganguly et al., 2008). Foi observado que a cepa BCG não possuía a região RD-1 em comparação com as cepas virulentas, porém quando inserida esta região no genoma da BCG, a virulência era restaurada. Por outro lado, a eliminação do RD-1 na cepa virulenta H37Rv resultou na redução do crescimento intracelular em macrófagos humanos e induziu baixo crescimento nos pulmões, patologia branda, sendo observada redução de regiões de necrose, e consequentemente baixa mortalidade (Pym et al., 2002; Lewis et al., 2003; Guinn et al., 2004; Sherman et al., 2004; Junqueira-Kipnis et al., 2006).

Diversos estudos acerca do papel destas proteínas foram desenvolvidos. Por exemplo, foi descrito que a CFP-10 é capaz de diminuir a produção de ROS o que leva ao aumento da atividade de fosfatases (SHP-1 e SHP-2) nos macrófagos, culminando na desfosforilação de proteases ativas (Ganguly et al., 2008). O ESAT-6 pode ser reconhecido na superfície dos macrófagos via ligação com o receptor TLR-2 (do inglês, *Toll-like receptor-2*) e inibir a ativação de fatores de transcrição regulados por IFN- γ (Interferon-gama) e NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor κ B*)

(Ganguly et al., 2008). Recentemente, foi descrito que o ESAT-6 é capaz de formar poros na membrana da célula infectada, além de induzir a ativação de sinais inflamatórios ao estimular a formação do complexo inflamassoma e, consequentemente, secreção de IL-1 β (Mishra et al., 2010). A produção do IL-1 β , por sua vez, é capaz de induzir a maturação do fagossoma (Mishra et al., 2010), porém a fusão do endossoma com o lisossoma é inibida devido ao recrutamento da proteína coronina-1 (Pieters, 2001; Jayachandran et al., 2007; Jayachandran et al., 2008). Além disso, o ESAT-6 pode induzir a translocação da micobactéria do endossoma para o citosol, sendo, portanto, mais um mecanismo de escape da resposta microbicida induzida pelo macrófago (van der Wel et al., 2007).

Fatores lipídicos micobacterianos também são responsáveis por aumentar a virulência dos bacilos. No *M. tuberculosis*, 30% do genoma é locado para a síntese de lipídeos e para o metabolismo (Guenin-Mace et al., 2009). Tem sido descrito que lipídios expressos na superfície das micobactérias são responsáveis por modular a resposta imune. O lipoarabinomana é incluído na lista de fatores de virulência por causa de sua importância como potencial imunomodulador. A adição de LAM na cultura de macrófagos murinos induz o bloqueio da expressão de genes induzidos por IFN- γ (Chan et al., 1991). No gênero *Mycobacterium*, as moléculas de LAM estão expressas de diferentes formas. Por exemplo, no complexo *M. avium*, diferente do complexo *M. tuberculosis*, o LAM não está presente na forma manosilada (Guenin-Mace et al., 2009). O Man-LAM de *M. tuberculosis* tem sido mostrado inibir a maturação fagossomal (Fratti et al., 2001; Fratti et al., 2003). O LAM é liberado dentro dos fagossomas e se intercala em várias endomembranas do macrófago infectado (Ullrich et al., 2000). Esta inserção é essencial para o bloqueio da maturação do endossoma (Welin et al., 2008).

Modelos experimentais de infecção micobacteriana *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para determinar o impacto destes fatores de virulência na patogenia da tuberculose. Muitas variações no nível de virulência têm sido observadas em isolados clínicos de *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Em infecção de camundongos com isolados clínicos de *M. tuberculosis*, de diferentes genótipos, foi observado que o genótipo *Beijing* apresenta alta virulência, sendo verificado maior contagem de bacilos no pulmão, ampla lesão tecidual e baixa sobrevivência dos animais

(Dormans et al., 2004). Lasunskaja et al. (2010) mostraram que existem diferenças entre cepas do genótipo *Beijing* isolados de pacientes na Rússia e Brasil. Neste estudo, foi observado que as cepas que circulam na Rússia apresentam genótipo moderno quando comparado com as cepas circulantes no Brasil, que apresentam genótipo ancestral. Os isolados de genótipo *Beijing* modernos (Rússia) apresentaram maior virulência quando comparado com os isolados ancestrais (Brasil), em relação à capacidade de crescimento em macrófagos, indução de morte celular e capacidade de modulação da ativação dos macrófagos. Assim, cepas emergentes de genótipo *Beijing* circulantes na Rússia expressam características padrões associadas com o aumento da virulência, favorecendo a disseminação clonal.

Acredita-se que a emergência, persistência e o aumento da virulência do genótipo *Beijing* possam ser atribuídos à seleção natural das cepas, possivelmente devido à vacinação com BCG, tratamento com quimioterápicos e alta frequência mutacional, respectivamente (Parwati et al., 2010).

1.5 Resposta imune contra micobactérias

A resposta imune contra micobactérias é predominantemente mediada por células. A contaminação ocorre principalmente através da inalação de partículas infecciosas que ficam em suspensão no aerossol. Chegando ao interior dos pulmões, os bacilos se alojam no trato respiratório, onde entram em contato com as células residentes, infectando os macrófagos alveolares e as DC (Kobzik, 1999). Após a infecção o bacilo pode ser eliminado, entrar em estado de latência, ou ainda desencadear uma infecção disseminada. Este quadro pode evoluir para uma doença aguda, podendo levar o indivíduo à morte. Uma vez que o indivíduo portador de infecção latente sofra uma queda de vigilância imunológica como, por exemplo, após o desenvolvimento da AIDS tornando-se imunocomprometido, poderá ocorrer a reativação da infecção, seguida de proliferação e disseminação dos bacilos (van Crevel et al., 2002).

Os macrófagos possuem um ciclo vital longo, o que permite a ocorrência de muitas fases de replicação, visto o crescimento lento do bacilo (Clemens, 1996). A

entrada do patógeno nas células fagocíticas envolve processos de interações específicas receptor-ligante. PRRs (do inglês, *Pattern-Recognition Receptors*) são receptores expressos nas células do sistema imune que podem reconhecer moléculas padrões de microrganismos (PAMPs – do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) como, por exemplo, LPS (lipopolissacarídeo), PG, CpG, dentre outros. Os principais receptores descritos como importantes na interação do macrófago e a micobactéria são os receptores de complemento CR1, CR3 e CR4, receptores de manose (MR, do inglês *Mannose Receptor*), receptores Fc, receptores scavenger, CD14, receptores *TLR-2* e *-4*, receptores de lectina tipo-C, molécula de adesão intercelular de DC (DC-SIGN, do inglês, *Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin*) e Dectina-1.

Os receptores NODs (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) são PRRs encontrados no citosol das células fagocíticas, que reconhecem PG bacterianos e medeiam uma via de sinalização celular independente de TLR. Estes receptores citoplasmáticos levam à produção de α 4-defensinas, as quais funcionam como “antibióticos naturais”, com propriedade bactericida contra micobactérias (Hargreaves e Medzhitov, 2005). Após o reconhecimento micobacteriano, observa-se a reorganização do citoesqueleto, que seria importante para a manutenção da motilidade dos macrófagos e indução de fagocitose (Lasunskia et al., 2006).

Como consequência da ativação dos macrófagos após o reconhecimento do bacilo, é observada secreção de mediadores inflamatórios incluindo as interleucinas IL-1, IL-6 e IL-12, TNF- α (do inglês, *Tumor Necrosis Factor-alpha*) e GM-CSF (do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*), bem como as quimionas IL-8 e RANTES (do inglês, *Regulated Upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted*), que facilitam o recrutamento de linfócitos e monócitos para os pulmões. Além de mediar a secreção de citocinas e quimiocinas, os macrófagos promovem a secreção de fatores microbicidas tais como intermediários reativos de oxigênio (ROI, do inglês, *Reactive Oxygen Intermediate*) e intermediários reativos de nitrogênio (RNI, do inglês, *Reactive Nitrogen Intermediate*) (Kaufmann, 2001a).

Por outro lado, para sua sobrevivência nos macrófagos, os bacilos modificam a composição do fagossoma quanto à sua interação com outras organelas da célula

hospedeira. O bloqueio da maturação do fagossoma, ao longo da via endossoma-lisossoma, ocorre a fim de evitar a fusão do fagossoma com o lisossoma, residindo o bacilo, portanto, num compartimento com as características de um endossoma. Estas modificações estão associadas com alterações na expressão de proteínas presentes no fagossoma, incluindo alterações na composição da Rab GTPase, exclusão da próton ATPase vacuolar com consequente falta de acidificação do fagossoma e retenção da proteína coronina-1 (também denominada TACO) (Sturgill-Koszycki et al., 1994; Glickman e Jacobs Jr, 2001; Pieters, 2001; Jayachandran et al., 2007; Jayachandran et al., 2008).

As DCs reconhecem as micobactérias via receptores de lectina tipo-C e DC-SIGN, internalizam, processam e apresentam os antígenos protéicos via molécula de classe II do MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) ou antígenos não-protéicos via molécula CD1, para células T (Guenin-Mace et al., 2009). Após o reconhecimento da bactéria as DCs se desprendem do tecido e migram para os linfonodos, passando por processo de maturação onde passam a expressar em sua superfície moléculas co-estimulatórias (B7.1/CD80 e B7.2/CD86), que promoverão o segundo sinal de ativação das células T. As DCs, assim como os macrófagos, servem como uma ponte entre a imunidade inata e a imunidade adquirida (Smith, 2003).

As células T CD4⁺ ativam os macrófagos através da produção de IFN- γ , aumentando a resposta microbicida, além de promover a indução de resposta granulomatosa (Orme, 1987; Orme et al., 1992; Flynn et al., 1993). Estudos indicam que as células T CD8⁺ podem ser ativadas através de um processo denominado apresentação cruzada. Neste processo vesículas contendo antígenos micobacterianos, muitas vezes oriundas de células apoptóticas, são fagocitadas pelos macrófagos, processadas, e os peptídeos antigênicos apresentados na superfície via molécula de classe I do MHC. As células T CD8⁺ contribuem na defesa contra o *M. tuberculosis*, principalmente, através da produção de IFN- γ e da lise das células infectadas mediada por Fas (do inglês, *TNF Superfamily Member 6*) FasL (do inglês, *TNF Superfamily Member 6 Ligand*) ou perforina/granzima (Canaday et al., 2001; Ferraz et al., 2006). Bonato et al. (2004) mostraram ainda que a vacina terapêutica pHSP-65 (do inglês, *Heat-Shock Protein 65 Mycobacterium leprae Gene*)

é capaz de induzir ativação significativa das células T CD8⁺ no pulmão de camundongos infectados com *M. tuberculosis*, contribuindo para o aumento da produção de IFN- γ e, conseqüentemente, a diminuição da proliferação bacilífera (Bonato et al., 2004). A subpopulação de células Th17 (do inglês, *T helper*) vem ganhando importância no estudo acerca da ativação da resposta imune contra micobactérias. Esta subpopulação é capaz de secretar IL-17 e quimiocinas KC/CXCL1 e MIP-2/CXCL2, que participam do recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção (Khader e Cooper, 2008). A IL-17 parece ter suma importância na formação dos granulomas em resposta à infecção por *M. bovis* BCG (Umemura et al., 2007; Okamoto Yoshida et al., 2010). Outra característica importante a ser ressaltada é a regulação negativa entre as subpopulações linfocitárias Th17 e Th1. Os linfócitos Th17 estimulam a população Th1 a aumentar a secreção de IFN- γ . Por sua vez, quando há o aumento da população de linfócitos Th1, esta regula negativamente a frequência da população de linfócitos Th17 e, conseqüentemente, a diminuição da secreção de IL-17 é observada, sendo esta dependente IFN- γ (Cruz et al., 2006).

A formação de granulomas na fase crônica da infecção pulmonar contribui para manutenção do crescimento estável micobacteriano e para prevenir o crescimento latente do bacilo. Sua estruturação se dá, principalmente, por meio do recrutamento de células T, macrófagos e DCs, dentre outras populações celulares, para o local da inflamação. Neste local, elas formam um arcabouço circunscrito, composto por macrófagos e células gigantes multinucleadas infectados na região central e, principalmente, linfócitos na periferia (Saunders et al., 1999; Feldmann e Maini, 2001). O papel do TNF- α na resposta granulomatosa à infecção pelo *M. tuberculosis* foi evidenciado com o aumento da reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide submetidos à terapia com anticorpos anti-TNF- α , sendo, portanto, esta citocina de suma importância para formação e manutenção da estrutura granulomatosa (Holckmann, 2001). O aparecimento de muitos granulomas circunscritos ou até mesmo difusos no pulmão pode gerar o comprometimento deste órgão, devido à ampla área com necrose, com formação de cavidades, levando o indivíduo à morte por disfunção pulmonar.

Estudos visando avaliar a relação entre virulência micobacteriana e aspectos

relativos à ativação da resposta imune têm sido desenvolvidos (Dormans et al., 2004; León et al., 2009; Hernandez Pando et al., 2010; Martins de Sousa et al., 2010). No estudo acerca da patogenia gerada na infecção pelo *M. avium*, em modelo murino de infecção, nosso grupo verificou que isolados com perfis indistinguíveis de DNA *fingerprint* por RFLP (do inglês, *Restriction Fragment Length Polymorphism*) IS1245 (do inglês, *Insertion Sequence*) e IS901 e PRA-*hsp65* (do inglês, *PCR Restriction Enzyme Analysis of hsp65*) e epidemiologicamente não relacionados, apresentaram diferentes capacidades em modular a resposta imune, disseminar e crescer no meio intracelular (Amaral et al., 2010).

Porém, pouco é conhecido a respeito da relação entre a virulência/patogenicidade e capacidade imunomoduladora de isolados clínicos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. bovis* e *M. tuberculosis*) e como esta modulação da resposta imune pode contribuir ou não para a proteção do hospedeiro.

2 OBJETIVOS

Visando contribuir para a investigação acerca da importância epidemiológica da tuberculose, tanto em humanos quanto em animais, nos propusemos a averiguar a capacidade imunomoduladora induzida por isolados clínicos pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* em camundongos.

Objetivos específicos:

- Avaliar o grau de virulência de isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, quantificando o crescimento da bactéria, severidade de histopatologia e taxa de mortalidade dos camundongos;
- Avaliar a importância do IFN- γ *in vivo* na ativação da resposta imune contra o patógeno;
- Analisar a produção de citocinas tais como TNF- α , IL-12, IL-10, IL-4, IL-17, IFN- γ e NO por células obtidas do pulmão dos camundongos infectados com os isolados clínicos e a cepa referência H37Rv.
- Avaliar o crescimento intracelular do bacilo e capacidade citotóxica em macrófagos murinos *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os camundongos IFN- γ KO e o parental C57BL/6 livres de germes, adquiridos do Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), foram infectados e mantidos em microisoladores (estantes ventiladas) no biotério de Biossegurança nível 3, Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (Campos/RJ), sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia.

O projeto de avaliação de virulência das cepas do complexo de *M. tuberculosis* utilizando modelo animal dos camundongos foi aprovado pelas Comissões de Ética de Pesquisa em Animais de Laboratório e de Biossegurança da Universidade Estadual do Norte Fluminense e pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do ICB-USP.

3.2 Analgesia

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Anazedan - xilazina (15 mg/kg – Vetbrands) e Dopalen - ketamina (110 mg/kg - Vetbrands). Os anestésicos foram diluídos em solução salina estéril e aplicados, em temperatura ambiente, uma alíquota de 90 μ L via intraperitoneal. Em torno de 2 minutos após a administração do mesmo, são feitos testes de reflexos, para certificar o procedimento e logo executado o procedimento de traqueostomia.

3.3 Crescimento bacteriano

Os isolados de *M. bovis*, B2 e MP287/03, foram gentilmente cedidos pela Dr^a. Eliana Roxo (Instituto Biológico/SP) e pelo Dr. José Soares Ferreira Neto (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP), respectivamente, e a vacina de BCG (vacina onco-BCG viva, cepa Moreau, Copenhagen SEED#July, 1978) cedida pelo Instituto Butantan/SP. A cepa de *M. tuberculosis* H37Rv foi gentilmente cedida pelo Dr. Philip Suffys (FioCruz/RJ) e o isolado clínico de genótipo *Beijing* 1471 foi obtido de estudo de genotipagem de pacientes de hospitais especializados em tuberculose

no nordeste da Rússia (*St. Petersburg Research Institut of Phthisiopulmonology*) (Narvskaya et al., 2005).

Foram retiradas colônias do meio Middlebrook 7H10 Ágar suplementado com meio de enriquecimento OADC (oleato, albumina, dextrose e catalase - *Difco Laboratories*) e suspensas em meio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, USA), acrescido de 0,05% Tween 80 e suplemento ADC (albumina, dextrose, catalase – *Becton Dickinson*) durante 7 dias com agitação diária e congeladas em alíquotas de 1 ml (10^7 a 10^8 bactérias) em $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para execução dos experimentos, as bactérias foram retiradas do -70°C , descongeladas e adicionadas em meio Middlebrook 7H9 acrescido 10% de meio de enriquecimento ADC. A cultura em suspensão foi agitada no vórtex e sonicada em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto para dispersão dos grumos (Fattorini et al., 2002). A cultura, foi incubada em estufa à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 5% de CO_2 por 7 dias.

3.4 Viabilidade bacteriana

Para avaliação da viabilidade foi usado o método bacteriológico de contagem de células em meio sólido, ensaio UFC (**U**nidade **F**ormadora de **C**olônia).

Para dosagem do número de bactérias a serem utilizadas, foi feita a leitura espectrofotométrica (Hitachi – model U-1100) com o comprimento de onda de 600nm, após passagem no ultrassom.

Com a relação prévia da densidade óptica *versus* número de bacilos (DO 0,066 ~ 2×10^7 bacilos *Mbv*/ml e 0,100 ~ 10^7 bacilos *Mtb*/ml), foram então feitas diluições seriadas da cultura em PBS 1X, sendo, portanto, plaqueada a alíquota de 50 μL das diluições desejadas em placas de Petri contendo Ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com OADC, sendo estas incubadas por 24 dias em estufa à 37°C e 5% de CO_2 .

3.5 Preparação do lisado de *M. bovis* BCG

Foram centrifugados 50 ml de cultura de *M. bovis* a 4 °C por 45 minutos a 3650 g. O sobrenadante foi descartado e adicionado ao *pellet* 12 ml do tampão de lise. O tubo contendo os bacilos foi congelado no nitrogênio e descongelado a 37 °C, sendo este procedimento repetido por 12 ciclos. Após esta etapa, a solução foi sonicada por 10 minutos a 100Hz e centrifugada novamente a 4 °C por 45 minutos a 3650g. A concentração de proteínas foi quantificada pelo Método de Bradford.

3.6 Infecção dos camundongos

Os animais foram infectados com $\sim 10^2$ bacilos/60µl para cada grupo por via intratraqueal. Foram utilizados como controle negativo animais inoculados com salina e controle da infecção '*sham*' (animais traqueostomizados).

Foram averiguados os seguintes parâmetros: número de unidades formadoras de colônias (UFC), alterações teciduais e celulares no pulmão, fígado e baço, produção de citocinas por células pulmonares *ex vivo* e mortalidade.

Para as análises os animais foram sacrificados por deslocamento cervical nos dias 0, 5, 15, 28 e 60 após a infecção.

3.7 Histologia

3.7.1 Método de Coloração com Hematoxilina-eosina

Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão, baço e fígado foram destinados para análises histológicas. Desta forma, os órgãos foram fixados por 48 h em formol 10% tamponado, seccionados de forma a aproveitar o máximo da área tecidual lesionada e, embebidos novamente em formol 10% tamponado por 24 h.

Os materiais já fixados foram lavados por 30 minutos com água destilada e, a seguir, passados por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada concentração e, então, passados por dois banhos contendo xilol por 1 h cada, estando estes, preparados para a inclusão em parafina por 30 minutos.

Após o procedimento do Histotec (fixação e clarificação), as peças foram emblocadas em parafina e levadas ao gelo. Os blocos dos materiais já rígidos foram, então, clivados no micrótomo (Leica, Germany) numa espessura de 5 µm.

Os cortes foram banhados em duas baterias de xilol por 3 minutos cada, logo banhados em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 minuto para cada concentração, para então serem corados com hematoxilina por 3 minutos e eosina por 50 segundos, sendo estes banhados novamente em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes foram fixados com Permount.

3.7.2 Método de Ziehl-Neelsen

- **Em tecidos:**

Os órgãos foram fixados, clivados e emblocados como descrito no item 3.7.1.

A amostra devidamente lavada foi imersa em solução aquecida de Carboxi-fucsina por 30 minutos. O material foi bem lavado com água corrente e então gotejado com álcool-ácido 1% até a amostra tornar-se rosa pálido. A amostra foi lavada novamente em água corrente por 8 minutos, com posterior imersão em azul de metileno (10 ml da solução estoque (1,4 g de azul de metileno + 100 ml de álcool etílico 95%) + 90 ml de água destilada). Os cortes foram fixados com Permount.

As análises dos cortes foram executadas com auxílio do prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Patologista Clínico do Laboratório de Sanidade Animal, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos/RJ.

- **Em cultura celular:**

Após a infecção dos macrófagos com as micobactérias, as lamínulas foram fixadas ao fogo por 5 segundos, cobertas com fucsina de Ziehl (1% fucsina básica, 5% fenol cristalino, 10% álcool 95% em água destilada) e aquecidas até a emissão de vapores por 5 minutos, para permitir a entrada do corante através da parede celular das micobactérias álcool-ácido resistentes. O corante foi eliminado pela lavagem das lamínulas em água corrente de baixa pressão. As lamínulas foram mergulhadas na solução descorante (97% álcool etílico 95%, 3% ácido clorídrico

concentrado) durante 1 minuto e depois foram lavadas em água corrente de baixa pressão, para eliminar o descorante. Foram coradas com azul de metileno (0,5% azul de metileno, verde malaquita ou ácido pícrico em água destilada) por 30 segundos, lavadas em água corrente de baixa pressão e secas ao ar. Após os procedimentos, as lâminas foram fixadas com Permout e observadas no microscópio óptico (Axioplan Zeiss, Germany) com a técnica de campo claro e as imagens obtidas, analisadas com auxílio do programa *Axiovision*.

3.8 Obtenção dos bacilos e células presentes no pulmão

Para a obtenção de bacilos presentes no pulmão, foi coletado o lobo superior esquerdo, pesado, e colocado em 2 ml de meio RPMI-incompleto (Gibco, USA). Com o auxílio de pinças curvas, este órgão foi macerado e mantido no gelo. Logo, foram acrescentados 3 ml de solução de digestão composta por 2 µg/ml de Liberase Blendzyme 2 (Roche, USA), 0,1 µg/ml de DNase de pâncreas bovino (Sigma, USA). A mistura foi incubada a 37°C e 0,5% CO₂, por 40 minutos sob agitação. Os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10 ml, por 10 ciclos de homogeneização. A seguir, a amostra foi filtrada em *cell strainer*. O homogeinato, agora sem matriz tecidual, foi destinado para dosagem de bactéria através de plaqueamento em meio 7H10. Foram feitas diluições seriadas dos 100µl de homogeinato e as soluções de interesse foram plaqueadas em meio 7H10+OADC. As placas foram lacradas e incubadas, por 24 dias, em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% CO₂. As células presentes no pulmão foram plaqueadas na concentração de 5x10⁵ células/ml para quantificação da produção espontânea de citocinas *ex vivo*.

3.9 Cultura de células

As células foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 ou 75 cm² (Corning, USA) em meio Dulbecco's modificado F-12 (DMEM F-12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco BRL) e 50 µg/ml de gentamicina (Gibco BRL) em estufa de CO₂ a 5% e 37 °C (Forma Scientific – *water-jacketed incubator*).

Para os experimentos, os macrófagos foram plaqueados na concentração de 3×10^5 /ml em placas de 96 poços (Costar, USA) em meio DMEM F-12 suplementado com 2% de soro fetal bovino, 24 horas antes da infecção.

3.9.1 Obtenção de precursores da medula óssea e diferenciação para macrófagos

Células derivadas da medula óssea dos camundongos foram coletadas assepticamente de ambos os fêmures com auxílio de tesoura e pinça e colocadas em 5 ml de meio DMEM-F12 acrescido de 10% SFB e 5% de gentamicina (20 µg/ml). A cultura foi mantida durante a noite na estufa a 37 °C e 5% CO₂, para seleção negativa das células já diferenciadas que aderem na placa. No dia seguinte foi coletado o sobrenadante, contendo os precursores mielóide da medula, e centrifugado a 1200 rpm por 5 min para sedimentar as células e retirar o meio contendo gentamicina. O *pellet* foi ressuspenso em 5 ml de meio de cultura (DMEM-F12 suplementado com 10% SFB) acrescido de 20% de meio condicionado da cultura de células da linhagem de fibroblastos L929, como fonte de M-CSF previamente coletado, centrifugado e armazenado a -20 °C. A cultura, contendo o meio de diferenciação celular, foi incubada na estufa a 37 °C e 5% CO₂.

Após 3 dias de incubação foram acrescidos 5ml de meio de cultura suplementado com sobrenadante das células L929 e novamente incubadas. No sétimo dia de diferenciação os macrófagos foram colocados em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB para execução do experimento.

3.9.2 Infecção dos macrófagos

Os macrófagos derivados da medula foram infectados com as cepas B2, MP287/03, BCG de *M. bovis*, e H37Rv e *Beijing* 1471 de *M. tuberculosis*, na razão 1:1, 10:1, e 50:1 bactérias:macrófago (MOI). Após 3 horas de contato, a cultura foi lavada 3x com PBS 1X estéril e adicionado meio DMEM F-12 suplementado com 2% de SFB. A padronização da dosagem das micobactérias foi feita em espectrofotômetro (Modelo U-1100 - Hitachi, USA) em DO 600 nm como descrito no item 3.3 e 3.4.

3.9.2.1 Avaliação da viabilidade dos macrófagos nas culturas infectadas com *M. bovis* e H37Rv

Os macrófagos foram cultivados em placas de 96 poços e infectados com as micobactérias, como descrito nos itens 3.9.1 e 3.9.2. Amostras dos macrófagos controles e infectados foram coletadas diariamente, do 1º ao 6º dia após a infecção, para análise da cinética de crescimento micobacteriano.

Para avaliar a viabilidade dos macrófagos, a cada dia após a infecção, as células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídeo (50 mg/ml) e quantificadas em microscópio invertido de fluorescência (Nikon, Japan).

3.9.2.2 Avaliação do crescimento micobacteriano nos macrófagos infectados

Para avaliar o crescimento intracelular das micobactérias, utilizamos o método bacteriológico de contagem de unidades formadoras de colônias.

O crescimento micobacteriano foi avaliado nos seguintes pontos:

- Dia 0 – após a troca de meio da cultura para meio fresco, depois do período de incubação de 3 horas;
- Dia 3 – no terceiro dia de infecção;
- Dia 6 – no sexto dia de infecção.

As células infectadas com MOI 1:1 foram lisadas com solução de saponina a 0,1% durante 10 minutos. Foram lisadas células de dois poços para cada cepa estudada. O conteúdo dos poços foi homogeneizado vigorosamente e diluído em diferentes concentrações (10^{-1} e 10^{-2} no Dia 0; 10^{-1} e 10^{-2} no Dia 3; e 10^{-3} e 10^{-4} no Dia 6), sendo 40 µl (inóculo) de cada diluição, plaqueados em meio Middlebrook 7H10. Foram feitas duplicatas de cada amostra lisada.

As colônias foram quantificadas após 24 dias de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O número de UFC/ml foi obtido através da seguinte fórmula:

$\text{UFC/ml} = [(\text{n}^\circ \text{ de colônias} \times 1000) / \text{inóculo}] \times \text{diluição}$
--

3.9.2.3 Quantificação de NO pela Reação de Griess

Os sobrenadantes das culturas infectadas foram coletados em 24h e 72h após a infecção. A quantificação de NO foi feita pela reação de *Griess* (Green et al., 1982).

O volume de 50 µl foi misturado com 50 µl da solução A (2,5 ml de ácido fosfórico, 0,5 g de sulfanilamida, 47,5 ml de H₂O de milliQ) e solução B (0.05 g de N-1-naphitiletenodiamida, 50 ml de H₂O de milliQ) de Griess (vol/vol) numa placa de 96 poços e incubado por 10 minutos na estufa a 37 °C. A leitura foi feita em leitor de microplacas (MR5000 Dynatech, USA), no comprimento de onda de 540/570 nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de NaNO₃ de 200 µM a 1.56 µM.

3.10 Método de atividade microbica com o doador de NO – GSNO

As micobactérias foram cultivadas a D.O 0,100 em placas de 96 poços, contendo meio 7H9 suplementado com 10% ADC. Diferentes concentrações do doador de NO (GSNO) (Green et al., 2000; Venketaraman et al., 2005; Dayaram et al., 2006; Attarian et al., 2009), foram adicionados às culturas micobacterianas e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 24h. Para quantificação da atividade microbica foi utilizado o ensaio de redução de MTT (“3’-[4,5-*dimethylthiazol-2yl*] 2,5-*diphenyltetrazolium bromide*”).

3.10.1 Ensaio de redução de MTT

As culturas bacterianas foram incubadas a 37 °C durante 3 horas com 0,5 mg/ml (concentração no poço) da solução de MTT. O sal de *tetrazolium* é reduzido por enzimas desidrogenases presentes no sistema transportador de elétrons de microrganismos aeróbicos, facultativos e anaeróbicos e, convertido em cristais azuis insolúveis (formazana) (Kansal et al., 1998; Hatzinger et al., 2003). Após o tempo de incubação foi aplicado 100 µl tampão de lise bacteriana contendo 50% DMF (dimetilformamida), 20% SDS (dodecilsulfato de sódio) e água destilada estando a solução em pH 7,4, com posterior incubação a 37 °C e 5% CO₂ durante a noite (Gomez-Flores et al., 1995; Kansal et al., 1998). A densidade óptica foi medida com

o uso do leitor de microplacas com o filtro de 570 nm.

3.11 ELISA E BIOPLEX

Os sobrenadantes das culturas de BMDM oriundos do experimento *ex vivo*, foram coletados e mantidos congelados a -80 °C. As citocinas presentes nos sobrenadantes foram quantificadas através do ensaio ELISA *sandwich* utilizando *kits* correspondentes (Invitrogen, USA) e por Bioplex (Biorad, USA) utilizando o *Kit Fluorokine MAP Base murino (LUM000 - R&D Systems, USA)*. Foram quantificadas as citocinas por ELISA IL-12+p40 (CMC0123), IL-10 (CMC0103), IL-4 (CMC0043) e IFN- γ (BD OpTEIA 555138) e por Bioplex IL-1 β (LUM401), IL-6 (LUM406), TNF- α (LUM410), IL-17 (LUM421), IFN- γ (LUM485), IL-10 (LUM417), IL-4 (LUM404), IL-2 (LUM402), MCP-1 (LUM479) e IL-12p70 (LUM419). As citocinas foram quantificadas de acordo com o protocolo do fabricante.

3.12 Considerações metodológicas finais

Todo trabalho experimental foi executado em fluxo laminar nível II-BII de biossegurança e com todos os equipamentos de proteção individual, requeridos (jaleco de mangas compridas, jaleco descartável, luvas, máscara N-95, touca, sapatos fechados e pró-pés). Todo lixo produzido dentro do fluxo, juntamente com todo material contaminado, foi acondicionado em sacos de autoclave e descontaminado por 30 minutos a 120 °C e 1 atm.

3.13 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas baseadas nos métodos “Two-way ANOVA” e o Teste de Bonferroni como *post test*, sendo estes executados com auxílio do programa GraphPad Prism version 5.02 para o Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>.

4 RESULTADOS

Neste estudo, nos propusemos avaliar a relação entre o grau de virulência de isolados clínicos micobacterianos e a resposta imune desencadeada pelos mesmos. Assim, para obtenção dos perfis de virulência dos isolados clínicos utilizados neste estudo, foi necessário realizar um *screening* prévio com 10 cepas de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (*M. bovis* - AN5, B2, B29, MP287/03, MP389/3 e BCG; *M. tuberculosis* – *Beijing* zt272, LAM 1777, *Beijing* 1471 e H37Rv), sendo avaliadas características como citotoxicidade, crescimento intracelular em macrófagos murinos, crescimento em meio de cultura micobacteriana (7H9 Middlebrook) e mortalidade de camundongos (dados não mostrados). Vários experimentos também foram realizados a fim de obter a carga bacteriana necessária para realização dos experimentos *in vivo*.

4.1 Número de UFCs nos pulmões e sobrevivência de camundongos C57BL/6 infectados com isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*

Para avaliar a virulência dos isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, um dos parâmetros a ser averiguado é a capacidade de crescimento dos bacilos em modelos animais (Lopez et al., 2003; Dormans et al., 2004). Para tanto, camundongos C57BL/6 foram infectados pela via intratraqueal com a carga bacilar de $\sim 10^2$ bacilos. Para este estudo, foram utilizados os isolados clínicos B2 e MP287/03 de *M. bovis*, *Beijing* 1471 de *M. tuberculosis*, e a cepa H37Rv de *M. tuberculosis* como bacilo referência de virulência.

A cinética do crescimento dos bacilos nos pulmões dos camundongos infectados foi avaliada pela quantificação do número de UFCs. Os camundongos foram sacrificados nos intervalos de 0, 5, 15, 28 e 60 dias após a infecção (Figura 3A).

Os isolados clínicos inoculados apresentaram crescimento inicial similar nos pulmões dos camundongos, sendo observado aumento da carga bacteriana de aproximadamente 2 vezes $\text{Log}_{10}\text{CFU}$ em relação a carga inicial após 5 dias de infecção. Ampla diferença no crescimento dos isolados clínicos nos pulmões dos camundongos foi observada aos 28 dias de infecção (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise da carga bacilar nos pulmões dos camundongos infectados com isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*.

Dias após a infecção*	H37Rv CFU/g pulmão (Log ₁₀)	B2 CFU/g pulmão (Log ₁₀)	MP287/03 CFU/g pulmão (Log ₁₀)	Beijing 1471 CFU/g pulmão (Log ₁₀)
15	4.4±0.4	5.8±0.1	6.8±0.2	6.7±0.2
28	5.8±0.2	8.1±0.1	9.7±0.2	7.9±0.3

*n=9 camundongos por ponto

Cepa H37Rv, referência de virulência em destaque.

O isolado clínico MP287/03 mostrou maior capacidade de crescimento nos pulmões dos camundongos em comparação aos demais isolados em estudo, apresentando aumento de aproximadamente 5.1 vezes (Log₁₀) em relação à carga inicial de infecção. Por outro lado, o isolado clínico B2 e a cepa H37Rv apresentaram crescimento aos 28 dias de ~4.2 e ~3.0 vezes (Log₁₀) em relação à carga bacteriana inicial, respectivamente. O isolado clínico *Beijing* 1471 apresentou a taxa de crescimento de aproximadamente 4.2 vezes (Log₁₀) em relação à carga inicial. Apesar de similares as taxas de crescimento dos isolados *Beijing* 1471 e B2, apenas foi observado indução de cronicidade da infecção nos camundongos infectados pelo isolado B2 ao longo de 60 dias de infecção (Figura 3B). A reativação da infecção nos camundongos infectados com o isolado B2 foi observada aos 150 dias de infecção, sendo verificado o aumento do número de bacilos no pulmão e morte dos animais (dados não mostrados).

Figura 3. Cinética da carga micobacteriana nos pulmões e sobrevivência de camundongos infectados com *M. bovis* e *M. tuberculosis*. (A) Modelo do delineamento experimental de avaliação da virulência micobacteriana. (B) Camundongos C57BL/6 infectados via intratraqueal com $\sim 10^2$ bacilos de *M. bovis*, B2 (△) e MP287/03 (▼), *M. tuberculosis*, Beijing 1471 (◆) e H37Rv (○), e controle (□), foram sacrificados em 0, 5, 15, 28 e 60 dias após a infecção e o número de UFCs quantificado após plaqueamento em 7H10. As linhas indicam a média $\pm$ desvio padrão do número de UFCs de n=9 camundongos por ponto referentes a três experimentos independentes. (C) Os camundongos foram monitorados diariamente de acordo com a sua morbidade. Os asteriscos representam diferenças estatísticas dos camundongos infectados pelos isolados em relação aos infectados com a cepa H37Rv, e o símbolo ι indica diferença estatística entre os camundongos infectados com o isolado MP287/03 em relação aos infectados com o isolado B2. *** p<0.001; ι p<0.001;

Outro parâmetro avaliado foi a sobrevivência dos camundongos após a infecção. Os camundongos infectados com os isolados MP287/03 (n=9) e *Beijing* 1471 (n=4) apresentaram alta taxa de mortalidade, sendo observados 100% de mortalidade aos 35 e 40 dias após a infecção, respectivamente. Apesar da indução de infecção crônica nos animais, foram observados 100% de mortalidade do grupo de camundongos infectados com o isolado B2 (n=9) aos 172 dias após a infecção, provavelmente devido à reativação da infecção. Por outro lado, não foi observada mortalidade nos camundongos infectados com a cepa H37Rv (n=9) (Figura 3C).

Assim, pode-se concluir que os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentam maior grau de virulência do que o isolado B2, que por sua vez é mais virulento que a cepa H37Rv.

4.2 Análises macro e microscópicas dos pulmões, baço e fígado dos camundongos infectados com isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*

Amostras histológicas do pulmão, baço e fígado foram examinadas aos 5, 15 e 28 dias de infecção. Não foi observada alteração tecidual em nenhum dos grupos de camundongos aos 5 e 15 dias de infecção, tanto em análises macroscópicas quanto microscópicas.

Em análises macroscópicas aos 28 dias de infecção, foi possível observar hiperplasia pulmonar nos camundongos infectados com os isolados clínicos MP287/03, *Beijing* 1471 e B2, estando pronunciado nos camundongos infectados com o isolado MP287/03. Grandes nódulos esbranquiçados foram observados nos animais infectados com os isolados clínicos B2, MP287/03 e *Beijing* 1471 (Figura 4A). Esplenomegalia também foi observada, porém com maior intensidade nos camundongos infectados com o isolado clínico *Beijing* 1471 (dados não mostrados).

Análise do peso e massa relativa dos pulmões também foi verificada. Os pulmões dos camundongos infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior peso e massa relativa em comparação com o isolado B2 e a cepa H37Rv, confirmando as análises macroscópicas observadas (Figura 4B).

Figura 4. Análise macroscópica dos pulmões de camundongos infectados com isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Os órgãos foram coletados após o sacrifício dos camundongos e logo fixados em formaldeído tamponado 10%. (A) Nódulos esbranquiçados foram observados em maior número e tamanho nos pulmões referentes aos animais infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471, representado pelo lobo superior direito (superior) e o lobo inferior esquerdo (inferior). (B) Os pulmões dos camundongos foram pesados e (C) o aumento da massa relativa dos pulmões após 28 dias de infecção foi calculado através da razão entre o peso do camundongo infectado pelo peso do camundongo controle. O diâmetro das bolhas representa a massa relativa dos pulmões, sendo controle igual a 1. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão referentes a três experimentos independentes. Os resultados foram analisados pelo método estatístico *One-way ANOVA post test Tukey*. Os asteriscos representam a diferença estatística entre os isolados e a cepa H37Rv e o

símbolo 1 a diferença estatística entre os isolados. *** $p < 0.001$; $\text{1p} < 0.001$; $\text{11p} < 0.001$;

Nas análises microscópicas, os camundongos infectados com a cepa H37Rv apresentaram formação granulomatosa incipiente sem presença de BAAR (Figura 5A e B). Não foi observada alteração tecidual no fígado destes animais (Figura 5C). Nos camundongos infectados com o isolado B2 foram observadas nos pulmões formação granulomatosa intensa (Figura 5D e E), infiltrado celular peribronquiolar e intrabronquiolar com presença de bacilo. Formação granulomatosa incipiente foi observada no fígado, porém sem presença de BAAR detectável (Figura 5F).

Os grupos de camundongos infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram disseminação bacilífera para outros órgãos, sendo observada presença de BAAR em infiltrado no baço (dados não mostrados) e em granulomas incipientes no fígado (Figura 5I e L). Em ambos os grupos também foi observado nos pulmões necrose tecidual, intenso infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear e alveolite com presença de bacilos. (Figura 5G, H, J e K).

Figura 5. Análise histopatológica dos pulmões e fígado de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com *M. bovis* e *M. tuberculosis*. (A) Formação granulomatosa incipiente foi observada nos camundongos infectados com H37Rv, (B) sem presença de BAAR e (C) ausência de lesão hepática. (D) Formação granulomatosa sem necrose; (E) presença de BAAR (vermelho) e incipiente formação granulomatosa no fígado dos camundongos infectados com B2 (F, cabeça de seta). (G) Extensa necrose pulmonar intragranulomatosa (asterisco) com região periférica circunscrita (cabeça de seta) e presença de BAAR; (I) incipiente formação granulomatosa (cabeça de seta) com presença de BAAR (seta vermelha) no fígado dos camundongos infectados com MP287/03. (J, K) Presença de necrose pulmonar com presença de bacilos e incipiente formação granulomatosa (cabeça de seta) com presença de BAAR (seta vermelha) no fígado dos camundongos infectados com *Beijing* 1471. Os cortes foram corados utilizando a coloração por hematoxilina-eosina (A, C, D, F, G, I-superior, J e L-superior) e Ziehl-Neelsen (B, E, H, I -inferior, K e L-inferior). Aumentos: 100x (D, G e J); 200x (A, B, C, F, G, K, I-H&E e L-H&E); 400x (B); 1000x (I-ZN e L-ZN).

4.3 Avaliação da resposta imune contra isolados clínicos com diferentes graus de virulência de *M. bovis* e *M. tuberculosis*

Células presentes nos pulmões dos camundongos aos 28 dias de infecção foram coletadas e plaqueadas na concentração de 5×10^5 células/ml. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 48 h após o plaqueamento, com o objetivo de caracterizar o perfil da resposta imune do hospedeiro após a infecção utilizando isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* com diferentes graus de virulência.

Não foi detectada produção de NO, IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-12 nas células de 5 e 15 dias de infecção, também não sendo detectada produção de IL-4, IL-12 e IL-2 nos dias 28 e 60 após a infecção. (dados não mostrados).

Aos 28 dias de infecção, a cultura de células oriundas do pulmão de camundongos infectados com a cepa referência de virulência (H37Rv) apresentou considerável produção de IL-17 e IL-6, e em níveis menores TNF- α , IL-1 β , IL-10 e IFN- γ , ou não detectáveis de NO. As células oriundas do pulmão de camundongos infectados com o isolado B2 apresentaram perfil de resposta similar às dos infectados com a cepa H37Rv, sendo observada baixa produção de TNF- α , IL-1 β e IL-10. Em contraste, foi observada menor produção de IL-6 e IL-17, mas altos níveis de IFN- γ e NO (Figura 6). De acordo com os dados de carga bacteriana nos pulmões e sobrevivência dos camundongos, os animais infectados com o isolado B2 e a cepa H37Rv apresentaram desenvolvimento de infecção crônica. Desta forma, podemos sugerir que estes perfis de citocinas observados na cultura de células pulmonares dos camundongos infectados contribuíram para o estabelecimento da cronicidade da infecção.

Os dois isolados que apresentaram hipervirulência, MP287/03 e *Beijing* 1471, determinada pela alta taxa de mortalidade e de carga bacteriana nos pulmões, foram capazes de induzir diferentes perfis de resposta imune nos camundongos. A cultura de células oriundas do pulmão de camundongos infectados com o isolado MP287/03 apresentou perfil caracterizado por baixos níveis de mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ e NO, e maior produção de IL-10 em comparação aos demais grupos de infecção. Por outro lado, camundongos

infectados com o isolado clínico *Beijing* 1471 apresentaram perfil de caráter inflamatório agudo, sendo detectados elevados níveis de IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-17, IFN- γ , NO e maior produção de IL-10 em relação ao observado nos camundongos infectados com a cepa H37Rv e o isolado B2 (Figura 6). Apesar dos baixos níveis detectáveis, vale ressaltar que a produção de IL-10, por células obtidas dos pulmões dos camundongos infectados com o isolado MP287/03, também foi superior aos quantificados nos camundongos infectados com o isolado *Beijing* 1471.

O número total de células nos pulmões coletados também foi avaliado. Corroborando com os resultados de análise macroscópica dos pulmões (Figura 4), os camundongos infectados com os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior número de células totais no pulmão em relação aos infectados com o isolado B2 e a cepa H37Rv aos 28 dias de infecção (Figura 6). Estes resultados sugerem que os perfis de ativação da resposta imune observados nos camundongos infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 não são influenciados pelo número total de células obtidas dos pulmões destes animais. Entretanto, vale ressaltar que devido à superior contagem de células nos pulmões dos camundongos infectados com o isolado B2 em relação aos infectados com a cepa H37Rv, os níveis de citocinas nos pulmões dos camundongos infectados com o isolado B2 pode ser superior aos produzidos nos pulmões dos camundongos infectados com a cepa H37Rv.

Figura 6. Quantificação de citocinas e NO secretados *ex vivo* por células dos pulmões de camundongos infectados com *M. bovis* e *M. tuberculosis* aos 28 dias de infecção. As células presentes nos pulmões foram obtidas como descrito no Material e Métodos. Sobrenadantes de 5×10^5 células/ml foram coletados 48h após o plaqueamento e as citocinas quantificado por Bioplex e ELISA e NO quantificado

por reação de Griess. O número de células totais do pulmão coletados foi quantificado e comparado entre os grupos experimentais. Os dados representam as médias $\pm$ desvio padrão de um experimento (n=3). *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001;

4.4 Efeito do IFN- γ na fase aguda de infecção por isolados clínicos micobacterianos

De acordo com experimentos anteriores nós pudemos constatar que aos 28 dias de infecção os camundongos WT infectados com diferentes isolados clínicos apresentaram diferentes níveis na produção de IFN- γ , o que pode ter contribuído para o desenvolvimento da imunopatologia nos pulmões destes animais. Desta forma, para verificar a importância do IFN- γ produzido nesta fase da infecção induzida por isolados virulentos, nós infectamos camundongos WT e deficientes na produção de IFN- γ com os isolados clínicos B2, MP287/03, *Beijing* 1471 e a cepa referência H37Rv, pela via intratraqueal com ~100 bacilos. Foram avaliados parâmetros, tais como, peso e massa relativa dos pulmões, carga bacteriana nos pulmões e a sobrevivência dos camundongos.

Os pulmões dos camundongos infectados foram coletados e pesados como mostrado na figura 7. Foi observado aumento do peso (Figura 7A) e massa relativa (Figura 7B) nos pulmões dos camundongos IFN- γ KO em comparação aos WT infectados com os isolados clínicos B2, MP287/03 e *Beijing* 1471. Porém, maior diferença foi observada entre os camundongos IFN- γ KO e WT infectados com os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471.

De acordo com a carga bacteriana nos pulmões dos camundongos infectados com a cepa H37Rv foi possível verificar diferença significativa entre os camundongos WT e IFN- γ KO apenas aos 60 dias de infecção (Figura 8A). A queda na sobrevivência no grupo de camundongos deficientes em IFN- γ infectados com H37Rv teve início aos 70 dias de infecção (Figura 9A).

Nos grupos de camundongos infectados com o isolado B2 foi observado aumento da carga bacteriana nos camundongos deficientes em IFN- γ em relação aos camundongos WT aos 28 dias de infecção. Apesar de pequena diferença na

carga bacteriana observada entre os grupos de camundongos infectados, pode-se notar que a produção do IFN- γ aos 28 dias de infecção é de suma importância para o controle da carga bacteriana, bem como para garantir a sobrevivência dos animais, visto que 100% de mortalidade foram observados no grupo de camundongos IFN- γ KO aos 125 dias após a infecção (Figura 9B).

Os camundongos IFN- γ KO infectados com o isolado *Beijing* 1471 apresentaram pequena diferença no número de bacilos em relação aos camundongos WT (Figura 8D) e baixa sobrevivência (Figura 9D). Esta diferença no número de UFCs entre os camundongos WT e KO indica que o IFN- γ produzido nesta fase apresenta capacidade em induzir a produção de mecanismos microbicidas nos pulmões dos animais. Outro fator a ser levado em consideração é a hiperplasia pulmonar observada nos camundongos IFN- γ KO. Provavelmente, o aumento da carga bacteriana associada com o influxo de células para o pulmão, pode ter contribuído para a morte dos camundongos.

Figura 7. Análise macroscópica dos pulmões de camundongos IFN- γ KO e WT infectados com *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Os órgãos foram coletados após sacrifício dos camundongos e logo fixados em formaldeído tamponado 10%. (A) Peso dos pulmões dos camundongos infectados com a cepa H37Rv e os isolados B2, MP287/03 e *Beijing* 1471 aos 28 dias após a infecção. (B) Aumento da massa relativa dos pulmões após 28 dias de infecção, calculado através da razão entre o peso do camundongo infectado pelo peso do camundongo controle. O diâmetro das bolhas representa a razão deste aumento, sendo controle igual a 1. Os pontos representam o número de camundongos de três experimentos independentes. Os asteriscos representam diferença estatística pelo método *One-way ANOVA post test* Tukey. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$;

Figura 8. Cinética da carga bacteriana nos pulmões de camundongos WT e deficientes em IFN- γ infectados com isolados clínicos *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Camundongos C57BL/6 (■) e IFN- γ KO (▲) infectados via intratraqueal com $\sim 10^2$ bacilos de H37Rv (A), B2 (B), MP287/03 (C) e *Beijing* 1471 (D) foram sacrificados em 0, 5, 15, 28 e 60 dias após a infecção e o número de UFCs quantificado após plaqueamento em 7H10. As linhas indicam a média $\pm$ desvio padrão do número de UFCs de n=9 (WT) e n=6 (KO) camundongos por ponto referentes a três experimentos independentes. Os asteriscos representam diferenças estatísticas dos camundongos IFN- γ KO em relação aos camundongos WT. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001;

Por outro lado, os camundongos infectados com o isolado hipervirulento MP287/03 apresentaram altas contagens de UFCs tanto nos WT quanto nos IFN- γ KO (Figura 8C). Apesar disto, os camundongos IFN- γ KO apresentaram maior hiperplasia pulmonar em relação aos camundongos WT, sendo isto indicado pelo aumento do peso e massa relativa dos pulmões (Figura 7). Desta forma, é possível concluir que o nível de IFN- γ produzido durante a infecção com o isolado MP287/03 nos camundongos WT não contribuiu para a ação microbida dos macrófagos no pulmão. Porém, a ausência deste fator parece afetar positivamente a indução do recrutamento celular para o tecido, gerando hiperplasia pulmonar e consequentemente a morte dos animais por insuficiência pulmonar (Figura 9C).

Figura 9. Porcentagem de sobrevivência dos camundongos IFN- γ KO e WT infectados com *M. bovis* e *M. tuberculosis*. Camundongos foram infectados com ~100 bacilos pela via intratraqueal com a cepa H37Rv ((A) - n=9, grupo WT, e n=5, grupo KO) e os isolados clínicos de *M. bovis* B2 ((B) - n=9, cada grupo) e MP287/03 ((C) - n=9, cada grupo) e *M. tuberculosis* Beijing 1471 ((D) - n=4, grupo WT, e n=8, grupo KO). Os camundongos foram monitorados diariamente. * p<0.05; ** p<0.01;

4.5 Avaliação da suscetibilidade micobacteriana à ação microbicida por meio do doador de NO S-nitroglutathione (GSNO)

A produção de intermediários reativos de nitrogênio e oxigênio por macrófagos murinos é considerada um mecanismo relativamente efetivo do hospedeiro contra *M. tuberculosis*, promovendo a inibição do crescimento do bacilo (Adams et al., 1997; Yu et al., 1999; Venketaraman et al., 2005). *M. tuberculosis* utiliza vários mecanismos para combater o estresse oxidativo, os quais incluem a enzima catalase/peroxidase (KatG), superóxido dismutase e a resposta de detoxificação baseada em tiol (micotiol) (Miller et al., 2007; Attarian et al., 2009).

O macrófago infectado produz NO e GSH, um tripeptídeo com papel antioxidante, capaz de se ligar ao NO, formando o S-nitrosoglutathione (GSNO), impedindo a toxicidade celular. O conjugado GSNO não é transportado para dentro da célula bacteriana. Ocorre, então, uma clivagem desta glutathione, transformando-a em um dipeptídeo (Cys-Gly), mediada pela enzima γ -glutamyl transpeptidase. Este dipeptídeo, então, é transportado para dentro da célula bacteriana pelo complexo multicomponente ABC transporter dipeptídeo permease, carreando, desta forma, a molécula de NO, levando à morte da bactéria. Estudos recentes mostraram que a ausência da enzima γ -glutamyl transpeptidase leva à resistência da *M. tuberculosis* à ação do NO, sendo isto mostrado através de comparações *in vitro* utilizando cepas mutantes para esta enzima (Green et al., 2000; Venketaraman et al., 2005; Dayaram et al., 2006).

Uma das funções do IFN- γ é promover a ativação dos macrófagos a produzir NO e, assim, levar a eliminação da micobactéria. Nossos dados mostram que o isolado MP287/03 induz baixos níveis de produção de IFN- γ na cultura de células pulmonares de camundongos WT em relação às demais cepas utilizadas neste estudo. Porém, esta citocina é importante para evitar o recrutamento excessivo de células para o pulmão, sendo isto verificado por análises comparativas utilizando camundongos deficientes em IFN- γ e WT. Desta forma, nós propusemos averiguar se a resistência dos isolados clínicos no pulmão dos camundongos poderia estar ligado à resistência a ação microbicida do NO.

Para tanto, as bactérias foram plaqueadas em meio de cultura 7H9 suplementado com ADC, na D.O de 0,100 e acrescentamos concentrações crescentes do doador de NO, GSNO, sendo já descrito a concentração de 5 mM bactericida para a cepa H37Rv (Venketaraman et al., 2005). Porém, em ensaios prévios vimos que, a concentração de 1mM foi capaz de exercer atividade bactericida para o isolado H37Rv e outros isolados de *M. tuberculosis*, assim utilizamos concentrações partindo de 0µM à 1mM de GSNO. Estas culturas foram incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. Logo, foram adicionados 10% do volume total da cultura de MTT (5mg/ml) e incubadas a 37 °C e 5% CO₂ por 3 h, com posterior adição de 100µl de tampão de lise micobacteriana. Após incubação *overnight* à 37 °C foi quantificada a densidade óptica da cultura.

Na figura 10 podemos verificar que os isolados clínicos B2, MP287/03 e *Beijing* 1471, bem como, as cepas referências de avirulência e virulência, BCG e H37Rv, respectivamente, apresentaram susceptibilidade à ação microbicida do NO. Apesar da suscetibilidade ao NO, não foi observado eliminação total dos bacilos na cultura, o que possibilitaria, por exemplo, a invasão de outros macrófagos por estes bacilos remanescentes, mesmo em altas concentrações de NO no pulmão dos camundongos.

Figura 10. Avaliação da suscetibilidade micobacteriana à ação do NO. Culturas micobacterianas das cepas H37Rv, BCG e dos isolados B2, MP287 e *Beijing* 1471 foram cultivadas por 24 h, na presença ou não do doador de NO GSNO. As amostras foram quantificadas por teste colorimétrico de redução de MTT a 570nm. Dados representativos de dois experimentos independentes.

4.6 Crescimento dos isolados virulentos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* em 7H9 Middlebrook e intracelular em macrófagos derivados da medula óssea

Algumas propriedades biológicas associadas à virulência, tais como, taxa de crescimento, expressão antigênica e evasão da resposta microbicida são responsáveis pela permanência do bacilo no hospedeiro, podendo assim favorecer a disseminação do mesmo para outros órgãos e/ou outros hospedeiros.

Nossos resultados mostram, até então, que cepas hipervirulentas apresentam diferentes capacidades de modular a resposta imune e levar à morte o hospedeiro. Foi verificado também que a permanência do bacilo no hospedeiro independe da resistência à ação microbicida induzida pela exposição ao NO.

Desta forma, para avaliar as propriedades biológicas associadas à virulência dos isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, que seriam responsáveis pela permanência do patógeno na célula hospedeira, nos propusemos a avaliar a taxa de crescimento dos bacilos *in natura* (meio de cultura micobacteriano), indução de fagocitose em macrófagos derivados da medula óssea e crescimento do bacilo intracelular. Para tanto, utilizamos as cepas de referência em avirulência e virulência, BCG e H37Rv, respectivamente, em comparação com os isolados clínicos B2, MP287/03 e *Beijing* 1471.

Primeiramente, nós analisamos a taxa de crescimento destes isolados clínicos e as cepas BCG e H37Rv em meio de cultura micobacteriana, 7H9 Middlebrook acrescido de meio de enriquecimento ADC, bem como a capacidade de indução de fagocitose em macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 (Figura 11).

Os bacilos foram incubados em meio de cultura 7H9+ADC por 10 dias em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Para avaliar a taxa de crescimento dos bacilos foi quantificada a D.O no dia de inoculação (Dia 0) e 10 dias após o cultivo (Dia 10). Para obtenção da taxa de crescimento micobacteriano foi calculada a razão da densidade óptica do dia 10 em relação ao dia 0. Como esperado a cepa BCG apresentou taxa de crescimento inferior à cepa H37Rv, confirmando que em alguns casos as cepas menos virulentas apresentam menor taxa de crescimento do que cepas mais virulentas (Lasunskia et al., 2010). Por outro lado, não foi observada

diferença significativa na taxa de crescimento entre os isolados clínicos (Figura 11A). Assim, podemos concluir que as diferenças observadas *in vivo* na virulência dos isolados clínicos independe da capacidade proliferativa *in natura* dos mesmos.

A capacidade de endocitose dos bacilos pelos macrófagos, assim como a quantidade de bacilos fagocitados também foi avaliada. Para tanto, macrófagos derivados da medula óssea foram infectados com MOI de 1:1, para avaliação da quantidade de bacilos endocitados após 3 h de incubação. Após este período, a cultura celular foi lavada com PBS1X, a fim de retirar os bacilos não endocitados, e posterior lise dos macrófagos, para obtenção dos bacilos endocitados. Este homogeinato foi semeado em meio de cultura 7H10+OADC e incubado a 37 °C por 24 dias para contagem das unidades formadoras de colônias (Figura 11B). Macrófagos também foram infectados com MOI de 5:1 para avaliação da porcentagem de células que apresentaram fagocitose do bacilo após 3h de incubação, através do método Ziehl-Neelsen de coloração de bacilos álcool-ácido resistentes (Figura 11C). Os dados obtidos mostram que não há diferenças entre os bacilos quanto sua capacidade em induzir fagocitose em macrófagos murinos, sendo isto determinado pelo similar número de bacilos fagocitados (Figura 11B) e porcentagem de macrófagos que fagocitaram (Figura 11C).

A capacidade de crescimento dos bacilos dentro dos macrófagos derivados da medula óssea de camundongos C57BL/6 foi avaliado durante 6 dias após infecção com MOI de 1:1. A viabilidade celular dos macrófagos infectados na proporção de 1:1 e a cultura controle foi similar (95% de células vivas) durante o curso do experimento (dados não mostrados). Ao longo de 6 dias de infecção, os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior capacidade de crescimento dentro dos macrófagos do que o isolado B2 e as cepas H37Rv e BCG, confirmando a hipervirulência dos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471, virulência moderada de isolado B2, virulência da cepa H37Rv e avirulência da cepa BCG (Figura 12A). A capacidade citotóxica dos isolados também foi avaliada em macrófagos infectados na proporção de MOI 50:1. Todos os isolados clínicos induziram, principalmente, morte celular do tipo necrótica nos macrófagos, chegando a 100% de morte aos 6 dias de infecção, enquanto a cepa H37Rv induziu aproximadamente 60% de morte e a cepa BCG 5% de morte, durante o período

analisado (Figura 12B). Assim, podemos concluir que a capacidade dos isolados clínicos hipervirulentos permanecer no organismo e induzir morte do hospedeiro, depende da capacidade dos mesmos em proliferar dentro dos macrófagos.

Figura 11. Crescimento micobacteriano em meio 7H9 Middlebrook e taxa de fagocitose induzida por isolados de *M. bovis* e *M. tuberculosis*. (A) O crescimento bacteriano em meio 7H9 foi avaliado dentro de 10 dias de incubação por espectrofotometria. (B) Macrófagos derivados da medula óssea foram infectados na proporção de MOI 1:1 para avaliação do número de bacilos fagocitados após 3 h de incubação. (C) Infecção dos macrófagos com MOI de 5:1 para quantificação da porcentagem de macrófagos com presença de bacilos intracelular após coloração com Ziehl-Neelsen. As figuras D e E representam a cultura de macrófagos controle e infectada com micobactéria (cepa BCG, vermelho), respectivamente. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata e a estatística analisada pelo método One-way ANOVA *post test* Tukey. * $p < 0.05$;

Figura 12. Avaliação do crescimento intracelular micobacteriano e capacidade citotóxica em macrófagos. (A) Macrófagos derivados da medula óssea foram infectados com os isolados clínicos B2, MP287/03, Beijing 1471 e com as cepas referências BCG e H37R nas proporções de MOI 1:1, para avaliação do crescimento intracelular, e (B) MOI 50:1, para avaliação da indução de morte celular ao longo de 6 dias de infecção. A viabilidade celular foi avaliada pela incorporação de laranja de acridina e brometo de etídeo (50 mg/ml) pelas células e quantificadas com auxílio de microscópio invertido de fluorescência. Os dados representam média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes em duplicata. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$;

5 DISCUSSÃO

Fatores de virulência micobacterianos conferem capacidade ao bacilo de permanecer vivo no hospedeiro, proliferar e disseminar, através de mecanismos, os quais promovem evasão das respostas microbidas (Waters et al., 2007; Gan et al., 2008). A modulação da resposta imune durante a infecção pode acarretar ao aumento da patogenia, incitando o desenvolvimento de imunopatologia no hospedeiro, podendo levá-lo à morte (Ordway et al., 2007).

Estudos recentes mostraram que isolados clínicos de *M. tuberculosis* e *M. bovis* apresentam grande potencial de infectividade e desenvolvimento da patogenia em modelo murino de infecção pulmonar e extrapulmonar (Lopez et al., 2003; Dormans et al., 2004; Medina et al., 2006; León et al., 2009). A patogenicidade é entendida como a capacidade de um agente invasor em causar doença, com suas formas clínicas no hospedeiro, e a virulência é a capacidade patogênica de um microrganismo, medida pela mortalidade que ele induz e/ou por sua habilidade em invadir tecidos do hospedeiro. Diversos fatores gênicos, protéicos e lipídicos podem induzir virulência a um patógeno (Fratti et al., 2003; Ganguly et al., 2008; Sachdeva et al., 2010).

O conhecimento da relação entre a patogenicidade e a modulação da resposta imune no hospedeiro por microrganismos virulentos, se faz importante para o entendimento de como os processos patológicos são induzidos.

Vêm sendo relatados em estudos que diferentes genótipos tanto de *M. bovis* quanto de *M. tuberculosis* determinam diferentes graus de virulência e fenótipos de ativação da resposta imunológica durante a infecção (León et al., 2009; Marquina-Castillo et al., 2009; Aguilar et al., 2010; Hernandez Pando et al., 2010). Contudo, a relação entre a virulência e a ativação da resposta imune pelo bacilo e, como isto pode afetar o desenvolvimento da patologia no hospedeiro ainda não estão bem claros.

Portanto, neste estudo, nós avaliamos a relação entre a patogenicidade e virulência de isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, comparando com a cepa referência de virulência de *M. tuberculosis* H37Rv, e a capacidade de modulação da resposta imune em modelo murino de infecção pulmonar. Para tanto, utilizamos como parâmetros de análise da patogenicidade e virulência micobacteriana, a sobrevivência dos camundongos após a infecção, cinética da

carga bacteriana nos pulmões destes animais, análise histopatológica do pulmão, fígado e baço, avaliação da resposta imune via quantificação da produção espontânea de mediadores pró- e anti-inflamatórios por células pulmonares, capacidade de crescimento intracelular em macrófagos e indução de toxicidade celular (Lopez et al., 2003; Smith, 2003; Dormans et al., 2004).

Os camundongos da linhagem C57BL/6 são conhecidos por serem resistentes às infecções micobacterianas (Ordway et al., 2008). Nesse sentido, o estudo da patogenicidade e virulência micobacteriana utilizando este modelo animal, possibilitaria distinguir o grau de virulência dos isolados clínicos em estudo.

Em nossos resultados podemos observar, claramente, que os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 foram capazes de induzir maior taxa de mortalidade nos camundongos do que o isolado clínico B2, que por sua vez induziu menor sobrevivência dos camundongos quando comparado com a cepa H37Rv. Extensa região de necrose e disseminação para outros órgãos tais como, o fígado e o baço, com presença de bacilos, podem ser verificadas nos camundongos infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471. Porém, foi observado que o isolado MP287/03 apresentou maior capacidade proliferativa em relação ao isolado *Beijing* 1471, nos pulmões dos camundongos infectados. Desta forma, podemos agrupar os bacilos em estudo, quanto ao grau de virulência, em hipervirulentos, sendo representados pelos isolados MP287/03 e *Beijing* 1471, virulência intermediária, representado pelo isolado B2, e virulento, representado pela cepa H37Rv.

Estudos acerca da patogenicidade e virulência, utilizando cepas referência de virulência de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, mostraram que *M. bovis* apresenta maior grau de virulência do que *M. tuberculosis* em modelos murinos de infecção pulmonar e extrapulmonar, sugerindo que camundongos são mais suscetíveis à infecção por *M. bovis* do que por *M. tuberculosis* (Dunn e North, 1995; North et al., 1999; Medina et al., 2006).

Entretanto, verificamos em nosso estudo que isolados clínicos hipervirulentos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* possuem similares perfis de indução de patologia e morte dos camundongos. Corroborando com os nossos resultados, León et al. (2009) mostraram que isolados clínicos de *M. bovis* com distintos genótipos

apresentam diferenças na virulência em modelo murino de infecção pulmonar, sendo observados 100% de morte nos animais infectados com o isolado de maior virulência em 6 semanas de infecção. Aguilar et al. (2010) mostraram que os isolados clínicos pertencentes ao *cluster* de genótipo Beijing apresentam diferentes graus de virulência. Neste estudo, o isolado de maior virulência foi capaz de induzir 100% de morte dos camundongos em 6 semanas após a infecção.

Todavia, algumas diferenças podem ser observadas entre o modelo de infecção utilizado por León et al. (2009) e Aguilar et al. (2010) e o nosso modelo. A carga bacteriana inicial de infecção utilizada por León et al. (2009) e Aguilar et al. (2010) foi de 10^5 bacilos, inoculados em camundongos BALB/c. A linhagem BALB/c é conhecida por ser mais suscetível às infecções micobacterianas do que a linhagem C57BL/6 (Arko-Mensah et al., 2009; Martins de Sousa et al., 2010; Paula et al., 2010). Portanto, em comparação com os dados mostrados por León et al. (2009) e Aguilar et al. (2010), nós podemos sugerir que os isolados clínicos hipervirulentos utilizados em nosso estudo apresentam maior grau de virulência. Isto porque foi observado indução de morte dos camundongos na fase aguda de infecção, utilizando uma carga bacteriana inicial 1000 vezes menor. Com base nestes dados, hipotetizamos que isolados clínicos micobacterianos hipervirulentos poderiam apresentar diferentes mecanismos de indução de patogenia.

A indução da fase crônica da infecção observada em camundongos infectados pelo isolado clínico B2, que apresentou virulência intermediária, coincidiu com a indução da produção de IFN- γ e IL-17 por células obtidas dos pulmões dos camundongos aos 28 dias de infecção. A produção destas citocinas em camundongos C57BL/6 infectados com *M. tuberculosis* e *M. bovis* BCG parece refletir no estabelecimento da resposta anti-micobacteriana, sendo estes mediadores importantes para a indução da formação dos granulomas (Cooper et al., 1993; Sugawara et al., 1998; Umemura et al., 2007; Okamoto Yoshida et al., 2010). Após indução da produção das citocinas IFN- γ e IL-17, nos camundongos infectados com o isolado clínico B2, foi observado queda nos níveis desses mediadores aos 60 dias de infecção (dados não mostrados), porém a carga bacteriana nos pulmões não apresentou aumento. A diminuição destas citocinas parece estar ligada à queda no número de linfócitos TCD4⁺ nos pulmões (dados não mostrados). A linfopenia das

células TCD4⁺, cujos dados sugerem ser dependente de IFN- γ , foi descrita em vários modelos experimentais de infecção por micobactéria, mas o mecanismo de indução deste fenômeno ainda não está claro (Dalton et al., 2000; Florido et al., 2005). Apesar disto, foi observado aumento da produção de TNF- α , IL-6 e NO durante esta fase, sendo estes fatores característicos da ativação de macrófagos (dados não mostrados). A produção destes mediadores pelos macrófagos, provavelmente, se deu pela estimulação prévia destas células pelo IFN- γ durante a fase aguda de infecção. Isto pode ter contribuído para a produção de sinais microbicidas pelos macrófagos, a fim de controlar a taxa proliferativa dos bacilos no pulmão.

Resultados obtidos pelo nosso grupo mostraram que a fase crônica de infecção induzida pelo isolado clínico B2 se estendeu até 150 dias após a infecção. Neste momento, foi observado o aumento da mortalidade dos camundongos e da carga bacilar nos pulmões, caracterizando o processo de reativação da infecção induzida pelo bacilo (dados não publicados). Interessantemente, com doses elevadas de infecção com o isolado clínico B2 foram observados altos níveis de expressão relativa de mRNA para iNOS e IL-10 na fase aguda de infecção, não sendo verificada diferença na suscetibilidade à infecção entre camundongos WT e IFN- γ KO (manuscrito em fase de elaboração). Deste modo, a indução da resposta imune protetora contra micobactérias virulentas depende muito do tempo de estimulação das células no pulmão, a fim de promover a ativação dos macrófagos e, consequentemente, o controle da proliferação dos bacilos nos fagócitos.

Diferente do observado nos camundongos infectados com o isolado clínico B2, os camundongos infectados com o isolado MP287/03 apresentaram baixa estimulação das células do pulmão aos 28 dias de infecção. Neste momento, foi detectada baixa produção de mediadores pró-inflamatórios, alto comprometimento pulmonar com extensa região de necrose tecidual e elevada taxa de mortalidade. Similares resultados referente à baixa ativação da resposta imune do tipo Th1 foram observados durante a infecção por isolados de *M. bovis* (León et al., 2009) e *M. tuberculosis* de genótipo Beijing (Aguilar et al., 2010).

O *cluster* de genótipo Beijing de *M. tuberculosis* é caracterizado por apresentar altas taxas de virulência, associação à resistência a medicamentos e transmissibilidade entre humanos no mundo (Drobniewski et al., 2005a). Em muitas

regiões da Rússia, a “família Beijing” constitui quase a metade dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* obtidos, apresentando maior prevalência entre isolados colhidos de prisioneiros (Drobniewski et al., 2005a; Drobniewski et al., 2005b).

Estudo recente foi realizado com o objetivo de averiguar diferentes fenótipos entre isolados clínicos de genótipo Beijing, obtidos no Brasil e na Rússia, em modelo de infecção *in vitro* (Lasunskia et al., 2010). Neste estudo, foi verificado que dentro de um mesmo genótipo há grande variabilidade em características associadas à taxa de virulência entre os isolados clínicos. Foi observado que os isolados que apresentaram características associadas com maior virulência (*cluster* Beijing isolado na Rússia) foram capazes de induzir maior toxicidade celular, crescimento intracelular e produção de IL-10 (Lasunskia et al., 2010). Diferença na virulência entre isolados pertencentes à família Beijing também foi verificada *in vivo*, sendo observados perfis de moderada e alta virulência entre os isolados estudados (Dormans et al., 2004; Aguilar et al., 2010).

Nossos dados mostram que o isolado clínico *Beijing* 1471 apresentou hipervirulência, de acordo com análises de mortalidade e carga bacteriana no pulmão. Esta característica foi associada com indução de necrose pulmonar e exacerbação da produção de mediadores pró-inflamatórios por células obtidas do pulmão destes animais, após 28 dias de infecção. Nestes camundongos foi observada presença do bacilo no fígado e baço, o que não foi detectada nos camundongos infectados com os bacilos B2 e H37Rv, sugerindo disseminação do bacilo para outros órgãos durante a infecção por este isolado hipervirulento.

Tem sido descrito que a regulação de alguns mediadores inflamatórios pode afetar na disseminação do bacilo. Redford et al. (2010) mostraram que o aumento da produção de IL-17, durante a infecção com cepa virulenta de *M. tuberculosis*, pode ter sido responsável pela disseminação do bacilo para outros órgãos. Isto foi verificado através da queda da carga bacteriana no baço, porém não no pulmão, em camundongos tratados com anticorpos anti-IL-17. Foi observado também que a ausência desta citocina levou à queda na frequência de granulócitos no pulmão, contudo este fenômeno não afetou a frequência do número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ neste órgão (Redford et al., 2010).

Portando, estes achados indicam que a ativação exacerbada da resposta

imune observada durante a infecção pelo isolado hipervirulento *Beijing* 1471 pode ter conduzido à disseminação do bacilo para outros órgãos, além da indução de imunopatologia no pulmão. Por outro lado, é possível também sugerir que a disseminação do bacilo pode ter levado à modulação da resposta imune nos camundongos infectados. Isto porque nos camundongos infectados com o isolado MP287/03 também foi observada disseminação do bacilo para outros órgãos, porém num contexto de baixa ativação da resposta imune protetora.

Em nosso modelo foi verificado nos camundongos infectados por isolados clínicos hipervirulentos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* indução de necrose pulmonar, porém com diferentes perfis de ativação da resposta imune. Em alguns modelos de infecção por *M. avium* e *M. tuberculosis* vêm sendo relatado a indução de necrose pulmonar por isolados clínicos (Florido e Appelberg, 2004; Aguilar et al., 2010). Por muito tempo acreditou-se que o TNF- α era um importante fator para a indução de necrose tecidual em infecção micobacteriana (Rook e al Attiyah, 1991). Porém, Florido et al. (2004) mostraram que em camundongos C57BL/6 infectados com *M. avium* a necrose ocorre independente da ação do TNF- α . Em camundongos deficientes em TNF- α infectados com o bacilo foi verificada intensa formação de necrose tecidual e altos níveis de produção de IFN- γ em relação aos camundongos WT. Desta forma, Florido et al. (2004) sugeriram que a superativação da resposta imune do tipo Th1 poderia ter levado à indução da necrose tecidual.

Entretanto, Gil et al. (2006) utilizando modelo de geração de necrose intragranulomatosa durante a infecção com *M. tuberculosis* em camundongos, mostraram a ocorrência de dois perfis de indução de necrose: o primeiro, caracterizado pelo aumento da carga bacteriana nos pulmões e baixa ativação da resposta pró-inflamatória; e o segundo marcado pelo aumento da ativação da resposta imune protetora. Este modelo animal de indução de necrose consiste na administração intranasal de LPS após 3 semanas de infecção com a micobactéria. Neste estudo, foi verificada formação de intensa necrose tecidual nos camundongos deficientes em TNF- α , IL-12, IFN- γ , iNOS, células T $\alpha\beta$ e camundongos SCID e, necrose tecidual branda nos camundongos deficientes em IL-1 β , IL-6, IL-10, TCD4⁺, células TCD8⁺ e células T $\gamma\delta$ (Gil et al., 2006). Embora, Florido et al. (2004) tenham implicado a independência de TNF- α na indução de necrose tecidual, Gil et al.

(2006) sugeriram que a indução da necrose não depende da participação individual das citocinas, mas provavelmente da expressão em conjunto destes mediadores inflamatórios.

O perfil de resposta imune induzido por isolados virulentos, pertencentes ao genótipo Beijing, apresenta grande controvérsia na literatura. Manca et al. (2001), mostraram que o isolado hipervirulento de genótipo Beijing HN878 foi capaz de induzir morte dos camundongos da linhagem B6D2/F1 e falha na ativação da resposta Th1. Esta deficiência na indução da resposta imune protetora foi observada pela baixa taxa de proliferação celular e pela baixa produção de IFN- γ por células do baço e dos linfonodos nos camundongos infectados. Foi verificada também baixa expressão do mRNA para IL-6, IL-12, IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-5, porém alta expressão de mRNA para IFN do tipo 1 (IFN α/β) e aumento da carga bacteriana. Mais tarde, eles observaram que a falha na indução da resposta imune protetora foi devida ao aumento da expressão de IFN do tipo 1, que por sua vez foi responsável pela indução do aumento na expressão de reguladores da via de ativação Jak/Stat tais como, SOCS 1, 4 e 5 (do inglês, *Suppressors of Cytokine Signaling*), CD45, PIAS1 (do inglês, *Protein Inhibitor of Activated Stat1*), Ptpn1 (do inglês, *Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type 1*) e Ptpns1 (do inglês, *Protein Tyrosine Phosphatase Nonreceptor Type Substrate 1*) (Manca et al., 2005). Quando os camundongos infectados foram tratados com anti-IFN α/β , a resposta imune do tipo Th1 foi restaurada e, conseqüentemente, observado o aumento da sobrevivência dos animais (Manca et al., 2001; Manca et al., 2005). Reed et al. (2004) mostraram que a falha da resposta imune durante a infecção pelo isolado HN878 era devida à expressão de PGL. Neste isolado, a ausência da expressão de PGL pela micobactéria levou à perda da hipervirulência, correlacionando com o aumento da ativação dos macrófagos. O aumento da expressão de PGL, ou a adição de PGL na cultura resultou na inibição da secreção de mediadores pró-inflamatórios.

Por outro lado, em outro modelo de infecção a mesma cepa (HN878) apresentou diferente perfil de ativação da resposta imune protetora. Ordway et al. (2007) mostraram que o isolado clínico de genótipo Beijing HN878 foi capaz de induzir ativação exacerbada da resposta imune do tipo Th1, seguida de regulação negativa desta resposta em camundongos C57BL/6. A mortalidade nestes animais

foi semelhante à observada por Manca et al. (2001, 2005) e Reed et al. (2004). Foi confirmado, por Ordway et al. (2007), que na ausência de IFN tipo 1 há o aumento da sobrevivência dos animais devido à ativação da resposta imune do tipo Th1 e baixa contagem bacilar no pulmão. Foi verificado também que após o aumento da produção de IFN- γ , aos 30 dias de infecção, ocorre um declínio desta resposta aos 60 dias de infecção. Esta queda na produção de mediadores pró-inflamatórios se deu pelo surgimento da população de células T reguladoras produtoras de IL-10 aos 21 dias de infecção. Este perfil de resposta de ativação exacerbada em 30 dias após a infecção, com posterior queda, culminou na produção de imunopatologia nos pulmões dos animais, levando-os à morte (Ordway et al., 2007). Assim, estudos complementares se fazem necessários para identificar as razões pelas quais o sistema imune desenvolve distintos mecanismos de respostas contra diferentes isolados hipervirulentos micobacterianos.

Em nosso estudo foi observado diferentes níveis de produção de IFN- γ na cultura de células pulmonares dos camundongos WT infectados com os isolados clínicos hipervirulentos MP287/03 e *Beijing* 1471. Dessa forma, avaliamos se estes diferentes níveis de IFN- γ produzidos poderiam influenciar na eliminação do patógeno e produção da imunopatologia. Neste sentido, infectamos camundongos deficientes na produção de IFN- γ com os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 e observamos o aumento da massa relativa dos pulmões e mortalidade destes camundongos. Em contraste, a ausência deste mediador não induziu aumento do número de bacilos no pulmão dos camundongos IFN- γ KO infectados com MP287/03 em relação aos camundongos WT. Já no grupo de camundongos IFN- γ KO infectados com o isolado clínico *Beijing* 1471 foi observada pequena diferença na carga bacteriana nos pulmões em relação aos camundongos WT. Por outro lado, em camundongos deficientes para IFN- γ infectados com isolados virulentos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* foi observada elevada produção de MCP-1 (do inglês, *Monocyte Chemotactic Protein 1*) (dados não mostrados). O MCP-1 é uma quimiocina, membro da família SIG (do inglês, *Small Inducible Gene*), responsável pelo recrutamento de monócitos para o local da injúria ou infecção. Desta forma, nós podemos sugerir que o aumento desta quimiocina em camundongos deficientes em IFN- γ , pode ter induzido o aumento do recrutamento celular para o pulmão, contribuindo para a

indução de imunopatologia, levando os animais à morte.

Tem sido observada durante infecção em camundongos deficientes em IFN- γ a indução da população de Th17, sendo, portanto, verificado o aumento da produção da citocina IL-17 nestes animais (Cruz et al., 2006). Como mostrado por Redford et al. (2010), o aumento da produção de IL-17 pode afetar na disseminação do patógeno para outros órgãos. Desta forma, podemos especular que além da indução da produção do MCP-1 observada nos camundongos IFN- γ KO, durante a infecção por isolado virulento de *M. bovis* e *M. tuberculosis*, a produção de IL-17 poderia favorecer a indução da imunopatologia nestes animais, devido ao aumento da disseminação do bacilo para outros órgãos.

O fato de que mesmo na ausência do IFN- γ não tenha sido observada grande diferença na carga bacilífera nos pulmões dos camundongos IFN- γ KO em relação aos camundongos WT, nos conduziu à hipótese de que fatores ligados à resistência a ação microbicida poderiam favorecer a permanência do bacilo no hospedeiro. No entanto, nós verificamos que os isolados clínicos não apresentaram diferenças quanto à resistência pela ação microbicida induzida pelo NO, capacidade proliferativa em meio de cultura micobacteriano ou indução de endocitose. Por outro lado, foi verificado que os isolados hipervirulentos, MP287/03 e *Beijing* 1471, apresentaram maior crescimento intracelular em relação aos demais bacilos estudados. Assim, estes resultados sugerem que a capacidade dos isolados hipervirulentos proliferarem dentro dos macrófagos pode ser responsável pela sua permanência no hospedeiro.

Nossos resultados nos permitem sugerir que a modulação da resposta imune é crucial para definir a fase aguda e crônica durante a infecção por micobactérias virulentas. A baixa ativação da resposta imune protetora ou a exacerbação da ativação da mesma, durante a fase aguda de infecção, pode levar à morte dos animais por diferentes mecanismos. Em ambos os perfis foram observados hiperplasia pulmonar e imunopatologia com presença de necrose tecidual. Quando ocorre baixa ativação da resposta imune o camundongo morre, provavelmente, devido ao aumento da carga bacilífera nos pulmões, em coexistência com pneumonia e necrose tecidual. Por outro lado, quando ativação da resposta imune protetora é exacerbada, ampla lesão tecidual é gerada e o camundongo morre

devido à imunopatologia. Em contraste, o equilíbrio entre a taxa proliferativa do bacilo nos pulmões e ativação da resposta imune protetora, permite o desenvolvimento da infecção crônica nos camundongos e latência do bacilo (Figura 13).

Portanto, as propriedades que conferem maior grau de virulência e patogenicidade para isolados clínicos de *M. bovis* e *M. tuberculosis* podem ser atribuídas à capacidade de crescimento intracelular e modulação da resposta imune no hospedeiro.

Figura 13. Modelo esquemático sugerido para modulação da resposta imune na fase aguda e crônica de infecção por micobactérias virulentas e hipervirulentas.

6 CONCLUSÃO

- Os isolados clínicos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior grau de patogenicidade e virulência quando comparados com o isolado clínico B2 e a cepa referência de virulência H37Rv.
- Em baixas doses, o isolado B2 e a cepa H37Rv induziram fase crônica de infecção nos camundongos, sendo observado aumento de citocinas pró-inflamatórias aos 28 dias de infecção, porém queda de IFN- γ e IL-17 aos 60 dias de infecção. Nesta fase, foi observado aumento de mediadores característicos da ativação de macrófagos, tais como TNF- α e NO, que podem ter favorecido para o controle do crescimento do bacilo no pulmão.
- A indução da resposta imune protetora contra micobactérias virulentas depende muito do tempo de estimulação das células no pulmão, a fim de promover a ativação dos macrófagos e, conseqüentemente, o controle da proliferação dos bacilos nos fagócitos.
- Os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 induziram necrose nos pulmões e alta taxa de mortalidade dos camundongos, porém por diferentes mecanismos de indução de morte.
- Falha na indução da resposta pró-inflamatória, elevada carga bacteriana e extensa necrose tecidual podem ter sido as causas da morte dos camundongos infectados com MP287/03. Entretanto, os camundongos infectados com *Beijing* 1471 sucumbiram, provavelmente, devido à elevada ativação da resposta imune protetora e, conseqüentemente, comprometimento pulmonar.
- Camundongos IFN- γ KO infectados com os isolados MP287/03, *Beijing* 1471 e B2 apresentaram aumento na massa relativa dos pulmões em relação aos camundongos WT. Porém, não foi observada grande diferença na carga bacteriana nos pulmões nos camundongos IFN- γ KO infectados com os isolados MP287/03 e *Beijing* 1471 quando comparado com os camundongos WT infectados.
- Não foram observadas diferenças na capacidade de crescimento em meio de

cultura micobacteriano, indução de fagocitose em macrófagos e suscetibilidade à ação microbida do NO entre os isolados clínicos. Porém, foi verificado que os isolados hipervirulentos MP287/03 e *Beijing* 1471 apresentaram maior crescimento intracelular do que o isolado B2 e as cepas H37Rv e BCG.

- A patogenicidade e a virulência observada pelos hipervirulentos clínicos podem ser conferidas pela capacidade de crescimento intracelular e modulação da resposta imune protetora.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- Abrahão RMCM. Tuberculose humana causada pelo *Mycobacterium bovis*: Considerações gerais e a importância dos reservatórios animais. Arch Vet Science. 1999;4(1):5-15.
- Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL. Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. Tuber Lung Dis. 1997;78(5-6):237-46.
- Aguilar D, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittius NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. Tuberculosis (Edinb). 2010;90(5):319-25.
- Amaral EP, Kipnis TL, Carvalho ECQ, Dias Da Silva W, Leão SC, Lasunskaja E. Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing identical DNA fingerprint determined in murine model of experimental lung infection. PloS One. 2010. In press.
- Arko-Mensah J, Rahman MJ, Degano IR, Chuquimia OD, Fotio AL, Garcia I, Fernandez C. Resistance to mycobacterial infection: a pattern of early immune responses leads to a better control of pulmonary infection in C57BL/6 compared with BALB/c mice. Vaccine. 2009;27(52):7418-27.
- Attarian R, Bennie C, Bach H, Av-Gay Y. Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin system. FEBS Letters 2009;583:3215-20.
- Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. Int J Tuberc Lung Dis. 2004;8(8):924-37.
- Barrera L. The basic of clinical bacteriology. In: Palomino JC, Leão SC, Ritacco V, editors. Tuberculosis 2007 - From basic science to patient care. 2007. p. 93-112. Available from: <http://www.tuberculosisistextbook.com>. [2010 Oct 15].
- Bonato VL, Goncalves ED, Soares EG, Santos Junior RR, Sartori A, Coelho-Castelo AA, Silva CL. Immune regulatory effect of pHSP65 DNA therapy in pulmonary tuberculosis: activation of CD8+ cells, interferon-gamma recovery and reduction of lung injury. Immunology. 2004;113(1):130-8.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22]

Brasil. Ministério da Saúde. Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2010.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(6):3684-9.

Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF, Boom WH. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. J Immunol. 2001;167(5):2734-42.

Center for Diseases Control and Prevention (CDC). Trends in Tuberculosis, 2008. Available from: <http://www.cdc.gov>. [2009 Jan 21].

Chan J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Bloom BR. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. Infect Immun. 1991;59(5):1755-61.

Clemens DL. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. Trends Microbiol. 1996;4(3):113-8.

Cole ST, Barrell BG. Analysis of the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Novartis Found Symp. 1998;217:160-77.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 1998;393(6685):537-44.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. J Exp Med. 1993;178(6):2243-7.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003;163(9):1009-21.

Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(1):59-70.

Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57:641-76.

Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG. Cutting edge: IFN-gamma regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol*. 2006;177(3):1416-20.

Dalton DK, Haynes L, Chu CQ, Swain SL, Wittmer S. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J Exp Med*. 2000;192(1):117-22.

Dankner WM, Waecker NJ, Essey MA, Moser K, Thompson M, Davis CE. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinicoepidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. *Medicine (Baltimore)*. 1993;72(1):11-37.

Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND, Venketaraman V. Characterization of a Glutathione Metabolic Mutant of *Mycobacterium tuberculosis* and Its Resistance to Glutathione and Nitroglutathione. *Journal of Bacteriology* 2006;188(4):1364-72.

de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osorio Ribeiro M, Garzon Torres MC, Llerena Polo C, Ribon W, Garcia V, Kuffo D, Asencios L, Vasquez Campos LM, Rivas C, de Waard JH. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis (Edinb)*. 2008;88(4):358-65.

Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol*. 2004;137(3):460-8.

Drobniewski F, Balabanova Y, Nikolayevsky V, Ruddy M, Kuznetsov S, Zakharova S, Melentyev A, Fedorin I. Drug-resistant tuberculosis, clinical virulence, and the dominance of the Beijing strain family in Russia. *JAMA*. 2005a;293(22):2726-31.

Drobniewski FA, Balabanova YM, Ruddy MC, Graham C, Kuznetsov SI, Gusarova GI, Zakharova SM, Melentyev AS, Fedorin IM. Tuberculosis, HIV seroprevalence and

intravenous drug abuse in prisoners. *Eur Respir J*. 2005b;26(2):298-304.

Dunn PL, North RJ. Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology, and cause mortality in mice. *Infect Immun*. 1995;63(9):3428-37.

Fattorini L, Nisini R, Fan Y, Li Y, Tan D, Mariontti S, Teloni R, Iona E, Orefici G. Exposure of BALB/c mice to low doses of *Mycobacterium avium* increases resistance to a subsequent high-dose infection. *Microbiology*. 2002;148:3173-81.

Feldmann M, Maini RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*. 2001;19:163-96.

Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(11):1387-97.

Florido M, Appelberg R. Granuloma necrosis during *Mycobacterium avium* infection does not require tumor necrosis factor. *Infect Immun*. 2004;72(10):6139-41.

Florido M, Pearl JE, Solache A, Borges M, Haynes L, Cooper AM, Appelberg R. Gamma interferon-induced T-cell loss in virulent *Mycobacterium avium* infection. *Infect Immun*. 2005;73(6):3577-86.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are necessary for protection against *M. tuberculosis* in mice. *Infect Agents Dis*. 1993;2(4):259-62.

Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol*. 2001;154(3):631-44.

Fratti RA, Chua J, Vergne I, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5437-42.

Gan H, Lee J, Ren F, Chen M, Kornfeld H, Remold HG. *Mycobacterium tuberculosis* blocks crosslinking of annexin-1 and apoptotic envelope formation on infected macrophages to maintain virulence. *Nat Immunol*. 2008;9(10):1189-97.

Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. *Tuberculosis (Edinb)*.

2008;88(6):510-7.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV, Hewinson RG. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(13):7877-82.

Gil O, Guirado E, Gordillo S, Diaz J, Tapia G, Vilaplana C, Ariza A, Ausina V, Cardona PJ. Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. Microbes Infect. 2006;8(3):628-36.

Glickman MS, Jacobs Jr WR. Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. Cell. 2001;104(4):477-85.

Gomez-Flores R, Gupta S, Tamez-Guerra R, Mehta RT. Determination of MICs for *Mycobacterium avium*-*M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. J Clin Microb. 1995;33:1842-6.

Gordon SV, Bottai D, Simeone R, Stinear TP, Brosch R. Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. Bioessays. 2009;31(4):378-88.

Grange JM. *Mycobacterium bovis* infection in human beings. Tuberculosis (Edinb). 2001;81(1-2):71-7.

Grange JM, Yates MD. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. Vet Microbiol. 1994;40(1-2):137-51.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. Anal biochem. 1982;126(1):131-8.

Green RM, Seth A, Connell ND. A Peptide Permease Mutant of *Mycobacterium bovis* BCG Resistant to the Toxic Peptides Glutathione and S-Nitrosoglutathione. Infection and Immunity. 2000;68(2):429-36.

Guenin-Mace L, Simeone R, Demangel C. Lipids of pathogenic Mycobacteria: contributions to virulence and host immune suppression. Transbound Emerg Dis. 2009;56(6-7):255-68.

Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2004;51(2):359-70.

Hargreaves DC, Medzhitov R. Innate sensors of microbial infection. *J Clin Immunol*. 2005;25(6):503-10.

Hatzinger PB, Palmer P, Smith RL, Peñarrieta CT, Yoshinari T. Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 2003;52:47-58.

Hernandez Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C. Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model. *Tuberculosis (Edinb)*. 2010;90(4):268-77.

Holckmann Mea. Anti-TNF- α therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned? *Ann Rev Immunol*. 2001;19:193.

Hughes AL, Friedman R, Murray M. Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(11):1342-6.

Jayachandran R, Gatfield J, Massner J, Albrecht I, Zanolari B, Pieters J. RNA interference in J774 macrophages reveals a role for coronin 1 in mycobacterial trafficking but not in actin-dependent processes. *Mol Biol Cell*. 2008;19(3):1241-51.

Jayachandran R, Sundaramurthy V, Combaluzier B, Mueller P, Korf H, Huygen K, Miyazaki T, Albrecht I, Massner J, Pieters J. Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*. 2007;130(1):37-50.

Junqueira-Kipnis AP, Basaraba RJ, Gruppo V, Palanisamy G, Turner OC, Hsu T, Jacobs Jr WR, Fulton SA, Reba SM, Boom WH, Orme IM. Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon- γ . *Immunology*. 2006;119(2):224-31.

Kansal RG, Gomez-Flores R, Mehta RT. Change in colony morphology influences the virulence as well as the biochemical properties of the *Mycobacterium avium* complex. *Microbial Pathogenesis*. 1998;25:203-14.

Kaufmann SH. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat*

Rev Immunol. 2001a;1(1):20-30.

Kaufmann SH, Andersen P. Immunity to mycobacteria with emphasis on tuberculosis: implications for rational design of an effective tuberculosis vaccine. Chem Immunol. 1998;70:21-59.

Kaufmann SHE. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nature. 2001b;1:20-30.

Khader SA, Cooper AM. IL-23 and IL-17 in tuberculosis. Cytokine. 2008;41(2):79-83.

Kobzik L. The lung. In: Contran RS, Kumar V, Collins, T, editors. Robins pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 1999. p. 697-755.

Lasunskaja E, Ribeiro SC, Manicheva O, Gomes LL, Suffys PN, Mokrousov I, Ferrazoli L, Andrade MR, Kritski A, Otten T, Kipnis TL, da Silva WD, Vishnevsky B, Oliveira MM, Gomes HM, Baptista IF, Narvskaya O. Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. Microbes Infect. 2010;12(6):467-75.

Lasunskaja EB, Campos MN, de Andrade MR, Damatta RA, Kipnis TL, Einicker-Lamas M, Da Silva WD. Mycobacteria directly induce cytoskeletal rearrangements for macrophage spreading and polarization through TLR2-dependent PI3K signaling. J Leukoc Biol. 2006;80(6):1480-90.

León DA, Zumárraga MJ, Jiménez Oropeza R, Gioffré AK, Bernardelli A, Orozco Estévez H, Cataldi AA, Hernández Pando R. *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. Clinical and Experimental Immunology. 2009;157:139-47.

Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, Sherman DR. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. J Infect Dis. 2003;187(1):117-23.

Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. Clin Exp Immunol. 2003;133(1):30-7.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, 3rd,

Freedman VH, Kaplan G. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α / β . Proc Natl Acad Sci U S A. 2001;98(10):5752-7.

Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, Barry C, Kaplan G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. J Interferon Cytokine Res. 2005;25(11):694-701.

Marquina-Castillo B, Garcia-Garcia L, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Bobadilla-Del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Kato-Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osornio J, Hernandez-Pando R. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. Immunology. 2009;128(1):123-33.

Martins de Sousa E, Bonfim de Bortoli F, Amaral EP, Batista AC, Liberman Kipnis T, Marques Cardoso A, Kipnis A, Junqueira-Kipnis AP. Acute immune response to *Mycobacterium massiliense* in C57BL/6 and BALB/c mice. Infect Immun. 2010;78(4):1571-81.

Matthias D. Infecções por Micobactérias. In: Beer J, editor. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: ROCA; 1998. p. 261.

Medina E, Ryan L, LaCourse R, North RJ. Superior virulence of *Mycobacterium bovis* over *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) for Mtb-resistant and Mtb-susceptible mice is manifest as an ability to cause extrapulmonary disease. Tuberculosis (Edinb). 2006;86(1):20-7.

Miller CC, Rawat M, Johnson T, Av-Gay Y. Innate protection of *Mycobacterium smegmatis* against the antimicrobial activity of nitric oxide is provided by mycothiol. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(9):3364-6.

Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohen N, Griffiths G, Moita LF, Anes E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. Cell Microbiol. 2010;12(8):1046-63.

Narvskaya O, Mokrousov I, Otten T, Vishnevskiy B. Molecular markers: application for studies of *Mycobacterium tuberculosis* population in Russia. In: Reed MM, editor. Trends in DNA Fingerprinting Research. New York, NY: Nova Science Publishers; 2005. p. 111-25.

North RJ, Ryan L, LaCourse R, Mogues T, Goodrich ME. Growth rate of mycobacteria in mice as an unreliable indicator of mycobacterial virulence. *Infect Immun*. 1999;67(10):5483-5.

Okamoto Yoshida Y, Umemura M, Yahagi A, O'Brien RL, Ikuta K, Kishihara K, Hara H, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. Essential role of IL-17A in the formation of a mycobacterial infection-induced granuloma in the lung. *J Immunol*. 2010;184(8):4414-22.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Harton M, Palanisamy G, Troudt J, Shanley C, Basaraba RJ, Orme IM. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. *J Immunol*. 2007;179(1):522-31.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, Shanley C, Harton M, Troudt J, Bai X, Basaraba RJ, Orme IM, Chan ED. Animal model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *J Leukoc Biol*. 2008;83(6):1502-11.

Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 1987;138(1):293-8.

Orme IM, Miller ES, Roberts AD, Furney SK, Griffin JP, Dobos KM, Chi D, Rivoire B, Brennan PJ. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. *J Immunol*. 1992;148(1):189-96.

Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *Lancet Infect Dis*. 2010;10(2):103-11.

Paula MO, Fonseca DM, Wowk PF, Gembre AF, Fedatto PF, Sergio CA, Silva CL, Bonato VL. Host genetic background affects regulatory T-cell activity that influences the magnitude of cellular immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunol Cell Biol*. 2010.

Pieters J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes Infect*. 2001;3(3):249-55.

Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol*. 2002;46(3):709-17.

Redford PS, Boonstra A, Read S, Pitt J, Graham C, Stavropoulos E, Bancroft GJ, O'Garra A. Enhanced protection to *Mycobacterium tuberculosis* infection in IL-10-deficient mice is accompanied by early and enhanced Th1 responses in the lung. *Eur J Immunol.* 2010;40(8):2200-10.

Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE, 3rd. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature.* 2004;431(7004):84-7.

Riley LW. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Invest.* 2006;116(6):1475-8.

Rodriguez S, Romero B, Bezos J, de Juan L, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Gonzalez S, Saez-Llorente JL, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Vet Microbiol.* 2010;141(1-2):89-95.

Rook GA, al Attiyah R. Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle.* 1991;72(1):13-20.

Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis.* 2006;86:77-109.

Sachdeva P, Misra R, Tyagi AK, Singh Y. The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*: regulation of the regulators. *FEBS J.* 2010;277(3):605-26.

Saunders BM, Frank AA, Orme IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 1999;98(3):324-8.

Sherman DR, Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Smith S. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Delta RD1 is more virulent than *M. bovis* bacille Calmette-Guerin in long-term murine infection. *J Infect Dis.* 2004;190(1):123-6.

Shrikrishna D, Rua-Domenech R, Smith NH, Colloff A, Coutts I. Human and canine pulmonary *Mycobacterium bovis* infection in the same household: re-emergence of an old zoonotic threat? *Thorax.* 2009;64:89-91.

Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* 2003;16(3):463-96.

Steyn AJ, Collins DM, Hondalus MK, Jacobs Jr WR, Kawakami RP, Bloom BR. *Mycobacterium tuberculosis* WhiB3 interacts with *RpoV* to affect host survival but is dispensable for in vivo growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(5):3147-52.

Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 1994;263(5147):678-81.

Sugawara I, Yamada H, Kazumi Y, Doi N, Otomo K, Aoki T, Mizuno S, Udagawa T, Tagawa Y, Iwakura Y. Induction of granulomas in interferon-gamma gene-disrupted mice by avirulent but not by virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Med Microbiol*. 1998;47(10):871-7.

Torgerson D. Does risk to humans justify high cost of fighting bovine TB? . *Nature*. 2008;455(23):1029.

Ullrich HJ, Beatty WL, Russell DG. Interaction of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes with the antigen presentation pathway. *J Immunol*. 2000;165(11):6073-80.

Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y, Matsuzaki G. IL-17-mediated regulation of innate and acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin infection. *J Immunol*. 2007;178(6):3786-96.

van Crevel R, Ottenhoff TH, van der Meer JW. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(2):294-309.

van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007;129(7):1287-98.

Venketaraman V, Dayaram YK, Talaue MT, Connell ND. Glutathione and Nitrosoglutathione in Macrophage Defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immunity*. 2005;73(3):1886-9.

Waters WR, Palmer MV, Nonnecke BJ, Thacker TC, Scherer CF, Estes DM, Jacobs Jr WR, Glatman-Freedman A, Larsen MH. Failure of a *Mycobacterium tuberculosis* DeltaRD1 DeltapanCD double deletion mutant in a neonatal calf aerosol *M. bovis* challenge model: comparisons to responses elicited by *M. bovis* bacille Calmette Guerin. *Vaccine*. 2007;25(45):7832-40.

Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, Lerm M. Incorporation of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. *Infect Immun.* 2008;76(7):2882-7.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2005. Geneva: World Health Organization; 2007.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2007. Geneva: World Health Organization; 2009a.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: A short update to the 2009 report. Geneva: World Health Organization; 2009b.

World Health Organizaton (WHO). Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing: WHO report 2008. Geneva: World Health Organization; 2010.

Wu S, Howard ST, Lakey DL, Kipnis A, Samten B, Safi H, Gruppo V, Wizel B, Shams H, Basaraba RJ, Orme IM, Barnes PF. The principal sigma factor sigA mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Mol Microbiol.* 2004;51(6):1551-62.

Yu K, Mitchell C, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, Chan J. Toxicity of nitrogen oxides and related oxidants on mycobacteria: *M. tuberculosis* is resistant to peroxynitrite anion. *Tuber Lung Dis.* 1999;79(4):191-8.