

**ESTUDO DA VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE CEPAS DE
Mycobacterium kansasii ISOLADAS DE PACIENTES
BRASILEIROS COM DOENÇA PULMONAR**

VINICIUS DE OLIVEIRA MUSSI

**UENF - UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE
FLUMINENSE DARCY RIBEIRO**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
FEVEREIRO - 2022**

**ESTUDO DA VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE CEPAS DE
Mycobacterium kansasii ISOLADAS DE PACIENTES
BRASILEIROS COM DOENÇA PULMONAR**

VINICIUS DE OLIVEIRA MUSSI

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Elena Lassounskaia

Coorientadora: Dr^a. Thatiana Lopes Biá Ventura Simão

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

M989

Mussi, Vinicius de Oliveira.

ESTUDO DA VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE CEPAS DE *Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES BRASILEIROS COM DOENÇA PULMONAR. / Vinicius de Oliveira Mussi. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

92 f. : il.

Inclui bibliografia.

Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Biociências e Biotecnologia, 2022.

Orientadora: Elena Lassounskaia.

Coorientadora: Thatiana Lopes Bia Ventura Simao.

1. *M. kansasii*. 2. patogenicidade. 3. modelo animal. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 570

**ESTUDO DA VIRULÊNCIA E PATOGENICIDADE DE CEPAS DE
Mycobacterium kansasii ISOLADAS DE PACIENTES
BRASILEIROS COM DOENÇA PULMONAR**

Tese apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Estadual do Norte
Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das
exigências para obtenção do título de
Doutor em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 18 de fevereiro de 2022

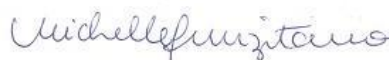
Comissão examinadora:



Dr. Milton Masahiko Kanashiro - UENF
Doutor em Biociências e Biotecnologia



Dr. João Carlos Aquino Almeida - UENF
Doutor em Ciências Biológicas (Biofísica)



Dr^a. Michelle Frazão Muzitano – UFRJ
Doutora em Química de Produtos Naturais



Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão- UFRJ
Doutora em Biociências e Biotecnologia
COORIENTADORA



Dr^a Élena Lassounskaia – UENF
Doutora em Ciências Médicas
ORIENTADORA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob coorientação da Dr^a Thatiana Lopes Biá Ventura Simão e orientação da Prof^a. Dr^a Elena Lassounskaia.

Apoio:

- UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- FAPERJ - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

Dedico esta conquista aos meus amados pais,
Eloisa (*in memoriam*) e Joel, ao meu irmão Leonardo, ao meu
avô Bichara e a todos os meus amigos que
sempre me incentivaram.

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa se encerra em minha vida e com ela a sensação de dever cumprido. Porém, sozinho não conseguiria chegar até aqui. Muitas pessoas foram importantes nessa caminhada, das quais, sempre sentirei uma enorme gratidão.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me dado força e coragem para vencer todos os obstáculos enfrentados nesses dois últimos anos. Agradeço também por ele ter colocado em minha vida pessoas maravilhosas, que além de colegas, se tornaram grandes amigos que eu levarei sempre comigo.

A UENF, por ter me acolhido, me transformado como pessoa, me proporcionando novos amigos e todo o conhecimento obtido.

À minha orientadora, Elena Lassounskaia, por todo conhecimento transmitido. Agradeço pela confiança em mim depositada, pelas palavras de motivação e o carinho com que sempre tratou seus alunos.

A minha coorientadora, Thatiana Simão (Thati), pela amizade construída nesses anos, por toda a dedicação, empenho e paciência em me ensinar. Agradeço pela confiança, por todos os conselhos e ensinamentos e pelos grandes momentos de alegria que tivemos (trabalhamos muito, mas também nos divertimos!). Essa vitória também é sua!

Ao Sanderson Calixto, um grande amigo que a vida me deu, por todos os momentos alegres que passamos juntos, por sempre ser tão prestativo e de grande generosidade.

Ao Grupo Therapy, por tornarem os meus dias mais alegres e divertidos. Por toda ajuda e amizade que sempre tiveram comigo, em especial Yasmin Viana, Guilherme Sales, Camila Couto e Ana Clara Soares.

Aos meus amigos Elenetes: Fabrício Almeida, Giliane de Souza, Bárbara Barcelos e Nina Aguiar, por todos os momentos de alegria, aprendizado, paciência e suporte nos momentos de tristeza. Ao corpo técnico administrativo do LBR, aos técnicos Verônica Lanes, Rita Mothé, Núbia Alencar, Juliana Azevedo e Fernando Lopes. Vocês se tornaram pessoas especiais e que me alegam a cada dia. Muito obrigado!

Aos amigos que fiz pela UENF, em especial Igor Augusto Cunha, Andreza Linhares, Rebeka Souza, Luiza Ayres e Rodrigo Gebara, por sempre estarem do meu lado, me apoiando e dando conselhos. Obrigado por tudo!

Agradeço aos professores Dr. Milton Kanashiro, Dr. João Almeida e Dr^a. Michelle Muzitano por participarem da minha banca de defesa. Agradeço a Dr^a. Giliane de Souza pela disponibilidade de revisar este trabalho. Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

A minha mãe Eloisa Helena de Oliveira Mussi (*in memoriam*) que sempre me apoiou em todos os momentos difíceis, sempre me incentivando a estudar e lutar pelos meus objetivos. Agradeço por seus conselhos, seus puxões de orelhas e por ter me amado incondicionalmente. Infelizmente não podemos nos ver agora, mas acredito que aonde você estiver, estará muito feliz e orgulhosa por mais essa vitória alcançada em minha vida. Mãe te amo!

Ao meu pai Joel Mussi e meu irmão Leonardo Mussi, por estarem sempre me apoiando em todos os momentos difíceis. Agradeço também por serem meus amigos, companheiros e pessoas que eu posso contar em todos os momentos. Muito obrigado!

Ao meu avô Bichara Mussi, minha madrinha Simone de Oliveira e padrinho Paulo Souza (Paulinho), minha prima Laisa de Oliveira e Diogo de Oliveira por estarem sempre presentes em minha vida e pelo apoio em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Micobactérias.....	01
1.2. <i>Mycobacterium kansasii</i>	05
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	09
1.4. Resposta imune contra micobactérias.....	11
1.5. Virulência micobacteriana.....	18
1.6. Sequenciamento completo do genoma e genotipagem de espécies de <i>M. tuberculosis</i> e <i>M. kansasii</i> relacionados à doença pulmonar.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
3.1. Objetivo geral.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Cultura celular.....	28
4.2. Obtenção e preparo da cultura estoque e do cultivo micobacteriano.....	28
4.3. Avaliação das cepas de <i>M. kansasii</i> quanto a secreção da proteína ESAT-6 em cultura bacteriana por <i>Western blotting</i>	29
4.4. Morfologia das colônias.....	30
4.5. Infecção da cultura de macrófagos.....	30
4.6. Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano	31
4.7. Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados por isolados clínicos de <i>M. kansasii</i>	32
4.8. Obtenção do <i>Ranking</i> de virulência entre os isolados clínicos estudados.....	32

4.9. Avaliação da ativação de caspase-1 em macrófagos infectados pelas cepas de <i>M. kansasii</i> por <i>Western blotting</i>	33
4.10. Animais.....	33
4.11. Infecção experimental dos camundongos.....	34
4.12. Obtenção de células do pulmão.....	35
4.13. Análise macroscópica e histológica dos pulmões.....	36
4.14. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios.....	37
4.15. Análises estatísticas.....	38
4.16. Conduta de trabalho.....	38
4.17. Modelo de pesquisa.....	38
5. RESULTADOS	40
5.1. Morfologia das colônias de <i>M. kansasii</i>	40
5.2. Seleção das cepas <i>M. kansasii</i> para avaliação da virulência no modelo <i>in vivo</i>	41
5.3. Avaliação da morbidade e mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de <i>M. kansasii</i>	42
5.4. Avaliação macroscópica e histológica dos pulmões.....	44
5.5. Análise da produção de citocinas e óxido nítrico pelas células dos pulmões dos animais infectados com cepa de <i>M. kansasii</i>	50
5.6. Estudo da produção de IL-1 β e ativação de inflamassoma em macrófagos infectados <i>in vitro</i>	53
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	64
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
9. ANEXO	74

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1	Características morfológicas de colônias de <i>M. kansasii</i> e <i>M. tuberculosis</i> em meio de cultivo sólido na presença de luz.....	06
Figura 2	Classificação das cepas de <i>M. kansasii</i> do subtipo I ao VI.....	09
Figura 3	Fotomicrografia de uma lâmina de biópsia de pulmão de paciente com necrose caseosa.....	10
Figura 4	Representação esquemática da migração de células dendríticas e seu papel na ativação e migração de células Th1 para o pulmão em resposta a infecção micobacteriana...	14
Figura 5	Representação esquemática da constituição e organização do granuloma.....	15
Figura 6	Representação esquemática da influência dos fatores regulatórios no ambiente pulmonar da infecção micobacteriana.....	18
Figura 7	Imagem ilustrativa de fatores de virulência de micobactérias associados a parede celular.....	19
Figura 8	Representação esquemática dos lipídeos presentes na membrana externa da parede celular das micobactérias.....	20
Figura 9	Árvore filogenética de 12 isolados clínicos brasileiros de <i>M. kansasii</i> a partir da prospecção de SNPs pelo método de distância de Neighbour-Joining em relação à similaridade genômica com a cepa de referência ATCC 12478.....	25

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 10	Fluxograma da sequência experimental.....	39
-----------	---	----

RESULTADOS

Figura 11	Variação da morfologia das colônias de <i>M. kansasii</i> em comparação a cepa <i>Mycobacterim tuberculosis</i> M299.....	40
Figura 12	Morbidade e mortalidade de camundongos após infecção com cepas de <i>M. kansasii</i>	43

Figura 13	Alterações macropatológicas nos pulmões de camundongos infectados com cepas de <i>M. kansasii</i>	44
Figura 14	Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos infectados com a cepa 6849 de baixa virulência e cepa 8835 de alta virulência	46
Figura 15	Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos infectados com a cepa 10953 de <i>M. kansasii</i> altamente virulenta.....	48
Figura 16	Análise morfométrica da patologia pulmonar em animais infectados com cepas de <i>M. kansasii</i>	50
Figura 17	Análise da produção de citocinas no sobrenadante da cultura <i>ex vivo</i> de células dos pulmões dos animais infectados com cepa de <i>M. kansasii</i>	52
Figura 18	Análise da produção de NO no sobrenadante da cultura <i>ex vivo</i> de células dos pulmões dos animais infectados com cepa de <i>M. kansasii</i>	53
Figura 19	Avaliação da produção de IL-1 β em macrófagos infectados pelas cepas de <i>M. kansasii</i>	55
Figura 20	Expressão de caspase-1 nos macrófagos J774A.1 infectados pelas cepas de <i>M. kansasii</i>	56
Figura 21	Capacidade das cepas de <i>M. kansasii</i> secretar ESAT-6 durante cultivo bacteriano em meio líquido.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudos clínicos e epidemiológicos realizados no Brasil entre 1998-2013 acerca da incidência de casos de MNT e de casos de doença pulmonar vinculados.....	05
Tabela 2	Índice de virulência relativa dos isolados clínicos de <i>M. kansasii</i> em comparação a cepa de referência 12478 (ATCC) avaliado no modelo de macrófagos infectados <i>in vitro</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACK – Tampão de lise de eritrócitos
- ADC – Albumina, dextrose e catalase
- AECs – Células epiteliais das vias aéreas
- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- AMs – Macrófagos alveolares
- ASC – Proteína *speck-like* associada à apoptose
- ATCC – Coleção americana de culturas típicas
- ATP – Adenosina trifosfato
- ATS/ADSA – Sociedade Torácica Americana / Sociedade de Doenças Infecciosas da América
- B/NALTs – Tecidos linfoides associados ao brônquio ou nasofaringe
- BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
- BSA – Albumina bovina sérica
- CFP-10 – Proteína do filtrado de cultura 10
- CFU – Unidade formadora de colônia
- CLP – Lectina tipo C
- CTL – Controle
- D.O. – Densidade óptica
- DAMP – Padrões moleculares associados à danos
- DCs – Células dendríticas
- DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica
- EAI – Leste Africano-Indiano
- EPIs – Equipamentos de proteção individual
- ESAT-6 – Alvo Antigênico Precoce Secretado de 6 KDa
- ESX-1 – Sistema de secreção 1 de ESAT-6
- HE – Hematoxilina-eosina
- i.t. – Intratraqueal
- IFN- γ – Interferon gama
- IL-1 – Interleucina 1
- IL-10 – Interleucina 10
- IL-12 – Interleucina 13
- IL-1 β – Interleucina 1 beta

- IL-33 – Interleucina 33
- IL-4 – Interleucina 4
- LAM – Latino-Americano-Mediterrâneo
- LAM – Lipoarabinomanana
- LDH – Lactato desidrogenase
- LPS – Lipopolissacarídeo
- LTBI – Infecção TB latente
- MAC – Complexo *Mycobacterium avium*
- MAITs – Célula T invariante da mucosa
- MDR-TB – TB Multidroga-resistente
- MiSI – Identificador de Espécies Microbianas
- Mkan – *Mycobacterium kansasii*
- MMPs – Metaloproteinases da matriz extracelular
- MNT – Micobactéria não-tuberculosa
- MOI – Multiplicidade de infecção
- Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- NK – Célula Natural Killer
- NKG2D – Receptor de células Natural Killer tipo 2D
- NKp – Proteína de célula Natural Killer
- NKTs – Célula T Natural Killer
- NLRP3 – Família NLR, domínio de pirina contendo- 3
- NO – Óxido nítrico
- NOD2 – Domínio de oligomerização de nucleotídeo 2
- OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- p.i. – Pós-infecção
- PAMP – Padrões moleculares associados aos patógenos
- pAPCs – Células apresentadoras de antígenos profissionais
- PBS – Tampão fosfato de sódio
- PCR – Reação em cadeia da polimerase
- PDIMs – Dimicocerosatos de fitiocerol
- PGE₂ – Prostaglandina E2
- PGL – Glicolipídeos fenólicos
- PPD – Derivado proteico purificado

- PRR – Receptores de reconhecimento padrão
- ROS – Espécie reativa de oxigênio
- SDS – Dodecil sulfato de sódio
- SFB – Soro fetal bovino
- SLs – Sulfolipídeos expostos à superfície
- SNP – Polimorfismos de base única
- SPs – Proteínas surfactantes
- TB – Tuberculose
- TBST – Tampão salino tamponado com Tris
- TCAR – Tomografia computadorizada de alta resolução
- TCD4+ – Linfócitos T CD4⁺
- TCD8+ – Linfócitos T CD8⁺
- TGF- β – Fator de crescimento transformador beta
- TLRs – Receptores Toll-like
- TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
- UV – Ultravioleta
- WGS – Sequenciamento completo do genoma
- ZN – Ziehl Nielsen

RESUMO

A incidência de casos de doença pulmonar causada por micobactérias não-tuberculosas (MNT) em humanos tem aumentado ao longo das décadas e *M. kansasii* (Mkan) está entre as MNT mais patogênicas. Diferentemente da maioria de MNTs patogênicas, Mkan infecta indivíduos imunocompetentes induzindo uma doença pulmonar semelhante à TB, que leva a patologia cavitária em casos mais severos. A ausência de modelos animais que reproduzam a doença pulmonar necrótica em humanos dificulta os estudos de virulência e patogenicidade. Deste modo, estabelecemos novo modelo murino que reproduz os principais elementos patológicos da doença em humanos. Com base nos resultados de avaliação de virulência de onze isolados clínicos de Mkan no modelo de macrófagos infectados *in vitro*, foram selecionadas cinco cepas, incluindo as cepas de maior e menor virulência em comparação a cepa de referência (cepa Mkan 12478, ATCC), e submetidas para análise *in vivo*. Os resultados de infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6 demonstraram que as cepas Mkan de maior virulência induziram doença pulmonar progressiva em camundongos, formando grandes granulomas caseosos encapsulados em 120-150 dias após a infecção, enquanto a cepa de baixa virulência foi eliminada dos pulmões em 40 dias de infecção. Duas cepas demonstraram virulência aumentada, causando morte prematura nos animais infectados, associada a pneumonia extensa e induzindo uma maior produção de citocinas e NO no pulmão. Todos os isolados de Mkan capazes de induzir a progressão da doença exibiram o morfotipo de colônia rugosa (R), diferentemente das cepas de menor virulência com colônias lisas (morfotipo S). A análise de sequência genômica dos isolados de Mkan detectou SNPs em genes que podem ser responsáveis pelas alterações da parede celular associadas ao morfotipo rugoso e pela expressão e secreção de fatores de virulência por essas cepas. Estudo da interação dessas cepas com macrófagos em cultura demonstrou que as cepas mais virulentas com crescimento intracelular mais rápido e elevada indução de morte celular, foram menos potentes na ativação do inflamassoma nestas células, reduzindo seu potencial microbicida.

Palavras-chaves: *M. kansasii*, patogenicidade, modelo animal.

ABSTRACT

The incidence of non-tuberculous mycobacteria (NTM) pulmonary infections in humans have raised in recent decades, among them *M. kansasii* (Mkan) is one of the most pathogenic. Unlike most pathogenic NTMs, Mkan infects immunocompetent individuals as well, inducing a TB-like lung disease that leads to cavitary pathology in more severe cases. The lack of animal models that reproduce human-like lung disease, associated with the necrotic lung pathology, impairs studies of *M. kansasii* virulence and pathogenicity. In this work, we established a new murine model that reproduces the main pathological elements of the disease in humans. Based on the results of the Mkan virulence evaluation in the in vitro model of macrophage infection, five strains, including the strains of higher and lower virulence compared to that of the reference strain (strain Mkan 12478, ATCC), were selected and submitted for analysis *in vivo*. The results of intratracheal infection of C57BL/6 mice demonstrate that the Mkan strains of higher virulence were able to induce a progressive lung disease, leading to the formation of large encapsulated caseous granulomas in 120-150 days after infection, while the low virulence strain was cleared from the lungs by day 40. Two strains demonstrated increased virulence, causing premature death in infected animals, associated with extensive pneumonia and increased production of cytokines and NO in the lung. All Mkan isolates that were able to induce disease progression exhibited the rough colony morphotype (R), unlike the lower virulence strains displaying smooth S-type colonies. Genomic sequence analysis of the Mkan isolates detected genetic polymorphisms in genes that can be responsible for the cell wall changes associated with R morphotype and for the expression and secretion of virulence factors by mycobacteria. Study of the interaction of these strains with macrophages in culture showed that the most virulent strains with faster intracellular growth and higher induction of cell death were less potent in activating the inflammasome in these cells, reducing their microbicidal potential.

Keywords: *M. kansasii*, pathogenicity, animal model.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Micobactérias

As micobactérias são micro-organismos com forma bacilar e com dimensões que variam de 0,2 µm a 0,6 µm de largura e 1 µm a 10 µm de comprimento. Eles são bacilos delgados, retos ou ligeiramente curvos, pleomórficos, aeróbios ou microaerófilos e imóveis. As espécies, em sua maioria, são saprófitas, vivem e replicam-se em ambientes naturais, ao passo que uma pequena parcela adapta-se ao ambiente intracelular, tornando-se patógenos, preferencialmente de vertebrados superiores (LEÃO *et al.*, 2004).

Embora inicialmente classificadas como gram-positivas, as micobactérias não são devidamente coradas pela técnica de Gram, mas pelas técnicas de Ziehl-Neelsen e de Kinyoun. Ambas as técnicas utilizam a carbol-fucsina que confere coloração vermelha às micobactérias. Por resistirem ao descoloramento subsequente com solução álcool-ácido, receberam a designação de “bacilos álcool-ácido resistentes” (BAAR) (WILDNER *et al.*, 2011).

A parede celular micobacteriana é altamente complexa, composta em sua maioria por alto teor de lipídeos o que dificulta a entrada de nutrientes culminando no crescimento micobacteriano lento, contudo aumenta a resistência a processos de descoloração e degradação enzimática. A variação da proporção dos componentes da parede celular em diferentes espécies de micobactérias afeta a patogenicidade e a virulência, sendo, portanto a parede celular micobacteriana alvo de vários agentes terapêuticos (GROENEWALD *et al.*, 2014).

O gênero *Mycobacterium* é formado por micobactérias tuberculosas, espécies pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, incluindo *M. bovis-BCG*) e pelas micobactérias não-tuberculosas (MNT), que geralmente são bactérias oportunistas ou ambientais (UEKI *et al.*, 2005).

Os primeiros relatos de MNT surgiram logo após a descoberta do *M. tuberculosis* por Robert Koch em 1882, principal agente causador da tuberculose (TB). Robert Koch foi um médico alemão que após descobrir a existência de *M. tuberculosis* (Mtb), foi capaz de cultivá-lo fora do organismo humano, conseguindo induzir a doença em animais se utilizando deste cultivo. Até a

década de 50, não havia muitos estudos acerca dessas micobactérias, e elas eram classificadas como micobactérias atípicas ou então anônimas (SHAO *et al.*, 2015). Atualmente já foram descritas mais de 200 espécies de MNT, sendo 140 espécies patogênicas para humanos e animais e 60 espécies potencialmente patogênicas. Dentre as patogênicas podemos destacar as micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC), *M. kansasii*, *M. marinum* e *M. goodii* (MATSUMOTO *et al.*, 2019).

As micobactérias pertencentes ao grupo MNT, podem ser classificadas de acordo com a patogenicidade, em potencialmente patogênicas e não-patogênicas, e também segundo sua taxa de crescimento, crescimento rápido (antes de 7 dias) ou lento (em sete dias ou mais) (JOHNSON e ODELL, 2014).

As MNT potencialmente patogênicas podem acarretar diversas formas de doença, até mesmo a forma disseminada, atingindo os pulmões, pele, gânglios e articulações (UEKI *et al.*, 2005). As MNT potencialmente patogênicas que mais acometem os seres humanos são as pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC) e posteriormente a *M. kansasii* (MORIMOTO *et al.*, 2014).

Apesar do fato das MNT serem disseminadas no ambiente e a exposição a esses organismos ser em sua maioria inevitável, a doença pulmonar por MNT é relativamente incomum, sugerindo que os mecanismos de defesa do hospedeiro são suficientes para prevenir o desenvolvimento da infecção e que os indivíduos que desenvolvem a doença pulmonar provavelmente apresentam maior suscetibilidade específica. Indivíduos acometidos por doenças que ocasionam algum tipo de dano aos pulmões, como a fibrose cística, bronquiectasia, discinesia ciliar primária, doença pulmonar obstrutiva crônica, tuberculose prévia e pneumoconiose, são mais predispostos à doença pulmonar por MNT. Fatores como, estado de imunossupressão relacionado, por exemplo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, transplante ou uso de inibidor do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), também estão associados ao maior acometimento por MNT (KOH, 2017).

O diagnóstico das infecções causadas por MNT requer a avaliação da presença de sintomas, anormalidades radiológicas e cultivo microbiológico, em conjunto com a exclusão da possibilidade da presença de outro agente etiológico e de análises por meio de métodos genéticos e moleculares. Nos casos de

infecção disseminada, a cultura do sangue em meios específicos para micobactérias também é realizada (KHALEDI *et al.*, 2016).

No caso de infecções pulmonares, a *American Thoracic Society* (ATS) juntamente com a *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) padronizaram um conjunto de critérios para diferenciar um acidental isolamento de MNT de condições não mórbidas de uma doença pulmonar real. A fim de confirmar o diagnóstico de doença pulmonar por MNT, devem ser analisados três critérios clínicos: opacidade nodular ou cavitária na radiografia do tórax, imagem multifocal e verificação de bronquiectasia com pequenos nódulos múltiplos através de uma tomografia computadorizada de alta resolução (TCAR) e exclusão de outros diagnósticos. Em relação aos critérios microbiológicos para diagnóstico diferencial micobacteriano, deve ser confirmado o cultivo positivo a partir de pelo menos duas amostras de escarro expectorado ou obter cultivo positivo de pelo menos uma lavagem brônquica ou biópsia pulmonar transbrônquica com características histopatológicas micobacterianas e cultivo positivo para MNT (PORVAZNIK *et al.*, 2016).

As MNT podem se organizar em biofilmes, uma estratégia de sobrevivência bem sucedida para estas micobactérias ambientais. A formação e adaptação ao ambiente do biofilme possibilita a tolerância a elevadas concentrações de fármacos e a modulação do sistema imune do hospedeiro, assim como permite a resistência ambiental a altas temperaturas e níveis de pH relativamente baixos (SOUSA *et al.*, 2015).

O tratamento das infecções causadas por MNT, em geral, é bastante complexo, e varia de acordo com o agente causal e extensão patológica da doença, sendo utilizadas diferentes combinações de antibióticos. A terapia pode durar anos, em função de diversos fatores, tais como o diagnóstico tardio e ineficaz, ausência de identificação adequada da espécie de MNT, baixa adesão e relutância do paciente ao tratamento, baixa tolerabilidade a elevadas doses dos fármacos utilizados, cepas resistentes a fármacos e formação de biofilmes pelas MNT. Diante destes fatores, em alguns casos, a cura não é possível (COWMAN *et al.*, 2012; RYU *et al.*, 2016).

A notificação sistemática dos casos diagnosticados de MNT geralmente não é realizada devido a doença não ser classificada como de notificação obrigatória, o que dificulta os estudos epidemiológicos sobre MNT em todos os

países. As taxas de infecção pulmonar por MNT aumentam com a idade e diferem consideravelmente entre os vários países. Muitos estudos sugeriram um aumento nas taxas de prevalência de MNT nas últimas quatro décadas. Os dados dos EUA sugerem que a prevalência atual de cultura positiva para MNT varia entre 1,4 e 6,6/100.000 indivíduos, enquanto os dados do Reino Unido sugerem que a incidência de cultura positiva para MNT aumentou de 4/100.000 para 6,1/100.000 indivíduos entre 2007 e 2012. Um estudo do Canadá relatou um aumento significativo na prevalência de MNT de 29,3 casos/100.000 em 1998-2002 para 41,3/100.000 indivíduos testados em 2006-2010 (SHARMA e UPADHYAY, 2020).

Na maioria dos países em desenvolvimento com prevalência elevada de tuberculose (TB), a identificação e registro dos casos de infecções provocadas por MNT entre imunocompetentes estão subestimados, devido à baixa realização da rotina de cultivo das espécies a partir de amostras suspeitas e a dificuldade de obtenção do diagnóstico diferencial da TB (CASSIDY *et al.*, 2009; DE MELLO *et al.*, 2013). No Brasil, foram realizados alguns estudos clínicos e epidemiológicos visando identificar a incidência de MNT em algumas regiões do nosso país (**Tabela 1**). No Estado do Rio de Janeiro foi demonstrado que cerca de 60% dos pacientes diagnosticados com infecção pulmonar por MNT, entre 1993 e 2011, foram inicialmente diagnosticados e tratados de forma empírica (sem confirmação microbiológica) para TB, servindo de alerta para as autoridades de saúde (DE MELLO *et al.*, 2013).

Tabela 1 - Estudos clínicos e epidemiológicos realizados no Brasil entre 1998-2013 acerca da incidência de casos de MNT e de casos de doença pulmonar vinculados.

Autores	Estado brasileiro	Período	Pacientes, n	Sexo masculino, %	Média de idade, anos	Espécies predominantes	Preencheram os critérios para doença pulmonar por MNT ^{a,b}
Matos et al.	Bahia	1998-2003	19	68,4	48.8	<i>M. chelonae</i> / <i>M. abscessus</i> / MAC/ <i>M. kansasii</i>	14 (74,4)
Fusco da Costa et al.	Pará	2010-2011	38	27,6	52	<i>M. massiliense</i> / <i>M. avium</i> / <i>M. intracellulare</i>	29 (76,3)
Lima et al.	Rondônia	2008-2010	45	64,5	50	<i>M. abscessus</i> / <i>M. avium</i> / <i>M. fortuitum</i>	19 (46,7)
de Mello et al.	Rio de Janeiro	1993-2011	174	72,1	55	<i>M. kansasii</i> / MAC/ <i>M. abscessus</i>	101 (58)
Presente estudo	Rio Grande do Sul	2003-2013	100	51,0	54.6	MAC/ <i>M. kansasii</i> / <i>M. abscessus</i>	74 (74,0)

MNT: micobactérias não tuberculosas; e MAC: *Mycobacterium avium* complex (complexo *M. avium*).

^aValores expressos em n (%).

Fonte: CARNEIRO *et al.*, 2018.

1.2. *Mycobacterium kansasii*

Mycobacterium kansasii (Mkan) é uma micobactéria não tuberculosa (MNT), ambiental, facilmente encontrada em reservatórios de água e que é prontamente reconhecida com base em sua fotocromogenicidade característica. Quando exposto à luz, o bacilo produz um pigmento de coloração amarela, em decorrência da formação de carotenoides provocados por raios UV (**Figura 1**).

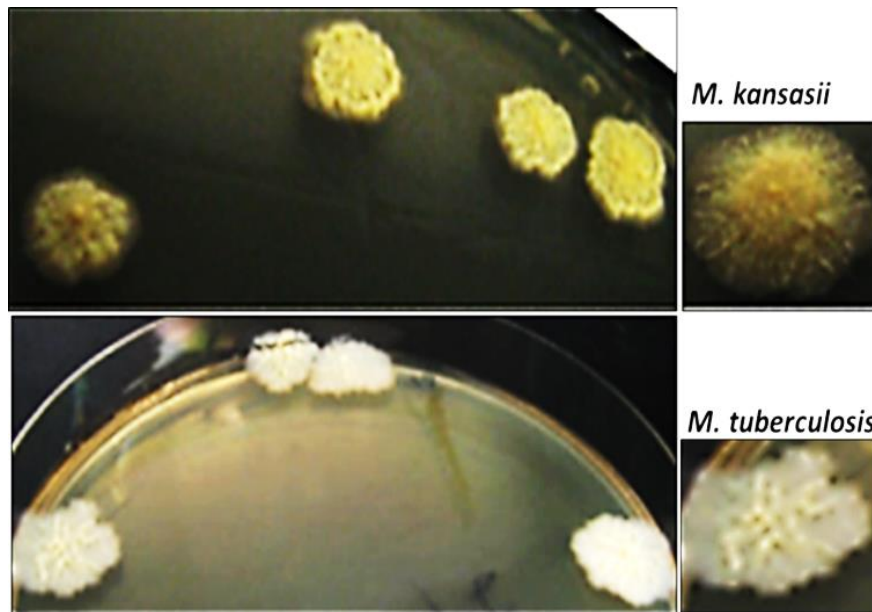


Figura 1 – Características morfológicas de colônias de *M. kansasii* e *M. tuberculosis* em meio de cultivo sólido na presença de luz. As colônias de Mkan ficam amareladas na presença de raios UVs (Adaptado de WANG *et al.*, 2015).

Buhler e Pollack descreveram pela primeira vez esta micobactéria de crescimento lento em 1953. Sob microscopia óptica, Mkan aparece como bastonetes retangulares grossos, mais longos que os de Mtb (AKRAM e RAWLA, 2021).

Similar às demais micobactérias, Mkan são organismos aeróbicos, não móveis e possuem parede celular rica em lipídeos e ácidos micólicos (JOHNSON e ODELL, 2014). Uma diferença da parede celular de Mkan e Mtb é a presença de lipooligosacarídeos (LOS), Mtb não apresenta LOS em sua parede celular (NATARAJ *et al.*, 2015). Devido à espessura e composição de parede celular, Mkan é um BAAR, resistente a metais pesados, desinfetantes e pirazinamida (SADAPHAL *et al.*, 2008). Os glicolídeos fenólicos (PGL) podem estar presentes na parede micobacteriana de acordo com a espécie e ser composto de um a quatro desoxiaçúcares O-metilados. Foi descrito que PGLs são produzidos por *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. bovis* e algumas cepas de *M. tuberculosis*. Reed *et al.* (2004) descreveu que a produção de PGL em Mtb está associada ao fenótipo hipervirulento exibido por um subconjunto de isolados desta cepa pertencente à família W-Beijing.

M. kansasii é uma micobactéria de crescimento lento com melhor taxa de crescimento a 32°C, embora também possa ser cultivada a 37°C. O cultivo micobacteriano pode ser facilmente realizado em vários meios de cultura líquidos e sólidos, incluindo meio Bactec, ágar Middlebrook 7H10 e ágar Lowenstein-Jensen, e levar até 6 semanas para alcançar a fase logarítmica. As suspensões de Mkan em meio líquido favorecem o seu crescimento em menor tempo, podendo duplicar a concentração inicial de bacilos em poucos dias. Enquanto o cultivo em meio sólido permite o isolamento e visualização de características morfológicas das colônias, facilitando a sua diferenciação de Mtb. As colônias da cultura de Mkan podem variar a morfologia entre liso ou rugoso, aspecto úmido e com pigmentação amarela quando em contato com raios UVs (JOHNSTON *et al.*, 2017).

Em contraste com outras MNT, Mkan raramente é isolado de fontes naturais de água ou do solo. Os principais reservatórios encontrados são água da torneira, chuveiro e encanamentos. A transmissão também pode ocorrer por meio de aspiração de conteúdo gástrico ou infecção localizada na pele (SEISCENTO *et al.*, 2005). A infecção é adquirida provavelmente por meio de aerossóis gerados, com baixa infectividade em regiões de endemicidade. Acredita-se que a transmissão de humano para humano não ocorra, apesar da existência de dois relatos de casos de transmissão entre pessoas da mesma família que viviam na mesma residência. Esses casos parecem refletir um ambiente compartilhado, predisposições hereditárias ou suscetibilidade, em vez de transmissão de humano para humano (JOHNSTON *et al.*, 2017).

M. kansasii é a segunda MNT que causa mais doença em humanos, antecedida apenas por MNT do complexo *Mycobacterium avium* (MAC) (GUTIERREZ e SOMOSKOVI, 2014) e acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos tais como pacientes com AIDS, insuficiência renal, alcoólatras, com neoplasias, transplantados com uso crônico de corticosteroides, TNF- α e leucemia. Além disso, pacientes que apresentam alterações estruturais pulmonares, associadas à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bronquiectasia, tabagismo, sequelas de TB prévia e fibrose cística são mais susceptíveis a infecção por Mkan (GRIFFITH, 2007). Indivíduos imunocompetentes tais como idosos em geral, trabalhadores com maior contato com fontes de água ou com o solo (mineiros, indivíduos do setor agrário e de

manutenção de piscinas) que não apresentam alterações pulmonares também são mais suscetíveis a infecção por Mkan (JOHNSTON *et al.*, 2017).

A infecção por Mkan frequentemente se apresenta como uma síndrome clínica indistinguível da TB. A maioria dos pacientes apresenta doença pulmonar sintomática por vários meses antes da confirmação do diagnóstico. Os sintomas pulmonares mais comuns são tosse, dor torácica, hemoptise não maciça e dispneia. A doença disseminada é uma apresentação incomum em pacientes HIV-negativos e geralmente está associada à imunossupressão. A doença extrapulmonar por Mkan não é frequente e atinge principalmente os linfonodos, a pele e os sistemas musculoesquelético e geniturinário (JOHNSTON *et al.*, 2017). Em indivíduos imunocompetentes suscetíveis, o bacilo causa doença pulmonar crônica similar a TB, resultando em cavitação em mais de 70% dos casos (MATVEYCHUK *et al.*, 2012).

O diagnóstico da infecção por Mkan, deve ser diferenciado da TB, requerendo o isolamento da cultura bacteriana e identificação da micobactéria, embora os testes mais utilizados, a baciloscopia e o exame de raio X pulmonar não discriminem essas doenças. Testes bioquímicos específicos podem ser utilizados para identificação do bacilo isolado, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), que possibilita a detecção e identificação da micobactéria tanto na cultura, quanto no escarro do paciente (KOIRALA, 2020). O diagnóstico diferencial entre infecções causadas por Mkan e Mtb é fundamental para que o tratamento seja adequado, uma vez que os fármacos anti-TB e protocolos do tratamento são distintos para ambas as infecções (LIM *et al.*, 2013).

A *American Thoracic Society/ Infectious Diseases Society of America* (ATS/IDSA) orienta a utilização de rifampicina, etambutol, isoniazida e piridoxina até o resultado da cultura de escarro ser negativo por 12 meses, demonstrando que o tratamento de infecções por Mkan se apresenta como maior desafio que o tratamento da TB que ocorre em geral por 6 meses. Em casos de infecção por Mkan resistentes a rifampicina, a substituição da mesma ocorre dependendo da susceptibilidade *in vitro* por claritromicina, azitromicina, moxifloxacina, sulfametoxazol ou estreptomicina (KOIRALA, 2020).

Estudos genéticos de isolados clínicos e ambientais de Mkan demonstraram heterogeneidade em relação a espécie que pode ser dividida em

seis subtipos geneticamente distintos (I-VI) por genotipagem. Análises genômicas comparativas recentes mostraram que esses subtipos são representados com mais precisão como subespécies intimamente relacionadas: *M. kansasii* (I), *M. persicum* (II), *M. pseudokansasii* (III), *M. ostraviense* (IV), *M. innocens* (V) e *M. attenuatum* (VI); juntamente com *M. gastri* formando o complexo *M. kansasii* (**Figura 2**). Os isolados clínicos obtidos de pacientes com doença pulmonar em distintas regiões geográficas do mundo são compostos quase exclusivamente por cepas do subtipo I, atualmente consideradas Mkan em sentido estrito, sugerindo melhor adaptação ao hospedeiro e apresentam maior virulência que os demais subtipos (JAGIELSKI *et al.*, 2020).

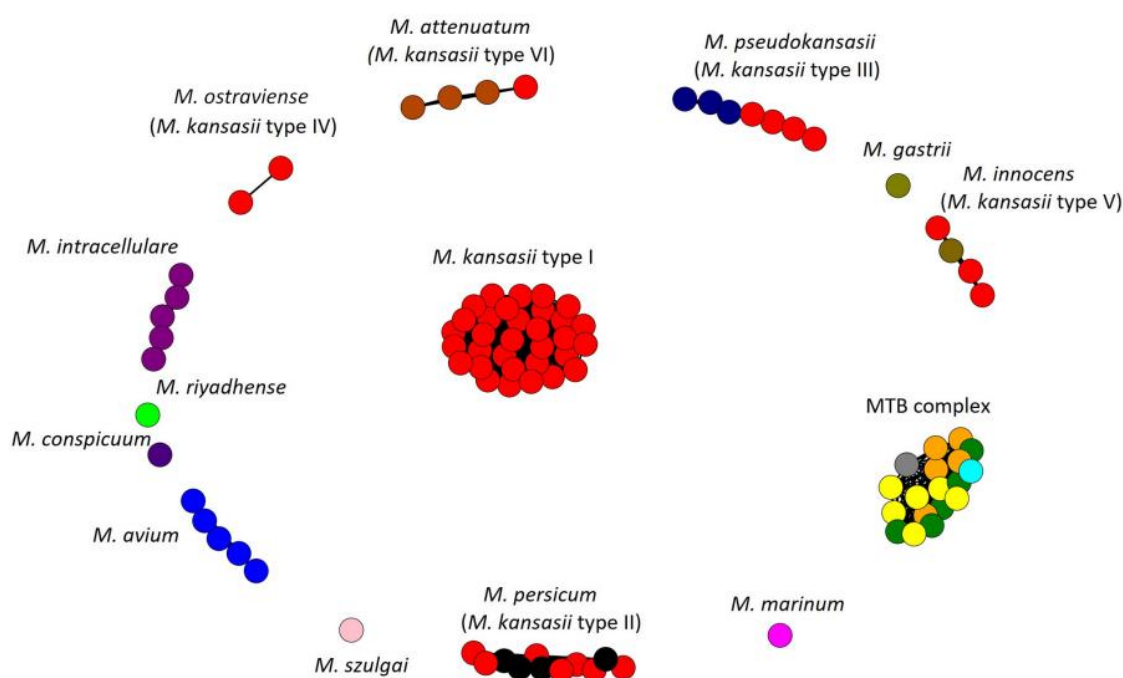


Figura 2 – Classificação de cepas de *M. kansasii* do subtipo I ao VI. Classificação baseada no método *Microbial Species Identifier* (MiSI). Cada cor representa uma espécie, enquanto cada círculo representa um genoma dessa espécie (JAGIELSKI *et al.*, 2020).

1.3. *Mycobacterium tuberculosis*

Em 2020, a tuberculose (TB) foi a segunda causa de mortalidade entre as doenças infecciosas em todo o mundo, só atrás da COVID-19, presente principalmente em países em desenvolvimento. Foram estimados 10 milhões de novos casos e 1,3 milhão de mortes em 2020 (WHO, 2021). O aparecimento de

cepas *Mtb* multidroga-resistentes (MDR-TB) ameaça o controle da TB favorecendo a rápida progressão e transmissão da doença (ZUMLA *et al.*, 2015).

Cepas de *Mtb* hipervirulentas promovem severa patologia pulmonar com presença de alta carga bacilar (AMARAL *et al.*, 2014), desenvolvimento de necrose caseosa (**Figura 3**) e formação de cavernas que geram danos permanentes no pulmão e culminam na incapacidade funcional do órgão (ZUMLA *et al.*, 2015). A morte necrótica favorece a disseminação micobacteriana para novas células permissíveis, induzindo novos ciclos de replicação, sugerindo uma vantagem intrínseca em termos de resistência a fármacos, na transmissibilidade, progressão da TB latente para ativa, e cronicidade da doença (MOKROUSOV, 2013).

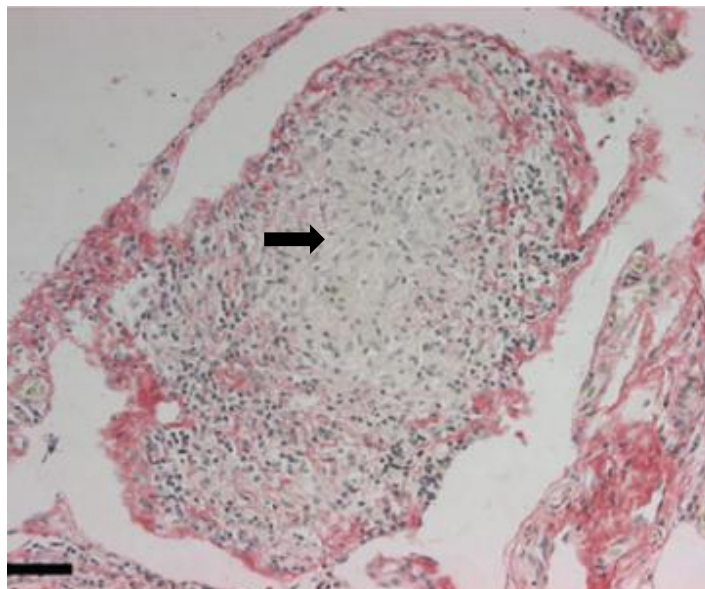


Figura 3 – Fotomicrografia de uma lâmina de biópsia de pulmão de paciente com necrose caseosa. Corte histológico de biópsia de paciente com tuberculose onde é possível ver a presença de necrose caseosa (seta preta) dentro do granuloma (Adaptado de AL SHAMMARI *et al.*, 2015).

O *Mtb* possui crescimento lento e colônias densas e compactas, com coloração esbranquiçada e aspecto rugoso (MURPHY *et al.*, 2017). As cepas de *Mtb* podem ser agrupadas em famílias epidemiologicamente importantes segundo os padrões de spoligotipagem (tipagem de espaçadores oligonucleotídeos), um método que detecta sequências de DNA espaçadoras na região DR do genoma das cepas de *Mtb*. As sete linhagens de *Mtb* são: *Beijing*,

Haarlem, S, T, X, *East African-Indian* (EAI) e *Latin American-Mediterranean* (LAM) (KATO-MAEDA *et al.*, 2011).

A família LAM está presente nos cinco continentes, tendo grande incidência na América do Sul e Brasil (cerca de 50% das cepas presentes) e 58% no Estado do Rio de Janeiro (LAZZARINI *et al.*, 2007). A família *Beijing* é atualmente mais prevalente nos países asiáticos e Rússia e tem demonstrado aumento de sua prevalência em várias regiões do mundo. Frequentemente estas cepas estão associadas com resistência a fármacos anti-TB (RAMAZANZADEH e SAYHEMIRI, 2014).

A OMS preconiza 6 meses de tratamento para os casos de TB sensível aos fármacos rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol. Nos casos de desenvolvimento de resistência, as taxas de sucesso do tratamento e de cura são muito baixas, envolvem a utilização de fármacos de segunda linha, incluindo antibióticos injetáveis, mais caros e tóxicos, além da duração da terapia ser de pelo menos 18 a 24 meses (KOLLOLI e SUBBIAN, 2017).

1.4. Resposta imune contra *M. kansasii*

A resposta imune contra Mkan ainda não está totalmente descrita, mas foi sugerido que em um hospedeiro sadio a resposta imune inata na maioria das vezes controla o crescimento bacilar ou mesmo eliminar o bacilo de menor virulência. Em indivíduos suscetíveis a micobactérias, a infecção por Mkan induz resposta imune adquirida com várias semelhanças à resposta imune induzida pelo Mtb (WIELAND *et al.*, 2006a).

A micobactéria infecta o ser humano por meio das vias aéreas, sendo a própria mucosa respiratória que reveste as vias aéreas a primeira linha de defesa contra a micobactéria. Essa primeira linha de defesa consiste no próprio epitélio, uma camada de células epiteliais das vias aéreas (AECs) que formam uma barreira para impedir a invasão do tecido; a lâmina própria, que é constituída por tecido conjuntivo e células imunes (linfócitos e macrófagos); e por fim, pelo líquido de superfície das vias aéreas, que é composto por muco, imunoglobulina A, e por inúmeros fatores imunes inatos na superfície luminal. Também são encontrados ao longo da via aérea, tecidos linfoides associados ao brônquio ou

nasofaringe (B/NALTs) que tem papel fundamental na apresentação antigênica e ativação da imunidade adaptativa (LERNER *et al.*, 2015).

A família de receptores *Toll-like* (TLRs) e proteínas surfactantes (SPs) de AECs tem papel importante no reconhecimento e na adesão do patógeno às células epiteliais durante a infecção por micobactérias. Outros receptores de reconhecimento padrão (PRRs) podem estar envolvidos no reconhecimento micobacteriano, sendo eles: NOD2, Dectin-1, receptores de lectina tipo c (CLPs), receptor de manose e DC-SIGN (LI *et al.*, 2012). As AECs apresentam o antígeno para as células T invariantes de mucosa (MAITs), estimulando a produção de IFN- γ , TNF- α e granzimas. As células MAITs, rapidamente respondem a infecção, providenciando uma produção inicial de IFN- γ possibilitando a ativação dos macrófagos (LERNER *et al.*, 2015).

As micobactérias que evadem esta primeira barreira de defesa, nas vias aéreas, alcançam os alvéolos pulmonares. Os alvéolos pulmonares são constituídos por um revestimento fino de células epiteliais do tipo I e II, macrófagos alveolares (AMs), células dendríticas (DCs) e neutrófilos. As células epiteliais do tipo I estão relacionadas com a formação da parede dos alvéolos e são importantes na troca gasosa. Enquanto as células epiteliais do tipo II produzem substâncias antimicrobianas, surfactantes pulmonares e enzimas hidrolases no revestimento do pulmão (LERNER *et al.*, 2015). As hidrolases alteram a conformação da parede micobacteriana, diminuindo a capacidade desta de interagir e crescer dentro dos macrófagos alveolares (ORME *et al.*, 2015).

Existem cerca de dez AMs em cada alvéolo e em humanos o tempo médio de vida é de aproximadamente três meses. Os AMs possuem uma gama de mecanismos celulares antimicrobianos, contudo a micobactéria pode evadir desta defesa, dependendo da sua virulência (LERNER *et al.*, 2015).

Ao serem estimulados pela micobactéria, os macrófagos e neutrófilos secretam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, levando à ativação de outras células imunes (TAN *et al.*, 2006). Os macrófagos são as principais células da defesa imune inata do hospedeiro a interagir com a micobactéria, sendo estimuladas a produzir uma variedade de mediadores inflamatórios (NO, IL-1 β , TNF- α e IL-12) (ORME *et al.*, 2015). O óxido nítrico (NO), um radical livre produzido por macrófagos e outras células, exerce função antimicrobiana. Existe

uma linha tênue entre a proteção decorrente do recrutamento de células e efeito microbicida e a promoção de danos teciduais (BODGAN, 2001). Neste contexto, o recrutamento massivo de neutrófilos para o pulmão conduz a liberação de produtos microbicidas e citotóxicos (mieloperoxidases, oxigênio reativo, metaloproteinases, entre outros) secretados ou liberados durante a morte celular contribuindo mais com o desenvolvimento de patologia tecidual do que com a proteção contra os bacilos que são altamente resistentes (TAN *et al.*, 2006).

As células NK são recrutadas para o local da infecção e reconhecem os macrófagos infectados por micobactérias através dos receptores NKp44, NKp26 e NKG2D, para sua posterior eliminação. Além disso, constituem uma importante fonte inicial de IFN- γ , essencial para a ativação dos macrófagos e DCs e produzem citocinas que induzem o aumento das populações de células TCD8⁺ e células T NK (NKTs) responsáveis pelo reconhecimento de antígenos lipídicos apresentados através da proteína CD1a. Um subgrupo de células T que está presente nos alvéolos são as células T $\gamma\delta$, que auxiliam no reconhecimento de micobactérias e na eliminação de macrófagos infectados através da liberação de grânulos citotóxicos (VANKAYALAPATI e BARNES, 2009).

Dentre as células do sistema imune inato, as DCs (**Figura 4**) são fundamentais para indução da resposta imune específica, uma vez que após a fagocitose da micobactéria, as DCs maduras apresentarão os antígenos processados via MHC de classe I e II para as células T CD4⁺ e T CD8⁺, migrando dos pulmões para os gânglios linfáticos do mediastino (CHADHA *et al.*, 2015). Este evento culmina no influxo de células T específicas contra o bacilo para o pulmão (RAO *et al.*, 2015), onde as células T CD4 desempenham um papel crítico na eliminação ou contenção da micobactéria dentro dos granulomas (ESSER *et al.*, 2003; WINSLOW *et al.*, 2008).

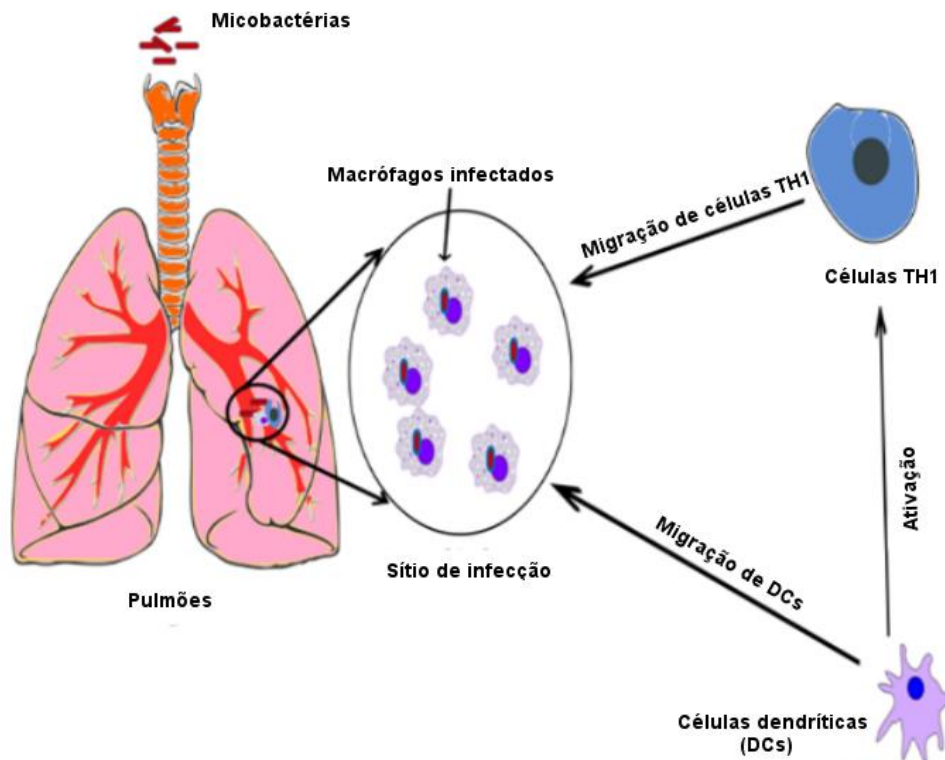


Figura 4 – Representação esquemática da migração de células dendríticas e seu papel na ativação e migração de células Th1 para o pulmão em resposta a infecção micobacteriana (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2020).

Com a infecção estabelecida pela micobactéria nas vias aéreas e no parênquima pulmonar, macrófagos alveolares que fagocitaram bacilos são circundados com o passar do tempo por um agregado de células compactas formadas por macrófagos infectados e intercalados com neutrófilos, células dendríticas, células NK, células B, células TCD4⁺ e TCD8⁺ rodeados por fibroblastos e cápsula fibrótica (**Figura 5**). Inicialmente, a estrutura do granuloma era considerada apenas uma forma de defesa do hospedeiro contra micobactérias para controle da disseminação do bacilo, porém, recentes estudos vêm demonstrando que as micobactérias podem sobreviver entrando em latência e posteriormente se utilizar dessa estrutura para subverter a resposta imune, recrutando células permissíveis (monócitos, neutrófilos) para sua replicação e posterior disseminação para outros locais dentro do hospedeiro (BOZZANO *et al.*, 2014).

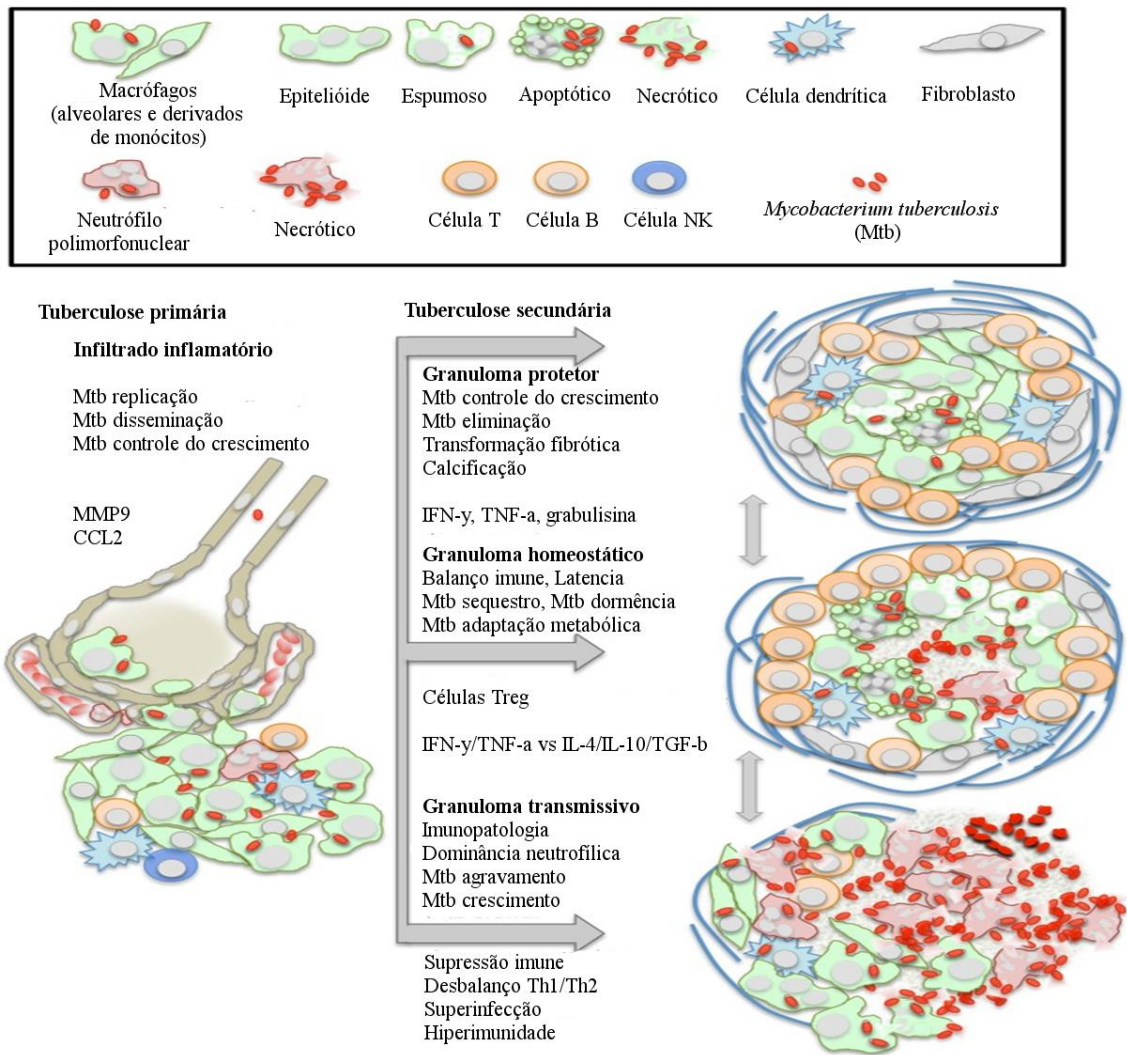


Figura 5 – Representação esquemática da constituição e organização do granuloma. (Adaptado de EHLERS e SCHAIBLE, 2013).

A autofagia colabora como mecanismo de defesa inata e também no controle e eliminação da micobactéria, embora cepas de Mtb tenham desenvolvido mecanismos de evasão, como a inibição da fusão do autofagossomo com o lisossomo em macrófagos e DCs e a ativação do sistema de secreção ESX-1 responsável pela secreção do antígeno ESAT-6 (ROMAGNOLI *et al.*, 2012).

A partir da ativação das células TCD4⁺ e consequente diferenciação no subtipo Th1, elevada produção de IFN- γ é observada em resposta a antígenos micobacterianos culminando na ativação clássica dos macrófagos e indução da autofagia nas células infectadas. Estes mecanismos são fundamentais para eliminação da micobactéria por macrófagos. Entretanto, as micobactérias podem

inibir este efeito microbicida. A proteína ESAT-6 secretada por Mtb e o glicolípido lipoarabinomanana (LAM), encontrado na parede celular das micobactérias podem inibir a ativação da transcrição de genes induzíveis para a produção de IFN- γ em linhagens celulares de macrófagos humanos (LERNER *et al.*, 2015).

Wieland *et al* (2006b) descreveu que durante a infecção *in vivo* por Mkan ocorre menor produção de IFN- γ comparado ao observado em infecções por Mtb; e os camundongos KO IFN- γ ^{-/-} não foram mais suscetíveis a Mkan em comparação com a linhagem dos camundongos WT (tipo selvagem). Estes fatos sugeriram que a resposta imune protetora contra a infecção pulmonar por Mkan depende menos da presença de células TCD4⁺ ou da produção de IFN- γ .

Em relação a imunidade humoral, no pulmão as células B podem contribuir na apresentação de antígenos e indução precoce de resposta efetiva de células T, assim como na produção de anticorpos específicos contra a micobactéria. Alguns subgrupos de células B efectoras inflamatórias, incluindo as células B inatas, podem promover o desenvolvimento de respostas Th1 através da produção de IL-12e TNF- α (CHAN *et al.*, 2014; RAO *et al.*, 2015).

O tipo de morte da célula hospedeira após a infecção pela micobactéria é crucial para a patogenia da doença. Cepas de Mtb patogênicas induzem morte necrótica nos macrófagos infectados que é um tipo de morte onde ocorre degradação desordenada da célula, lise celular e liberação das bactérias após sua replicação intracelular, o que inibe a apoptose. A apoptose resulta na degradação ordenada do conteúdo celular e na formação de vesículas apoptóticas contendo bactérias sequestradas e posteriormente estas vesículas podem ser fagocitadas por células ativadas, o que contribuiu para a proteção contra micobactérias (BUTLER *et al.*, 2012; LERNER *et al.*, 2015). Entretanto, as células apoptóticas que não forem fagocitadas sofrem posteriormente necrose secundária das membranas celulares, levando a liberação das micobactérias (BUTLER *et al.*, 2012).

Micobactérias virulentas modulam a apoptose em células do hospedeiro, criando um nicho de proteção dentro da célula. Cepas mais patogênicas induzem níveis mais baixos de apoptose no hospedeiro do que as menos patogênicas. A resposta apoptótica contra a micobactéria é dependente do balanço na produção

de citocinas, em que TNF- α tem mostrado conduzir a apoptose induzida por micobactéria, enquanto a IL-10 regula negativamente a apoptose em macrófagos (HASAN *et al.*, 2006).

Cepas de Mkan assim como cepas de Mtb expressam o sistema de secreção ESX-1 responsável pela secreção de importantes fatores de virulência, como a proteína ESAT-6, que podem contribuir para a formação de poros na membrana celular, facilitando o escape da micobactéria do fagossomo, ocasionando efluxo de potássio e induzindo ativação do inflamassoma no citoplasma dos macrófagos infectados. Micobactérias são capazes de ativar as cascatas de sinalização que levam a ativação do inflamassoma nos macrófagos infectados. O inflamassoma é um complexo multiproteico intracelular que atua na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (caspases), uma estrutura essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas e no reconhecimento de sinais de dano (PAMP/DAMP). O NO limita a atividade do inflamassoma NLRP3, requerida para a resposta inflamatória inata mediada por IL-1 β . A IL-1 β é uma citocina muito importante para ativação autócrina dos macrófagos e para proteção contra micobactéria. Camundongos KO IL-1 β ^{-/-} ou IL-1 β -R^{-/-} são altamente suscetíveis a infecção por Mtb (MA *et al.*, 2021). De outro lado, a produção excessiva da IL-1 β contribui a patologia.

CHEN *et al* (2012) descreveram que em macrófagos infectados por Mkan ocorre ativação do inflamassoma NLRP3/ASC dependente de ESX-1 ou ESAT-6, com consequente ativação da caspase-1, que promove a secreção de IL-1 β . Isto resulta em efluxo de potássio, acidificação do lisossoma, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e catepsina B, contribuindo em eliminação de Mkan pelo hospedeiro. A ativação de inflamassoma em macrófagos infectados foi sugerida como uma forma de contenção de Mkan (CHEN *et al.*, 2012).

A função da IL-1 como um mediador da infamação prejudicial se contrasta com a sua função na indução da produção de PGE₂ (**Figura 6**) e no controle do crescimento micobacteriano, destacando a importância crucial do equilíbrio entre a proteção e a imunopatologia no resultado da infecção por micobactéria (ORME *et al.*, 2015).

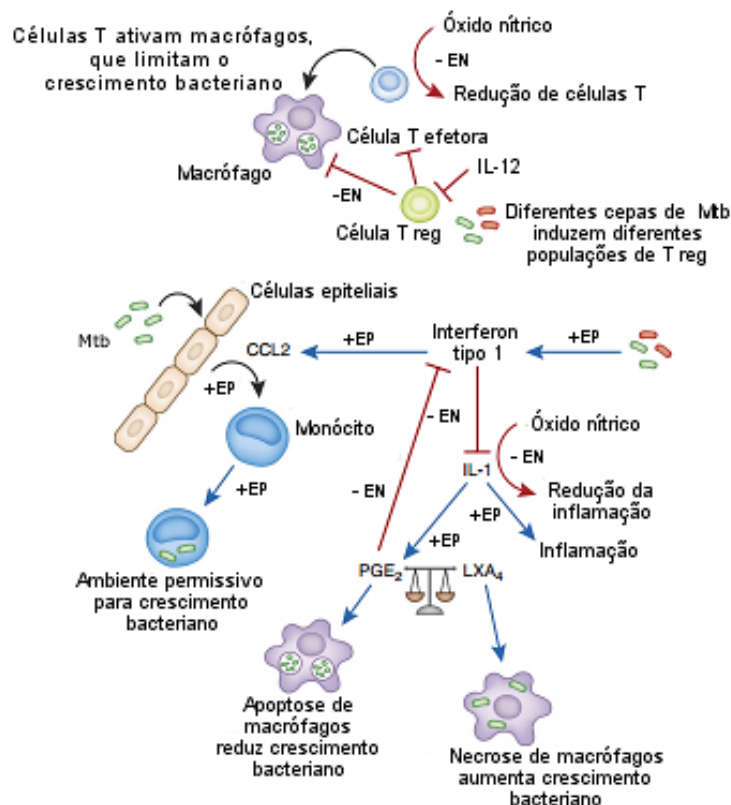


Figura 6 – Representação esquemática da influência dos fatores regulatórios no ambiente pulmonar no desenvolvimento da infecção micobacteriana. + EP efeito positivo; - EN efeito negativo; PGE₂ prostaglandina E2 (Adaptado de ORME *et al.*, 2015).

1.5. Virulência micobacteriana

A virulência pode ser definida como a capacidade de um agente patogênico se multiplicar e causar danos em seu hospedeiro, evadindo assim, das defesas do sistema imune do hospedeiro e induzindo a doença que pode levar a morte. A virulência é determinada geneticamente pelos genes que codificam fatores de virulência, incluindo vários lipídeos e proteínas da parede celular micobacteriana, enzimas, proteínas transportadoras entre outros. Estes fatores auxiliam a micobactéria no processo de infecção e replicação no hospedeiro, a fim de superar as respostas imunes desenvolvidas pelo mesmo (POULIN e COMBES, 1999).

Vários fatores de virulência podem ser encontrados na parede celular micobacteriana que possui constituição única e contém uma camada de arabinogalactanos que está covalentemente ligada a uma grande quantidade de ácidos graxos de cadeia longa chamados ácidos micólicos. Esta camada de

ácidos micólicos forma a parte interna da membrana externa micobacteriana, enquanto vários lipídeos complexos, incluindo glicolipídios (ex. PDIM, PGL), formam a parte externa desta. Juntos formam uma barreira hidrofóbica espessa que dificulta a entrada de substâncias por abordagens padrão (**Figura 7**). Essa característica das micobactérias é um fator que contribui para a ineficácia de muitos antibióticos contra esse gênero e contribui para a virulência entre as espécies (LY e LIU, 2020). Além dos lipídeos e glicolipídeos, várias proteínas (ESX, PE, PPE) que formam poros e são essenciais para o transporte de várias moléculas, incluindo fatores de virulência da micobactéria, podem ser encontradas na parede celular (**Figura 7**).

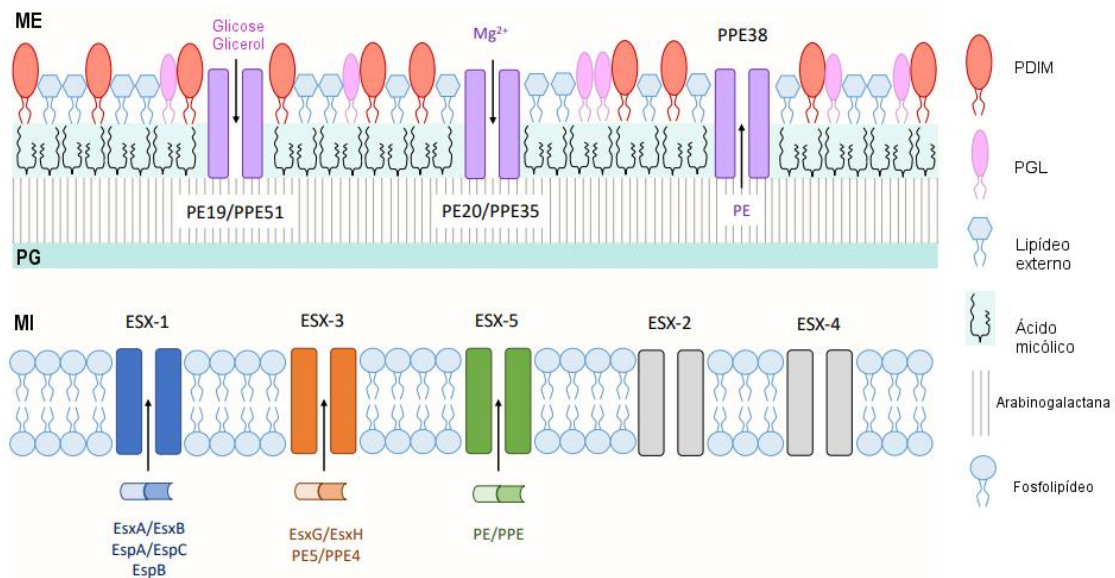


Figura 7 – Imagem ilustrativa de fatores de virulência de micobactérias associados a parede celular. Três sistemas de secreção do tipo VII - sistema de secreção-1 ESAT-6 (ESX-1), ESX-3 e ESX-5 secretam proteínas através da membrana interna. Os canais seletivos de pequenas moléculas Pro-Glu (PE)/Pro-Pro-Glu (PPE) transportam nutrientes e proteínas através da membrana externa. Vários lipídios da parede celular micobacteriana são descritos na camada externa da membrana interna. Membrana interna (MI); peptidoglicano (PG); membrana externa (ME). (Adaptado de LY e LIU, 2020).

Os dimicocerosatos de fitocerosol (PDIMs) e os glicolipídios fenólicos (PGLs) são lipídios complexos estruturalmente relacionados na membrana externa das micobactérias que demonstraram serem críticos para a virulência das micobactérias. Os PDIMs medeiam a fagocitose de Mtb, contribuem para a barreira de permeabilidade da parede celular e protegem o bacilo contra a ação de ROS produzidos por macrófagos ativados. Posteriormente, foi demonstrado

que os PDIMs também contribuem para o escape da célula hospedeira e necrose desta (ONWUEME *et al.*, 2005). Os PGLs também são restritos a micobactérias patogênicas e foram implicados na diminuição da indução da resposta imune do hospedeiro pela inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, que tem sido associada a um fenótipo hipervirulento de certos isolados clínicos de Mtb (REED *et al.*, 2004).

Os sulfolipídios expostos à superfície (SLs) representam uma família de acil trealoses sulfatadas em micobactérias às quais foram atribuídas propriedades virulentas por estudos *in vitro* e *in vivo*. Os SLs foram descritos pela primeira vez como um fator de virulência por sua capacidade de inibir a fusão e acidificação do fagolisossoma em macrófagos murinos infectados. Posteriormente foi descoberto que os SLs podem atuar como antagonistas competitivos de TLR2 para inibir a formação de heterodímeros TLR2/TLR1 ou TLR2/TLR6 para suprimir a ativação de macrófagos, conduzindo a uma resposta imune inata atenuada (BLANC *et al.*, 2017).

A **Figura 8** mostra outros glicolipídeos expostos na membrana externa de micobactérias, que incluem fosfatidilinositol (PIM), lipomanana (LM) e lipoarabinomanana (LAM), glicolipídeos fenólicos (PGL) e uma variedade de glicolipídeos que contém trealose, incluindo lipooligossacarídeos (LOS), trealose 6,6'-dimicolato (TDM) e trealose 6-monomicolato (TMM).

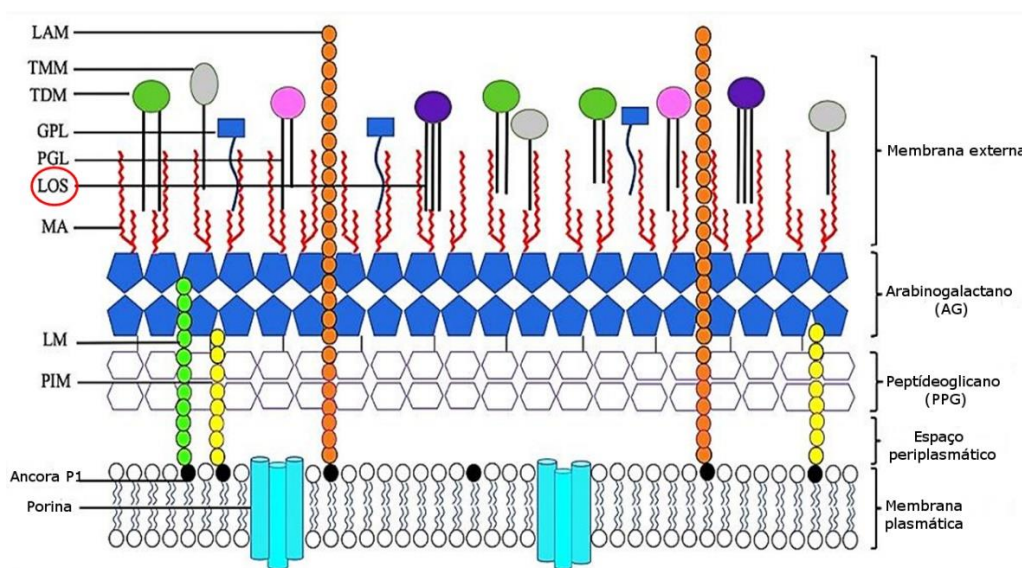


Figura 8 – Representação esquemática dos lipídeos presentes na membrana externa da parede celular das micobactérias (Adaptado de TRAN *et al.*, 2019). Os lipooligossacarídeos (LOS) são expressados na superfície de várias MNTs, incluindo *M. kansasii*, mas ausentes em *M. tuberculosis*. LOS está marcado com um círculo vermelho.

Ressalta-se que Mkan expressa na sua parede celular quase todos os lipídeos que são importantes fatores de virulência de Mtb (LAM, PIM, TDM, PGL, PDIM), e também expressa lipídeos que Mtb não mais o faz (como os lipooligossacarídeos- LOS), embora algumas espécies menos virulentas do complexo de *M. tuberculosis*, como *M. canetti*, expressem LOS. *M. kansasii* produz sete subclasses de LOS, todas as quais compartilham um núcleo de tetraglicose comum: β -D-Glcp (1 \rightarrow 3) - β -D-Glcp (1 \rightarrow 4) - α -D-Glcp (1 \rightarrow 1) - α -D-Glcp onde Glcp é uma glucopiranosose. As cepas de Mkan que apresentam morfotipo de colônias S (lisas) expressam antígenos de superfície LOS, enquanto cepas rugosas (morfotipo R) são desprovidas de tais antígenos de superfície (BELISLE e BRENNAN, 1989). Estudos em camundongos demonstraram que cepas Mkan do morfotipo R, deficiente em LOS, sobrevivem mais tempo e causam doença pulmonar crônica em comparação com cepas S produtoras de LOS (BELISLE e BRENNAN, 1989). Um estudo *in vitro* demonstrou que o LOS estimula a expressão de proteínas na superfície dos macrófagos para formar granulomas maduros e restringir o crescimento bacteriano (ROMBOUTS *et al.*, 2009). Deste modo, o LOS pode atuar como um fator antivirulência que reveste ou “mascara” outros glicolipídeos que contribuem para a virulência de Mkan, como LAM ou PDIM (NOBRE *et al.*, 2014).

As proteínas PE/PPE (**Figura 7**) específicas do gênero *Mycobacterium* compartilham motivos N-terminais conservados que incluem resíduos Pro-Glu (PE) ou Pro-Pro-Glu (PPE) e um C-terminal altamente variável, muitos dos quais são secretados pela secreção de sistemas do tipo VII e estão presentes principalmente em micobactérias patogênicas, onde acredita-se que desempenhem um papel na interação com o sistema imunológico do hospedeiro (DELOGU *et al.*, 2017). A secreção de proteínas desempenha um papel importante na capacidade das bactérias se adaptarem a diferentes ambientes. Muitas bactérias requerem a translocação de enzimas, proteínas e toxinas através de sua membrana, principalmente as virulentas. As micobactérias usam uma via de secreção geral essencial chamada sistema de secreção Sec para translocar proteínas desdobradas com uma sequência de sinal N-terminal através da membrana interna. Além desse sistema de secreção, Mtb e outras micobactérias patogênicas relacionadas codificam cinco sistemas de secreção tipo VII, designados sistema de secreção EsxA-1 (ESX-1) até ESX-

5. Três deles, ESX-1, ESX-3 e ESX-5, são necessários para a virulência observados Mtb (e possivelmente de Mkan), enquanto as funções de ESX-2 e ESX-4 permanecem desconhecidas (LY e LIU, 2020).

A região RD-1 está presente no genoma micobacteriano, sendo responsável por codificar fatores intrínsecos à virulência micobacteriana. Essa região é importante por codificar as proteínas ESAT-6 (EsxA) e CFP-10 (EsxB). Alguns estudos envolvendo mutações nos genes que codificam para ESAT-6 e CFP-10 mostraram a ausência de indução da resposta específica de células T e redução drástica da virulência da micobactéria (GANGULY *et al.*, 2008).

Na avaliação *in vitro*, um dos principais parâmetros a ser quantificado é o crescimento intracelular micobacteriano dentro de macrófagos infectados, que demonstra a capacidade da micobactéria se adaptar a um ambiente desfavorável e inibir os efeitos bactericidas das células fagocitárias, onde é conhecido que micobactérias virulentas crescem mais rápido que as avirulentas. É importante quantificar também *in vitro* a capacidade das micobactérias virulentas e avirulentas de induzirem a morte celular em macrófagos por necrose ou apoptose (citotoxicidade). Micobactérias virulentas inibem a apoptose em células do hospedeiro, criando um nicho para sua replicação. A indução de necrose nas células infectadas favorece a liberação de conteúdo celular, incluindo componentes micobacterianos e moléculas intracelulares (ATP, proteínas de estresse) que atuam como sinais de alerta – *danger signals* (DAMPs) - para o hospedeiro. A liberação dos DAMPs induz o recrutamento para o local da infecção de novos fagócitos que podem ser utilizados pelas micobactérias como células permissíveis para sua propagação, aumentando a carga bacteriana (KEANE e REMOLD, 2000).

Outro fator que pode ser avaliado e complementar a avaliação de virulência de micobactérias através da infecção *in vitro* é capacidade de modulação da ativação inata dos macrófagos pela micobactéria. Esta Ativação é induzida através do reconhecimento da micobactéria por TLRs (Toll-like receptors) e pode ser observada na forma de produção das citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-12, IL-6, IL-1 β) pelo macrófago ativado, que contribuem para ativação autócrina do próprio macrófago. Foi demonstrado que micobactérias mais virulentas induzem menos TNF- α e IL-12 que as avirulentas,

o que diminui a capacidade do hospedeiro de eliminar a micobactéria e reduz a resposta efetora de macrófagos e células T para o patógeno (REED *et al.*, 2008).

A infecção dos animais de experimentação *in vivo* é o teste de “padrão de ouro” para avaliação da virulência (FLYNN, 2006). Para a análise *in vivo* são utilizados principalmente camundongos devido ao melhor custo-benefício. Os animais são infectados pela micobactéria através das vias respiratórias (via natural de infecção) e posteriormente são analisados os parâmetros de morbidade (perda do peso, histopatologia) e mortalidade induzida pela cepa micobacteriana. Os modelos animais permitem a análise do percentual de morte causada pela cepa e o período de tempo para que o animal seja levado a óbito. Também pode ser quantificado o número de micobactérias encontradas no hospedeiro após a infecção inicial (crescimento de bactéria no pulmão) e testes para avaliação da resposta imune e inflamação, ativação do inflamassoma em macrófagos, quantificação de citocinas e das subpopulações celulares dos leucócitos recrutados para local da infecção (SMITH, 2003).

Estudos mostraram que camundongos infectados com baixas doses de Mkan são capazes de controlar a infecção e até mesmo eliminar o bacilo do organismo. Para o procedimento de infecção animal por Mkan é recomendada a utilização de altas doses de bactéria, variando de 10^4 (WANG *et al.*, 2015) a 10^6 CFU/mL (WIELAND *et al.*, 2006b). Entretanto, nenhum modelo animal utilizado nos estudos de Mkan até o presente momento, reproduziu a doença crônica pulmonar com a patologia típica para a doença em humanos.

1.6. Sequenciamento completo do genoma e genotipagem de espécies de *M. tuberculosis* e *M. kansasii* relacionados à doença pulmonar

No final da década passada surgiram os primeiros estudos comparando os isolados clínicos de Mtb pelo sequenciamento completo do genoma (Whole Genome Sequencing-WGS). A técnica de WGS permite a detecção de SNPs, supressões, inserções e rearranjos de sequências de DNA são à base de eventos pós-genéticos, como a transmissibilidade, resistência aos fármacos e virulência. A análise do transcriptoma, proteoma, metaboloma e lipidoma, pode completar as informações obtidas por WGS (MEEHAN *et al.*, 2019).

Têm sido identificados cerca de 200 genes de virulência em potencial para Mtb (5 classes principais de genes que codificam: proteínas PE/PPE, sistema de secreção ESX, proteínas Mce, enzimas envolvidas na produção de ácidos micólicos, DIM ou envolvidos no transporte ou metabolismo de íons inorgânicos e hidratos de carbono, necessários para o crescimento *in vivo*, especialmente nos macrófagos do hospedeiro (BOTTAI *et al.*, 2014).

A identificação de tais fatores, genes e polimorfismos genéticos podem contribuir para uma melhor compreensão da interação entre micobactérias patogênicas e seus hospedeiros e no desenvolvimento de novos tratamentos e vacinas que previnam ou controlem a TB e infecções pulmonares por Mkan. Em adição, a genotipagem e o WGS possibilitaram que diferentes sublinhagens de Mkan e Mtb pudessem ser associadas a diferentes fenótipos patológicos e clínicos e entender como estas diferenças influenciam na transmissibilidade de determinadas linhagens de Mkan e Mtb em populações humanas. Poucos dados estão disponíveis sobre os fatores de virulência de MNT, sendo um estudo recente a fornecer os primeiros dados sobre a distribuição de alguns genes de virulência em grupos MNT, incluindo Mkan (FEDRIZZI *et al.*, 2017).

Machado *et al* (2018) mostrou a variabilidade genética dentro do genótipo 1 de Mkan isoladas de pacientes de diferentes regiões do Brasil, evidenciando três grupos genéticos que são separados pela presença de grande número de SNPs em todo o genoma e pelo padrão de deleções (**Figura 9**). Um grupo de cepas do Rio de Janeiro foi muito semelhante à cepa de referência Mkan ATCC Hauduroy (< 100 SNPs) que foi isolada há mais de 70 anos nos Estados Unidos. Um segundo grupo de isolados clínicos do Rio de Janeiro e Pernambuco apresentou uma diferença de mais de 10.000 SNPs quando comparado à cepa ATCC. Também foi verificado uma associação entre genótipos e origem geográfica dos isolados, separando aqueles dos estados do Rio de Janeiro, Pernambuco e Santa Catarina, o que permitiu presumir que haja diferenças consideráveis de virulência *in vitro* e *in vivo* para essas cepas.

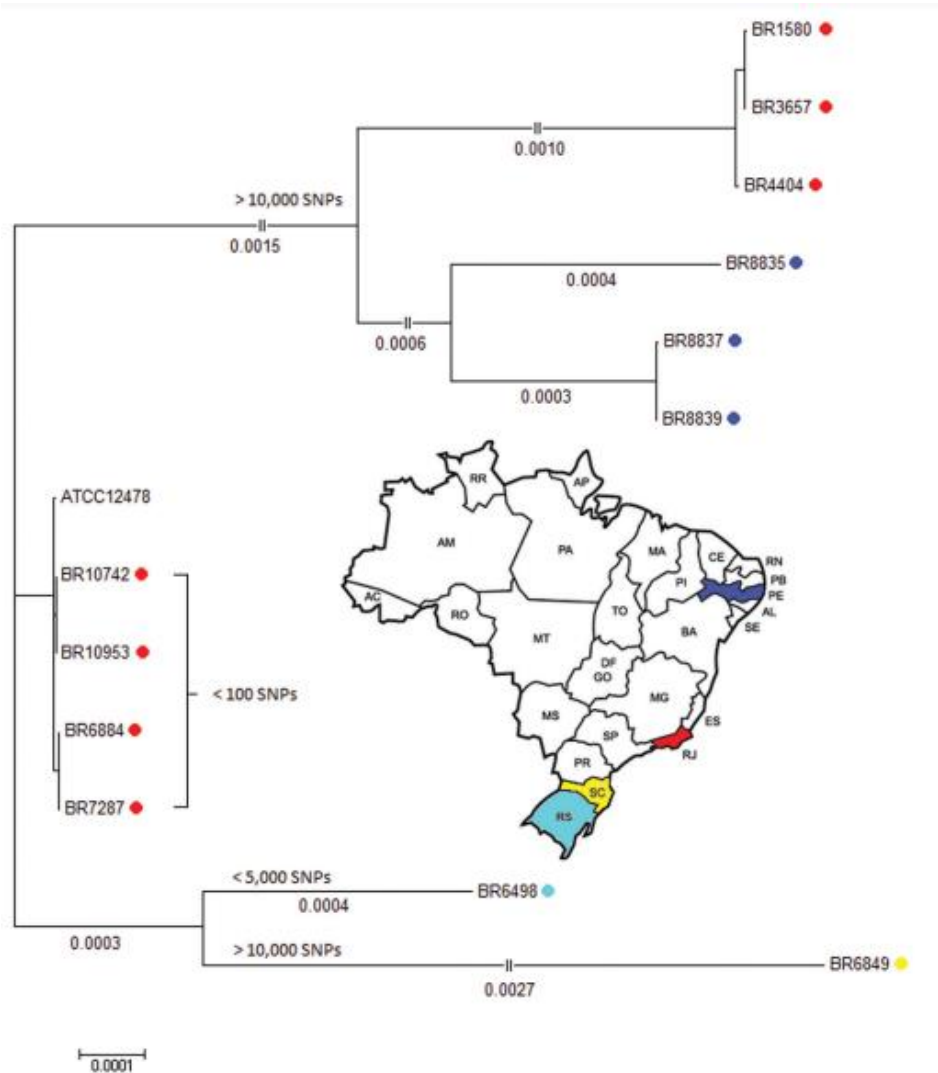


Figura 9 – Árvore filogenética de 12 isolados clínicos brasileiros de *M. kansasii* a partir da prospecção de SNPs pelo método de distância de Neighbour-Joining em relação à similaridade genômica com a cepa de referência ATCC 12478 (MACHADO *et al.*, 2018).

2. JUSTIFICATIVA

A incidência de infecções pulmonares em humanos por MNTs mostrou crescimento de 2 a 8 vezes em diferentes regiões geográficas do mundo, o que representa uma ameaça crescente à saúde pública (GOPALASWAMY *et al.*, 2020). O aumento na incidência de MNT é multifatorial e pode estar associada com o rápido crescimento de populações suscetíveis associado ao envelhecimento de população mundial. A suscetibilidade ao Mkan e outras MNT pode aumentar ainda mais devido à síndrome pós-COVID-19 associada a sequelas pulmonares (NALBANDIAN *et al.*, 2021).

O Brasil apresenta aumento dos casos de infecções pulmonares provocadas por MNT, incluindo Mkan (DA COSTA *et al.*, 2010). Diferentemente da maioria das MNTs patogênicas, que são oportunistas, Mkan pode causar doença pulmonar similar a TB (incluindo TB cavitária em mais de 70% dos casos) em indivíduos sem imunodeficiências (CHEN *et al.*, 2012). Além disso, Mkan expressam vários fatores de virulência de Mtb, sugerindo que ambas as doenças possam apresentar mecanismos patogênicos similares. Ainda não foi estabelecido se isolados clínicos de Mkan variam no grau de virulência e qual é o impacto dessa variabilidade na severidade da doença pulmonar do hospedeiro.

De Mello *et al* (2013) mostraram que cepas de Mkan foram as mais frequentes (33,9%) entre as MNTs isoladas dos pacientes com doença pulmonar em pacientes no Estado do Rio de Janeiro, com proporção mais elevada entre os isolados de MNTs quando comparadas com outras regiões no Brasil (LEITE *et al.*, 1995; MARTINS *et al.*, 2005) ou em outras partes do mundo, como nos Estados Unidos e Austrália, aonde o complexo *M. avium* é mais prevalente (PREVOTS *et al.*, 2010; CDC, 2013).

Esses dados sugerem alta virulência de cepas Mkan isoladas em nosso meio e a importância da caracterização da virulência destes. Para isso é fundamental estabelecer modelos animais de infecção que reproduzam a infecção crônica e patologia similar à doença humana. Os fatores genéticos e fenotípicos que determinam a virulência de cepas Mkan ainda devem ser estabelecidos. Este trabalho visa aprofundar no entendimento dos mecanismos imunopatológicos que podem agravar a doença pulmonar causada por estas cepas, possibilitando assim, um melhor diagnóstico e tratamento dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar cepas de *Mycobacterium kansasii* isoladas de pacientes brasileiros com doença pulmonar quanto à virulência micobacteriana e imunopatogenia induzida pela micobactéria em camundongos C57BL/6 infectados por via intratraqueal.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as características morfológicas das colônias de Mkan em meio Middlebrook 7H10 quanto ao aspecto das colônias;
- Avaliar a capacidade de crescimento intracelular e indução de morte em macrófagos murinos infectados por isolados clínicos de Mkan;
- Avaliar os isolados clínicos de Mkan quanto à capacidade de ativação do complexo inflamassoma e ativação de caspase-1 *in vitro*;
- Estabelecer um modelo animal para infecção por Mkan clinicamente relevante.
- Determinar o perfil de virulência micobacteriana e imunopatogenia induzida em camundongos C57BL/6 infectados intratraquealmente pelas cepas Mkan através de:
 - Determinação da curva de sobrevivência dos animais e avaliação semanal do percentual de peso corporal dos animais;
 - Avaliação do crescimento micobacteriano pulmonar por quantificação de CFU;
 - Análise macroscópica e histológica pulmonar;
 - Quantificação da produção de mediadores inflamatórios produzidos pelas células pulmonares *ex vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Cultura celular

Macrófagos murinos J774A.1 e RAW 264.7 foram cultivados em meio *Dulbecco's Modified Medium F-12* (DMEM/F12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco BRL), 25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Para o cultivo celular dos macrófagos J774A.1 foi adicionado ao meio de cultura acima 2mM de L-Glutamina (Sigma-Aldrich) e 1mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich). Ambas as culturas celulares foram cultivadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂. Quando em experimentação, as células RAW 264.7 (5x10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços e as células J774A.1 (1x10⁶ células/mL) foram plaqueadas em placas de 6 poços, ambas com DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 h antes da infecção da cultura com as cepas de Mkan.

4.2. Obtenção e preparo da cultura estoque e do cultivo micobacteriano

Dez cepas de Mkan isoladas de pacientes brasileiros com a doença pulmonar (códigos 1580, 3657, 4404, 6849, 7439, 7287, 8835, 8837, 8839 e 10953) e a cepa padrão ATCC 12478 foram genotipadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Philip Suffys do Instituto Oswaldo Cruz-RJ. As culturas micobacterianas estoque de Mkan foram recebidas em meio de cultura sólido, Lowenshtein-Jensen (LJ) (Difco), com suplemento a base de ovo de galinha e mantidas a 2-4°C. Para o preparo da cultura estoque de cada cepa de Mkan, 1/4 das colônias micobacterianas presentes no meio LJ foram removidas com auxílio de uma alça microbiológica e colocadas em um tubo de 50 mL contendo dez esferas de vidro estéreis (2 mm de diâmetro), sem líquido, para agitação vigorosa em vórtex (Biomotic). Posteriormente, foram adicionados a cada tubo 6 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit) acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase - BD BBL) e novo ciclo de agitação no vortex e banho de ultrassom (Ultronic USC1400) foi realizado para dispersão de grumos e obtenção de uma suspensão homogênea. A partir desta suspensão, 100 µL foram repassados para duas placas contendo meio de cultura sólido

Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de glicerol e 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase – BD BBL) e incubadas a 37°C em estufa e após o crescimento micobacteriano foram mantidas como estoque a 2-4°C enquanto alíquotas de 1 mL (10^7 a 10^8 bactérias/mL) foram adicionadas para tubos criogênicos e estocadas em freezer -70°C.

Para iniciar os experimentos, um criotubo de cada cepa foi retirado do freezer -70°C, descongelado e a suspensão bacteriana adicionada em meio de cultura Middlebrook 7H9 acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC, sendo esta incubada por 5 dias em estufa a 37°C. A padronização e ajuste da concentração bacteriana foi realizada através de leitura prévia a 600 nm da densidade ótica (D.O) da suspensão em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra s6), subtraindo-se a densidade ótica do meio de cultura 7H9 suplementado com glicerol e ADC. A diluição da suspensão bacteriana obedeceu o critério de relação da densidade ótica *versus* número de bacilos. Após quantificação da D.O. da suspensão bacteriana, foi realizada a diluição para a D.O. 0,200 e a concentração bacteriana correspondente foi determinada por diluição seriada e plaqueamento em ágar Middlebrook 7H10 suplementado. Após 10 dias, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) para cada cepa de Mkan foi obtida a relação entre CFU e D.O. 0,200, utilizada para os experimentos posteriores.

4.3. Avaliação das cepas *M. kansasii* quanto a secreção da proteína ESAT-6 em cultura bacteriana por *Western blotting*

As cepas de Mkan selecionadas com base nos resultados de avaliação de virulência e a cepa Mtb (M299, alta virulência) foram cultivadas em meio líquido Sauton (DIFCO, Detroit) suplementado com ADC por 5 dias. O sobrenadante de cultura foi coletado, filtrado em membrana de nylon estéril 0,22 µm (Corning Inc., PA, USA) e 20 µL foram submetidos ao gel de 15% SDS-poliacrilamida, no sistema MiniVE Vertical Eletrophoresis System (GEHealthcare). Após a eletroforese, as proteínas devidamente separadas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond-ECL, GE), utilizando tampão fosfato A membrana de nitrocelulose foi então bloqueada com 2,5% de albumina sérica bovina (BSA) dissolvida em TBS acrescido de Tween 0,05% (TBST), overnight a 4°C. Em seguida, a membrana

foi lavada 3 vezes com TBST e incubadas com anticorpo de coelho anti-ESAT-6 (Abcam AB45073) diluído em TBS acrescido de 1% de leite desnatado na proporção de 1:500 por 2 horas, a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada com TBST e incubadas com anticorpo secundário anti-Ig de coelho-peroxidase diluído em TBS na proporção de 1:5000 por 1 h em temperatura ambiente. As membranas foram então lavadas extensivamente com TBST e reveladas com solução de 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma Aldrich) 50 mM em Tris HCl, pH 7,5 e 0,03% de peróxido de hidrogênio. O peso molecular das bandas foi comparado ao peso molecular padrão (Full Range Rainbow - GE-Healthcare). As bandas proteicas reveladas foram digitalizadas utilizando scanner de alta resolução. A densitometria foi realizada através do software Image J (NIH, Bethesda, MD). O valor obtido para a banda proteica de Mkan ATCC 12478 foi inserido como 1 e as outras condições foram calculadas em correlação a este parâmetro.

4.4. Morfologia das colônias

Para determinar a morfologia das colônias, todas as cepas de Mkan e a cepa de Mtb M299 foram cultivadas em ágar Middlebrook 7H10 suplementado por 3 a 4 semanas. As colônias foram examinadas quanto às características das colônias com o auxílio de um estereomicroscópio (ampliação de x 4 a x 20; modelo 569; American Optical Corp, Buffalo, N.Y.) e uma fonte de luz externa, e as imagens foram capturadas pela câmera Samsung Zoom Lens. As cepas de Mkan apresentaram morfologia rugosa ou lisa.

4.5. Infecção da cultura de macrófagos

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados (5×10^5 células/mL) em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB, 24 h antes da infecção micobacteriana. Após este período, a cultura celular foi infectada separadamente com a suspensão de cada cepa, a qual foi agitada conforme item 4.2 ea D.O. ajustada para 0,200. A cultura de macrófagos foi infectada, separadamente, com cada cepa, em diferentes proporções de multiplicidade da infecção (MOI): 1:1 (bactéria/macrófago) para análise do crescimento micobacteriano e 10:1 para análise da indução de morte celular provocada pela micobactéria por meio da dosagem da enzima citoplasmática lactato desidrogenase no sobrenadante da cultura. Pelo menos 8 poços foram

utilizados para cada tipo de avaliação. O tempo de exposição da cultura celular a suspensão bacteriana para fagocitose foi de 3 horas, e logo após, as micobactérias extracelulares foram removidas por lavagens com PBS 1X. Posteriormente, o meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB foi acrescido à cultura infectada (DIA 0). As células infectadas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ durante 4 dias para avaliação dos parâmetros discriminados acima.

Para a avaliação dos isolados clínicos quanto a capacidade de induzir a produção de IL-1 β foi utilizado a cultura de macrófagos J774A.1 plaqueados (1x10⁶ células/mL) em placas de 6 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB, 24 h antes da infecção micobacteriana. A cultura celular foi infectada na razão MOI 10:1 com cada cepa de Mkan separadamente e o tempo de exposição, remoção de bacilos extracelulares e adição de meio DMEM-F12 foram conduzidos conforme descrito para a cultura de macrófagos RAW 264.7. Os sobrenadantes da cultura foram coletados em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3) e a quantificação da produção de IL-1b ocorreu através do ensaio de ELISA sanduíche utilizando kit correspondente (R&D systems, MN, USA).

4.6. Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano

A quantificação do crescimento micobacteriano intracelular foi realizado para os macrófagos infectados na proporção MOI 1:1 através da semeadura em ágar Middlebrook 7H10 suplementado com glicerol e OADC e posterior contagem de CFU. A cultura de macrófagos infectados por cada cepa foi lisada nos dias 0 e 4 após infecção, utilizando solução de saponina a 0,1% por 20 min. O lisado da cultura foi agitado, sonificado em banho de ultrassom e a diluição seriada foi realizada em PBS 1X estéril nas diluições de 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. Alíquotas de 50 μ L da diluição foram semeadas em ágar Middlebrook 7H10 suplementado. As placas foram incubadas por 10 dias à 37°C, e as colônias foram quantificadas. O número de colônias quantificadas foi utilizado para cálculo da concentração CFU/mL e os valores expressos em Log₁₀. A capacidade de crescimento intracelular de cada cepa foi expressa através da subtração das médias do CFU dia 4 e dia 0 (CFU dia4 – CFU dia0).

4.7. Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados por isolados clínicos de *M. kansasii*

A avaliação da capacidade de indução de morte celular das cepas de Mkan foi realizada na razão MOI 10:1 para aprofundar as informações obtidas a partir das infecções em alta dose (MOI 50:1) e detalhar os intervalos de tempo em relação à capacidade de indução de morte para cada cepa testada.

Para isto, a liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada no sobrenadante de cultura infectada, utilizando o Kit comercial Labrax (GO, Brasil). O sobrenadante da cultura infectada na proporção de MOI 10:1 foi coletado em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3) pós infecção, filtrado em filtro de acetato de celulose de poro 0,22 µm. Cinquenta microlitros de cada sobrenadante coletado foram acrescidos de 100 µL da solução de alumen férrico e substrato e incubado em estufa à 37°C por 3 min. Logo após, foram acrescentados 100 µL da solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e fenasina metassulfato, realizando nova incubação à 37°C por mais 5 min de acordo com o protocolo do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 492 nm (Epoch UV-Vis, Biotek, USA). Para obtenção do percentual de inibição foi calculado o percentual de liberação de LDH = $100 \times (\text{liberação de LDH amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{máximo da liberação} - \text{liberação espontânea})$. Como controle positivo, para o máximo de liberação de LDH (mínimo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos estimuladas acrescidas de 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) e para a liberação espontânea de LDH (máximo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos somente acrescida do estímulo celular pela micobactéria.

4.8. Obtenção do *Ranking* de virulência entre os isolados clínicos estudados

Para obtenção do *ranking* de virulência entre a cepa padrão ATCC 12478 e os isolados clínicos avaliados, foram considerados dois parâmetros: 1) o crescimento intracelular das cepas de Mkan em macrófagos RAW 264.7 e 2) a capacidade destas cepas induzirem morte celular nos macrófagos infectados (percentual de liberação de LDH, MOI 10:1).

Inicialmente, foram obtidas as médias de crescimento intracelular no dia 4 subtraído do dia 0, para cada cepa Mkan, e comparado aos da cepa ATCC

padrão 12478 determinada com o valor 1.0. Posteriormente, foram obtidos os percentuais de indução de morte celular para cada cepa Mkan, através do teste de LDH e a média dos valores percentuais obtidos em 72 h pós-infecção foram comparados ao apresentado pela cepa padrão e determinado com o valor 1.0. A média entre os valores relativos obtidos para cada cepa Mkan nos quesitos capacidade de crescimento intracelular (Index A) e indução de morte celular (Index B) foi denominada taxa de virulência relativa (Index A + Index B/2).

4.9. Avaliação da ativação de capase-1 em macrófagos infectados pelas cepas *M. kansasii* por *Western blotting*

Macrófagos murinos J774.A1 foram plaqueados (1×10^6 células/mL) em placas de 6 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB, 24 h antes da infecção micobacteriana. Após 24 h, a cultura celular foi infectada na proporção MOI 10:1 e os procedimentos de infecção *in vitro* foram descritos no item 4.5. Após 24 h e 72 h de infecção, as células foram lisadas com tampão de lise (10% SDS, 20% glicerol, 5% 2-mercaptoetanol, 2% azul de bromofenol e 1 M Tris HCl, pH 6.8, contendo inibidor de proteases – Sigma Aldrich) e a concentração de proteínas estimada pelo método de Bradford. Vinte microlitros do lisado celular foram submetidos ao gel de 12% SDS-poliacrilamida e após a eletroforese, as proteínas devidamente separadas no gel foram submetidas ao *Western blotting*. A execução experimental da eletroforese, western blotting e tratamento da membrana de nitrocelulose ocorreu conforme descrito no item 4.3. O anticorpo de coelho anti-caspase-1 p20 (PA5-78915, Thermo Fisher) foi utilizado na 1:1000 e o anticorpo secundário anti-Ig de coelho-peroxidase diluído na proporção (1:5000) As bandas proteicas reveladas foram digitalizadas utilizando scanner de alta resolução.

4.10. Animais

Para a realização dos testes *in vivo* foram utilizados camundongos fêmeas C57BL/6 livres de germes, com a idade entre 6 e 8 semanas, adquiridos do Biotério Central Thereza Liberman Kipnis da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF – Campos/RJ). Os animais foram infectados e mantidos em microisoladores, distribuídos organizadamente em estantes ventiladas no biotério de Biossegurança nível III do Laboratório de Biologia do

Reconhecer (CBB/UENF), sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Elena Lassounskaia. O modelo de infecção intratraqueal dos camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal, CEUA, da UENF (protocolo nº 350 em 28/03/2017).

4.11. Infecção experimental dos camundongos

A infecção dos animais foi realizada segundo o modelo descrito por RIBEIRO *et al.* (2014). Camundongos C57Bl/6 foram anestesiados por via intraperitoneal (i.p.), pela aplicação de numa alíquota de 90-120 µL da mistura de Anazedan (xilazina, 15 mg/kg, Vetbrands) e Dopalen (ketamina, 110 mg/kg, Vetbrands) diluídos em tampão fosfato de sódio (PBS) estéril. Para certificação da eficácia da analgesia nos animais, estes foram submetidos a testes de padrão de reflexo de acordo com as normas de bioética de experimentação animal.

Após a verificação da analgesia, os camundongos foram infectados separadamente com a suspensão de cada cepa de Mkan selecionada (ATCC 12478, 6849, 4404, 10953 e 8835), através de uma incisão transversal de 0,5 cm na pele da região do pescoço do animal para exposição da traqueia, onde foi injetado o volume de 50 µL ($\sim 5 \times 10^4$ bacilos) entre os anéis cartilagosos mais proeminentes, com auxílio de uma seringa hipodérmica 0,3 mL (Terumo, SP, Brasil). Os animais controle receberam 50 µL de PBS estéril. Logo após a infecção intratraqueal (i.t.), a incisão foi suturada. Os animais infectados foram separados em cinco grupos com oito animais cada e supervisionados diariamente quanto aos sinais vitais e eutanasiados (inalação de CO₂), se requerido, seguindo o protocolo de bioética animal, quando observado 20% de perda de peso corporal, ausência de mobilidade e dificuldade de respiração, a fim de minimizar o sofrimento.

Após os períodos de 28, 40, 60, 120 e 150 dias, os animais foram sacrificados por exposição em câmara de CO₂ e os seguintes parâmetros averiguados: carga bacilar por meio do CFU no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizadas.

Durante todo o período experimental, os animais infectados para cada cepa, assim como os animais controle, foram pesados em balança de precisão e o percentual de peso corporal obtido. Foram observados diariamente sinais

clínicos e quantificado o período de tempo no qual as cepas de Mkan infectantes conduziam ao desfecho da doença.

4.12. Obtenção de células do pulmão

Para a obtenção das células pulmonares foi coletado o lóbulo esquerdo dos pulmões dos camundongos infectados ou não, o qual foi pesado e adicionado a placas de Petri (JProlab, 21 cm²) com 3 mL de meio de cultura RPMI (Gibco/Invitrogen, NY, USA). Com o auxílio de pinças curvas, o órgão foi macerado e mantido acondicionado no gelo. A seguir foram adicionados 3 mL de solução de digestão tecidual (1µg/mL de liberase Blendzyme 2 (Roche) e 0,1 µg/mL de DNase de pâncreas bovino (Sigma Aldrich) e incubadas a 37 °C e 5% de CO₂, por 40 min sob agitação.

Após este período, os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10 mL por 10 ciclos de homogeneização e os homogenatos obtidos filtrados em *cell strainer* com poro de 40 µm (BD Bioscience, CA, USA). O homogenato isento de matriz tecidual foi destinado à quantificação micobacteriana através da diluição decimal seriada e plaqueamento meio sólido 7H10 suplementado. As placas foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% CO₂ por 10 a 20 dias e o CFU quantificado. O restante do homogenato foi processado para obtenção de células. As hemácias foram removidas através da depleção com tampão de lise ACK (*Ammonium Chloride Potassium*) (0,144 M NH₄Cl, 0,0169M TRIS base, pH 7,4) à 37 °C e 5% de CO₂ por 4 min. A lise de hemácias foi interrompida com o acréscimo de PBS 1X suplementado com 10% SFB. Os tubos contendo homogenato pulmonar de cada animal foram centrifugados a 300g, por 5 min e o sobrenadante descartado. O pellet de células foi ressuscitado proporcionalmente em RPMI suplementado com 10% SFB e 50 µg/mL de gentamicina. As células foram quantificadas e plaqueadas em placas de 96 poços (5 x 10⁵ células/mL). As placas com a cultura celular foram lacradas e incubadas por 48 h em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% de CO₂. O sobrenadante da cultura *ex vivo* foi coletado para análises posteriores de quantificação de mediadores inflamatórios.

4.13. Análise macroscópica e histológica dos pulmões

A avaliação da macro e micropatologia foram realizadas para o pulmão nos dias 28, 40, 60, 120 e 150 após a infecção. O lóbulo superior direito foi selecionado para a análise histológica sendo fixado por no mínimo 96 h em formol 10% tamponado. A macropatologia foi avaliada através da pesagem dos pulmões dos animais, comparando os valores com o peso do pulmão entre os animais não infectados. Após a fixação, o lóbulo superior direito do pulmão de cada animal foi fotografado com escala em centímetros, para a avaliação macroscópica das mudanças morfológicas do órgão. A massa relativa foi calculada pela razão entre o peso do pulmão de cada animal infectado e a média do peso do pulmão dos animais controle. Os estudos histopatológicos para avaliar a micropatologia foram realizados nos cortes dos tecidos, a partir da coloração com hematoxilina-eosina (HE) para a visualização das alterações teciduais, pelo método de Ziehl-Nielsen (ZN) para detecção da presença de bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) e Tricômico de Masson para analisar a presença de fibras de colágeno.

O processamento histológico ocorreu após a fixação do pulmão em formol 10% tamponado, e as secções foram lavadas com água destilada por 30 min e conduzidas por banhos crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada concentração. Em seguida, as secções pulmonares passaram por dois banhos de xilol por 1 h cada. Ao final desse processo foi realizada a inclusão em parafina por 30 min. Após este procedimento de fixação e clarificação (Histotec), as peças emblocadas em parafina foram acondicionadas em gelo. Os blocos contendo as secções rígidas foram clivadas no micrótomo (Leica) numa espessura de 5 µm. Os cortes foram banhados em duas baterias de xilol por 3 min cada e depois banhadas em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 min em cada concentração. Após foram coradas com hematoxilina por 3 min e eosina por 50 segundos. Logo após, foram banhadas novamente em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 min em cada concentração e depois em xilol por 3 min. Em seguida, os cortes foram fixados permanentemente com Permount.

Para a coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen, as lâminas lavadas foram imersas em solução aquecida de carbol-fuscina por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e tratadas com álcool-ácido 1% até atingir a tonalidade rósea. Os tecidos foram lavados novamente em água

corrente por 8 min, com posterior imersão em azul de metileno (10 mL da solução estoque (4 mM de azul de metileno em álcool etílico 95%) acrescido de 90 mL de água destilada). Após esse processo os cortes foram fixados com Permout e analisados por microscopia óptica (microscópio Zeiss-Axioplan).

Para a realização da coloração com Tricrômico de Masson foi aplicada sobre os cortes a solução de Bourin e deixado *overnight*. Após este período, os cortes foram lavados em água corrente por 1 h até retirar a cor amarela na amostra. Em seguida foram corados com hematoxilina férrica de Weigert por 10 min e lavados novamente em água corrente por 10 min e colorados com solução de Escarlata de Biebrich por 5 min. Foi realizada mais uma lavagem com água destilada e uma nova coloração com solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 10 a 15 min. Em seguida, foi realizada uma lavagem com água destilada e aplicada solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 min. As amostras foram lavadas 1 x e dispostas em solução de 1% de ácido acético glacial por 3 a 5 min. Após nova lavagem com água destilada, os cortes foram banhados em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 min em cada concentração e em xilol por 3 min. Os cortes então foram fixados permanentemente com Permout. Finalizada a técnica, as fibras de colágeno adquiriram coloração azulada. As técnicas de coloração com HE, Ziehl Neelsen e Tricômico de Masson foram realizadas em colaboração com o prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Patologista Clínico do Laboratório de Sanidade Animal, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

4.14. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios

A quantificação dos mediadores inflamatórios foi realizada a partir do sobrenadante da cultura das células pulmonares cultivadas *ex vivo* e da cultura de macrófagos infectados *in vitro*.

As citocinas presentes nos sobrenadantes foram quantificadas através do ensaio de ELISA sanduíche, utilizando os kits correspondentes (Opteia/BD Biosciences, CA, USA) para TNF- α , IL-1 β e IL-10, de acordo com o protocolo do fabricante.

O óxido nítrico (NO) produzido no sobrenadante da cultura *ex vivo* foi quantificado através do método de Griess (ZHANG *et al.*, 2002). 50 μ L do sobrenadante da cultura foi acrescido de 50 μ L de reagente de Griess (*p*-

aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico (Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância, a 570 nm, foi medida em espectrofotômetro de placa (Epoch UV-Vis, Biotek, USA). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μM usando como referência uma curva padrão de nitrito de sódio (200 μM a 1,56 μM).

4.15. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 4 (GraphPad, EUA) e as diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (5%). Para comparar múltiplos grupos, utilizou-se o teste ANOVA unidirecional seguido do teste de comparação múltipla de Tukey para avaliar os efeitos de um único parâmetro. As curvas de sobrevivência dos animais foram analisadas com o método de Kaplan-Meier.

4.16. Conduta de trabalho

Todo trabalho experimental para a realização desta pesquisa foi realizado em área de biossegurança nível 2 e 3. Para a manipulação das culturas micobacterianas foram utilizados equipamentos de proteção individual (EPIs) para minimização do risco de contaminação do indivíduo. A manipulação de todo material infectado por Mkan foi realizado em cabine de biossegurança 2 nos Biotérios de NB3/ LBR/UENF.

Após a realização dos experimentos, todo resíduo e material contaminado por Mkan foi coletado em sacos de autoclave dentro da cabine de biossegurança ou imersos em solução de hipoclorito de sódio 4%, e conduzidos para a descontaminação em autoclave a 121°C por 40 min.

4.17. Modelo de pesquisa

A **Figura 10** mostra o fluxograma das atividades de cultura celular e infecções *in vitro* com os isolados clínicos de Mkan assim como a avaliação destes em modelo murino realizadas neste estudo.

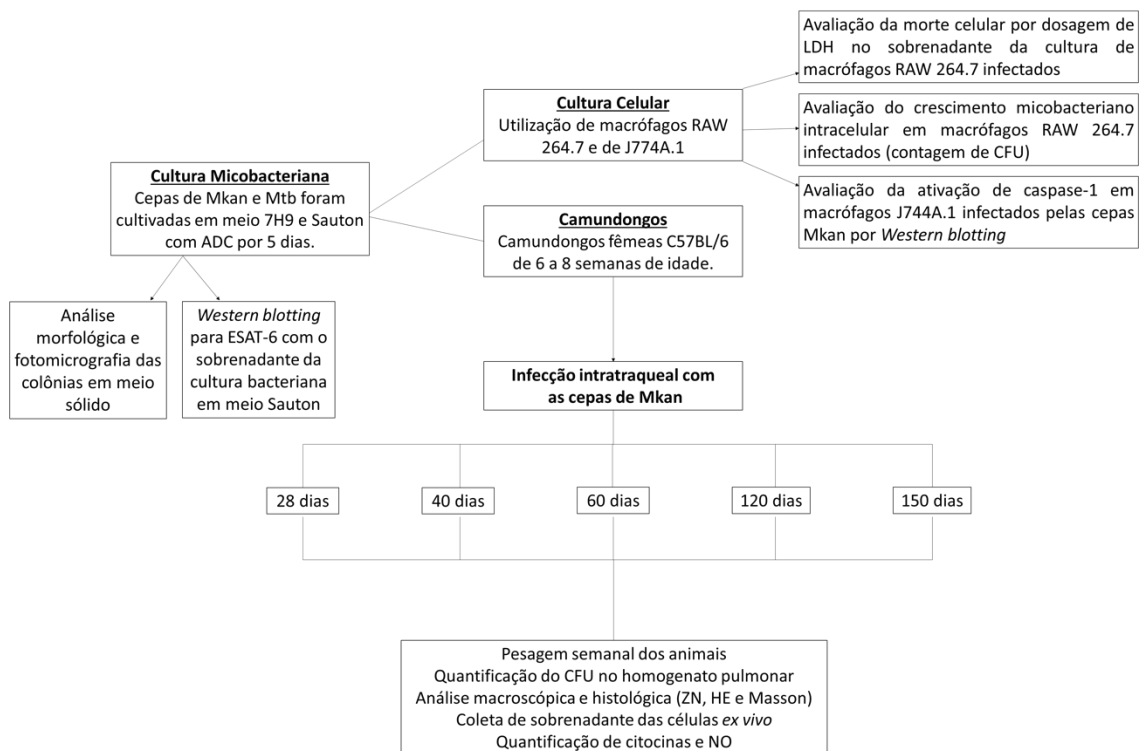


Figura 10 – Fluxograma da sequência experimental.

5. RESULTADOS

5.1. Morfologia das colônias de *M. kansasii*

A morfologia das colônias de onze isolados clínicos de Mkan foram comparadas com a da cepa de referência Mkan 12478 ATCC. Dez dos onze isolados exibiram colônias circulares rugosas com textura seca e margens onduladas, como a cepa de referência ATCC 12478, sendo classificadas como *rough/rugosa* (cepas R), exceto o isolado 6849 que exibiu colônias lisas e úmidas, classificado como *smooth / liso* (cepa S). A forma das cepas R assemelhava-se à da cepa Mtb M299 (**Figura 11 A**); no entanto, em contraste com as colônias de cor esbranquiçadas exibidas por Mtb, todos os isolados de Mkan apresentaram colônias com capacidade fotocromogênica, produzindo pigmento amarelo sob exposição à luz (**Figura 11 B**).

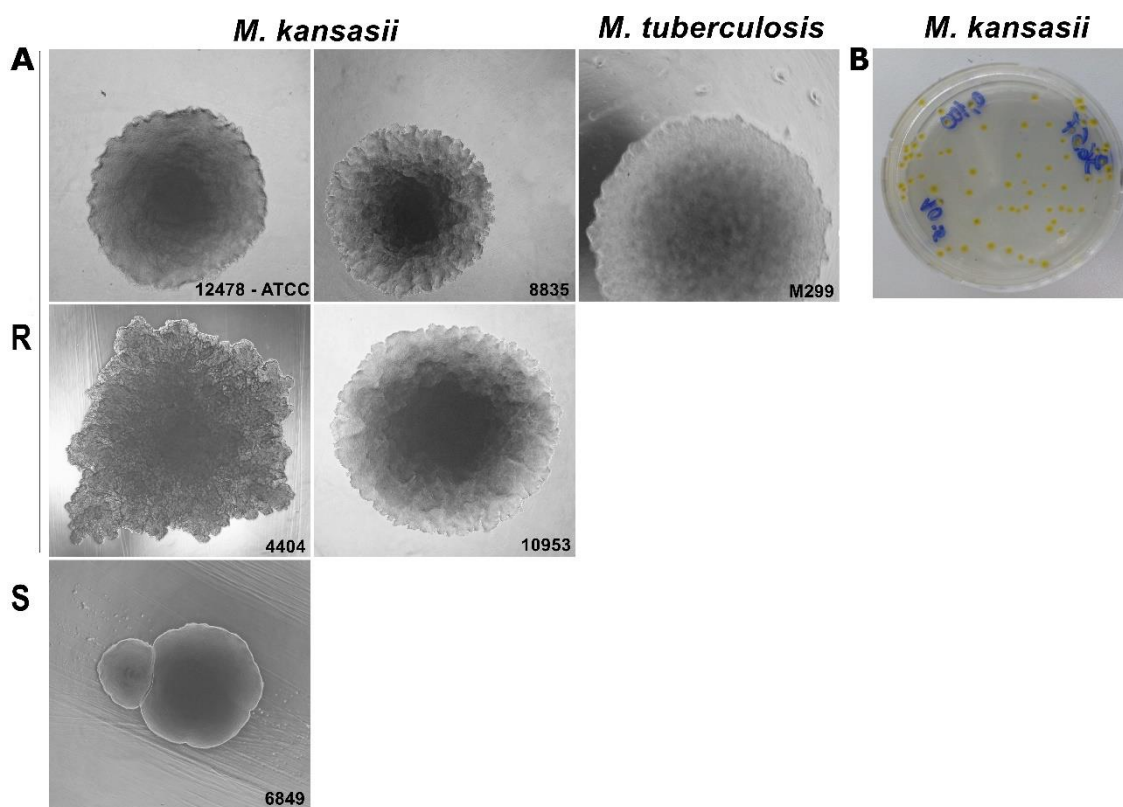


Figura 11 – Variação da morfologia das colônias de *M. kansasii* em comparação a cepa *Mycobacterium tuberculosis* M299. As cepas foram cultivadas em ágar Middlebrook 7H10 por 21 dias (Mkan) e 28 dias (Mtb). Após este período as fotomicrografias das colônias foram realizadas com auxílio de um estereomicroscópio na ampliação de x 4 a x 20 para as cepas 8835, 4404, 10953, 6849, a cepa de referência Mkan 12478 e para a cepa de Mtb M299. **(B)** Imagem representativa das colônias de Mkan cultivadas em ágar exibindo coloração amarela sob exposição à luz. Abreviaturas R- rough (rugoso) e S-smooth (liso).

5.2. Seleção das cepas *M. kansasii* para avaliação da virulência no modelo *in vivo*

A capacidade de crescimento intracelular acelerado assim como a capacidade de induzir a morte dos macrófagos infectados foram previamente associados à virulência em micobactérias patogênicas (LASUNSKAIA *et al.*, 2010; SOHN *et al.*, 2010). Em nosso trabalho anterior, avaliamos ambos os parâmetros para os isolados clínicos de Mkan obtidos de pacientes brasileiros com a doença pulmonar (MUSSI, 2017). Com base nestes resultados em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados *in vitro* foi possível determinar o nível de virulência dos isolados clínicos de Mkan pertencentes a nossa coleção de cepas. Essa classificação foi realizada quanto à capacidade de crescimento intracelular (Index A) e capacidade de indução de morte celular nos macrófagos (Index B) comparado à cepa de referência ATCC 12478 e a média destes dois index foi calculada para cada isolado clínico de Mkan $[(\text{index A} + \text{index B}) / 2]$ e utilizada como índice de virulência relativa (**Tabela 2**). As cepas 8835, 8839, 8837 e 10953 apresentaram índice de virulência relativa pelo menos 2,5 vezes maior que a virulência da cepa de referência 12478 (index 1,0) e foram consideradas cepas de alta virulência classificadas como padrão I. A cepa 6849 mostrou um índice de virulência relativa 2,5 vezes menor do que a cepa de referência 12478 e foi considerada de baixa virulência classificada como padrão III. Enquanto outras cepas de Mkan (4404, 1580, 3657, 7287, 7439) exibiram virulência intermediária, com índice de virulência relativa de 1,2 a 2,3 vezes maior do que a cepa de referência 12478, sendo inclusos juntamente com a cepa de referência no padrão II. Para testes *in vivo*, selecionamos cinco isolados clínicos: duas cepas de virulência intermediária (cepa 4404 e cepa de referência 12478, ATCC), uma cepa de baixa virulência (cepa 6849) e duas cepas de alta virulência (cepas 8835 e 10953).

Tabela 2 – Índice de virulência relativa dos isolados clínicos de *M. kansasii* em comparação a cepa de referência 12478 (ATCC) avaliado no modelo de macrófagos infectados *in vitro*.

Cepa	Capacidade relativa de crescimento intracelular em macrófagos (Index A)	Capacidade relativa para induzir morte necrótica (Index B)	Índice de virulência relativa (Index A + Index B / 2)	Padrão de virulência* <i>In vitro</i>
Cepa de referência 12478	1,0	1,0	1,0	II
1580	3,0	1,1	2,05	II
3657	1,0	0,9	0,95	II
4404	3,0	1,6	2,3	II
7287	1,6	1,5	1,55	II
7439	1,6	0,8	1,2	II
6849	0,1	0,7	0,4	III
8835	3,6	2,5	3,05	I
8837	4,0	1,7	2,85	I
8839	4,0	2,8	3,4	I
10953	4,0	2,2	3,1	I

* virulência preditiva

Padrão III (baixa virulência) - taxa de virulência relativa $\leq 0,4$; Padrão II (virulência intermediária) - taxa de virulência relativa $0,41 \leq x \leq 2,49$; Padrão I (virulência aumentada) - taxa de virulência relativa $\geq 2,5$

5.3. Avaliação da morbidade e mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com as cepas de *M. kansasii*

Os animais foram infectados por via intratraqueal com 5×10^4 bacilos e monitorados em relação aos sinais e sintomas da doença (imobilização, falta de apetite e emagrecimento). Os animais infectados foram pesados semanalmente para verificar a alteração do peso corporal, sendo a perda de peso utilizada como indicador de morbidade.

Camundongos infectados com a cepa menos virulenta (6849) apresentaram ganho de peso corporal a partir do dia 40 p.i., enquanto os animais de outros grupos infectados (12478, 4404, 10953) mantiveram os valores de peso corporal inalterados ou exibiram perda de peso significativa (8835), a partir do dia 28 p.i. (**Figura 12 A**). As análises de sobrevivência demonstraram a morte prematura dos camundongos infectados com a cepa de alta virulência 8835 no dia 40 p.i., e 60% de letalidade no grupo de animais infectados com a cepa 10953 no dia 120 p.i., enquanto nos demais grupos, os animais sobreviveram até o final do experimento (**Figura 12 B**).

A análise das cargas bacterianas pulmonares demonstrou que todas as cepas, incluindo a cepa menos virulenta 6849, foram capazes de crescer nos pulmões dos animais até o dia 28 p.i. (**Figura 12 C**). A cepa 8835, mais virulenta, induziu carga bacteriana mais alta ($\log_{10} 8,0$) até o dia 40 p.i., coincidindo com a deterioração dos animais deste grupo que atingiram o estado moribundo e em vista disso foram eutanasiados. Em contraste, as cargas bacterianas pulmonares em outros grupos começaram a diminuir após o dia 28, demonstrando apenas uma ligeira redução nos camundongos infectados com as cepas 10953 e 12478, e mais de 2 log de redução no grupo 4404, no dia 60, enquanto em camundongos infectados com a cepa 6849 de baixa virulência, as bactérias foram eliminadas dos pulmões no dia 40 pi. Nos grupos de animais que desenvolveram infecção crônica, as cargas bacterianas nos pulmões começaram a aumentar novamente após o dia 60 atingindo o nível $\log_{10} 8,0-9,0$ no dia 150 pi.

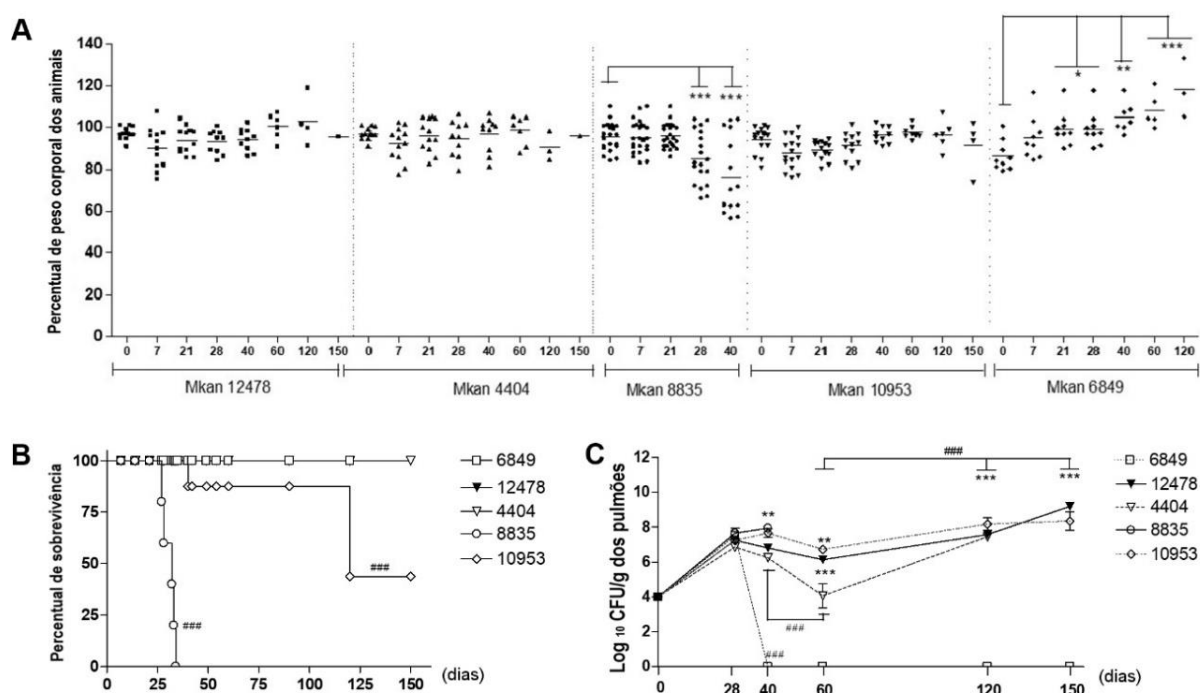


Figura 12 – Morbidade e mortalidade de camundongos após infecção com cepas de *M. kansasii*. Camundongos C57BL/6 foram infectados por via intratraqueal com 5×10^4 bacilos de cada cepa separadamente e a progressão da doença foi estudada em um período de 150 dias. **(A)** A perda de peso corporal foi utilizada como indicador de morbidade. Os dados foram apresentados em relação ao porcentagem do peso corporal inicial de cada animal antes da infecção. Os valores foram relatados como média \pm desvio padrão, DP, e as diferenças foram consideradas significativas de acordo com *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; e * $P < 0,05$. **(B)** Curva de sobrevivência dos animais infectados. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes com 10 camundongos em cada grupo. Curvas de Kaplan-Meier e teste log-rank foram usados para avaliar a significância estatística. Diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo infectado com o isolado clínico individual e o grupo infectado com a cepa de referência 12478 são apresentadas pelo símbolo #### $P < 0,001$. **(C)** As cargas bacterianas nos

pulmões foram avaliadas pelo ensaio CFU. Os dados foram obtidos em três experimentos independentes com 12 a 15 camundongos em cada grupo: 2 a 3 animais por ponto. Os valores foram relatados como média \pm DP. Os valores médios que foram significativamente diferentes do valor médio do grupo infectado pela cepa de referência 12478 são indicados por asteriscos como segue: *** $P < 0,001$ e ** $P < 0,01$. Diferenças significativas entre os valores obtidos para cada grupo em diferentes momentos são indicadas pelo símbolo ### $P < 0,001$.

5.4. Avaliação macroscópica e histológica dos pulmões

A patologia nos pulmões foi monitorada durante 150 dias p.i. para avaliar a progressão de marcas patológicas induzidas pelas cepas de Mkan. No dia 28 p.i., pequenos nódulos brancos uniformemente distribuídos no tecido pulmonar pulmões foram observados em todos os animais infectados, exceto nos camundongos infectados com a cepa altamente virulenta 8835, que exibiram uma consolidação lobular difusa (**Figura 13 A**). Neste grupo, os animais exibiram sinais de doença grave e foram eutanasiados no dia 40 p.i. As lesões pulmonares em outros grupos (4404, 12478 e 10953) continuaram a se expandir e finalmente se fundiram, formando grandes nódulos bem demarcados nos estágios posteriores da infecção ou continuaram sem alterações morfológicas significativas (cepa 6849). No dia 150 p.i., os nódulos patológicos nos pulmões de alguns animais infectados com a cepa 10953 apresentaram alterações na superfície ulcerada, sugerindo derrame pleural (**Figura 13 A**). Também foi realizado o cálculo da massa relativa pulmonar (**Figura 13 B**) de cada pulmão para comparar o tamanho dos lóbulos apresentados na Fig. 12A. Os pulmões dos animais infectados com as cepas mais virulentas possuíram a massa relativa pulmonar maior do que observado para os animais sem infecção (CTL) e para os animais infectados com a cepa de referência ATCC 12478.

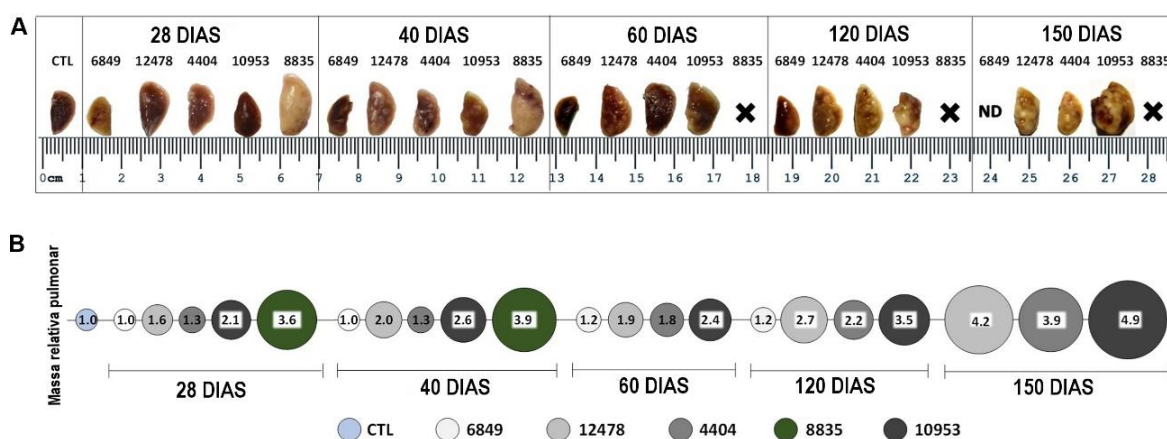


Figura 13 – Alterações macropatológicas nos pulmões de camundongos infectados com cepas de *M. kansasii*. Os camundongos C57BL/6 foram infectados conforme indicado na legenda da Figura 12 e os pulmões foram examinados nos dias 0, 28, 40, 60, 120 e 150 pi. **(A)** Imagens representativas do lóbulo superior do pulmão direito de um animal de cada grupo infectado por período de infecção demonstrando a patologia macroscópica, observado como numerosas e grandes lesões inflamatórias (nódulos brancos de tamanhos diferentes). **(B)** A massa pulmonar relativa em diferentes grupos infectados foi determinada pela razão do peso médio do pulmão dos animais de cada grupo em relação ao peso médio do pulmão dos animais controle (CTL) (1,0). ND, não demonstrado; X-morte prematura dos animais.

Nos testes histopatológicos, três cenários diferentes de desenvolvimento de patologia nos pulmões foram observados nos animais de diferentes grupos de infecção. A cepa de baixa virulência 6849 induziu pequenos granulomas no dia 28 p.i., posteriormente, o desenvolvimento dessas lesões pulmonares não evoluiu (**Figuras 14 A, B**). Em contraste, as lesões pulmonares em camundongos infectados com a cepa 8835 se desenvolveram mais rapidamente do que em outros grupos e foram caracterizadas por extensa inflamação granulomatosa, levando a pneumonia lobular no dia 28 p.i., com consolidação quase completa do tecido pulmonar no dia 40 (**Figuras 14 C-F**).

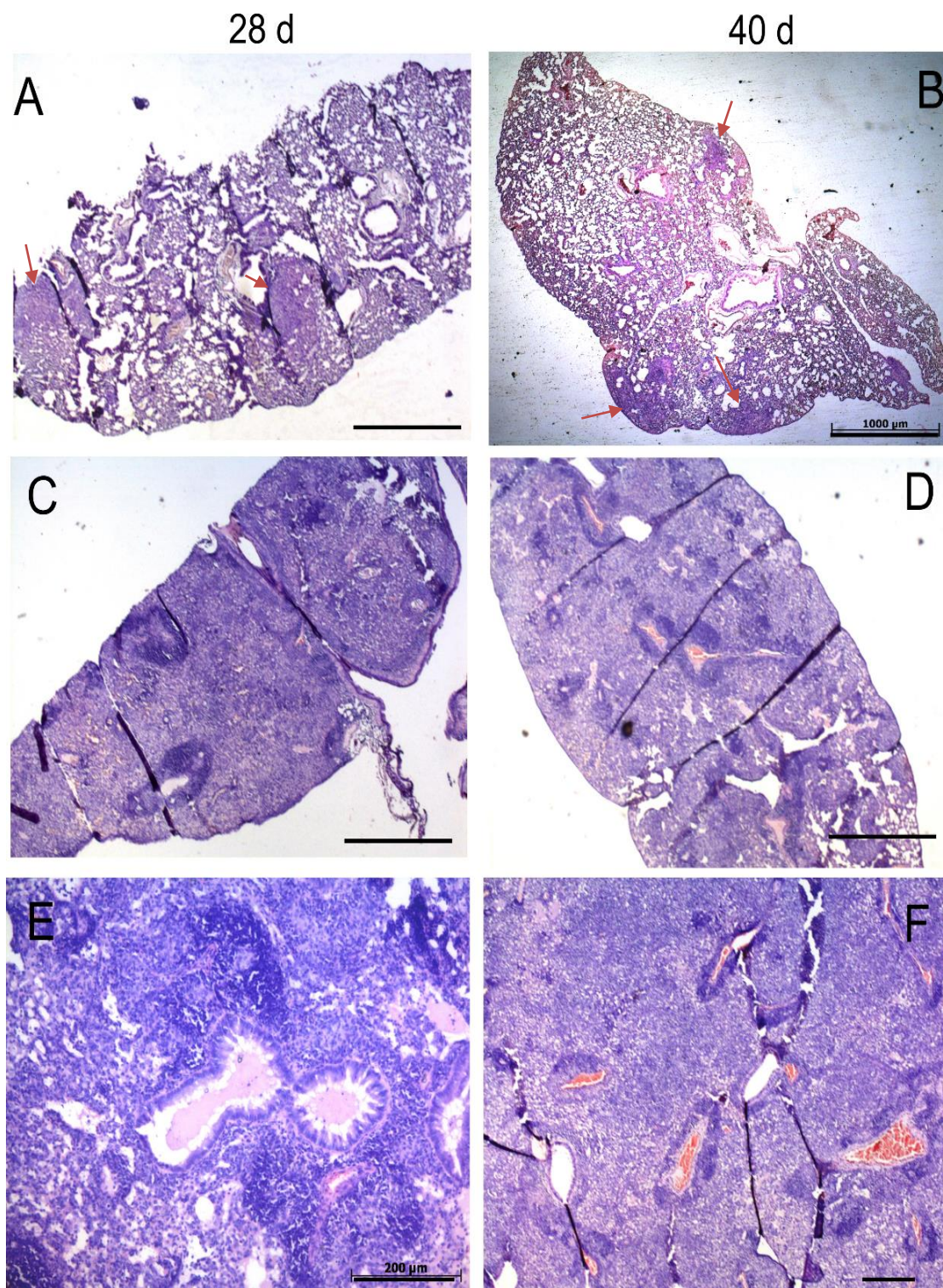


Figura 14 – Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos infectados com a cepa 6849 de baixa virulência e cepa 8835 de alta virulência. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa 6849 (A, B) ou cepa 8835 (C–F) e os pulmões foram examinados no dia 28 (A, C, E) e no dia 40 p.i. (B, D, F). As lâminas são representativas do pulmão de animais de cada um dos grupos acima citados, que foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). (A, B) Poucos granulomas e de tamanho pequeno marcados com setas vermelhas (C–F) Pneumonia extensa: infiltração difusa de tecido com macrófagos, com concentração de linfócitos ao redor de bronquíolos e vasos. (E) Acúmulo de exsudatos nos bronquíolos respiratórios no dia 28 p.i., (F) congestionamento sanguíneo nos vasos e morte celular necrótica difusa no parênquima pulmonar no dia 40 p.i.. Barras, 1.000 μm (A–D), 200 μm (E, F).

O terceiro cenário de desenvolvimento de lesões pulmonares, caracterizado por uma progressão lenta e permanente dos granulomas iniciais, foi observado em animais infectados com as cepas 12478, 4404 e 10953. Alterações histopatológicas nos pulmões desses animais foram demonstradas para a cepa 10953, como representativo para estes três grupos infectados (**Figura 15**). Nesses animais, pequenos granulomas iniciais aumentaram gradualmente e, no dia 60, vários focos de necrose intragranulomatosa foram observados (**Figura 15 D-F**), composto por macrófagos e numerosos BAAR intra- e extra-celulares, circundados por linfócitos. A progressão posterior levou ao desenvolvimento de grandes granulomas caseosos (**Figura 15 D**), contornados por uma cápsula fibrosa (revelada pela coloração de Masson), com grande número de neutrófilos nas regiões subcapsulares (**Figura 15 E**) e a área central com necrose caseosa (**Figura 15 I**). No dia 150 p.i. (**Figura 15 J-L**), a necrose tecidual conduziu à destruição da estrutura pulmonar típica, com deslocamento do material necrótico amorfo (quadrado preto inferior), oclusão das vias aéreas brônquicas (setas com contorno preto em J) e derrame pleural. Fibrose intersticial significativa com muitas células espumosas contribuiu para a consolidação do tecido pulmonar circundante. A expansão das lesões nos animais infectados com as cepas 12478 e 4404 foi mais retardada em relação aos animais infectados com a cepa 10953. O desenvolvimento dos granulomas caseosos no grupo de animais infectados pela cepa 10953 foi observado em 4 meses de infecção (120 dias p.i.), e nos grupos anteriores foi observado somente após 5 meses de infecção (150 dias p.i.), coincidindo com a melhor sobrevivência dos animais nestes grupos.

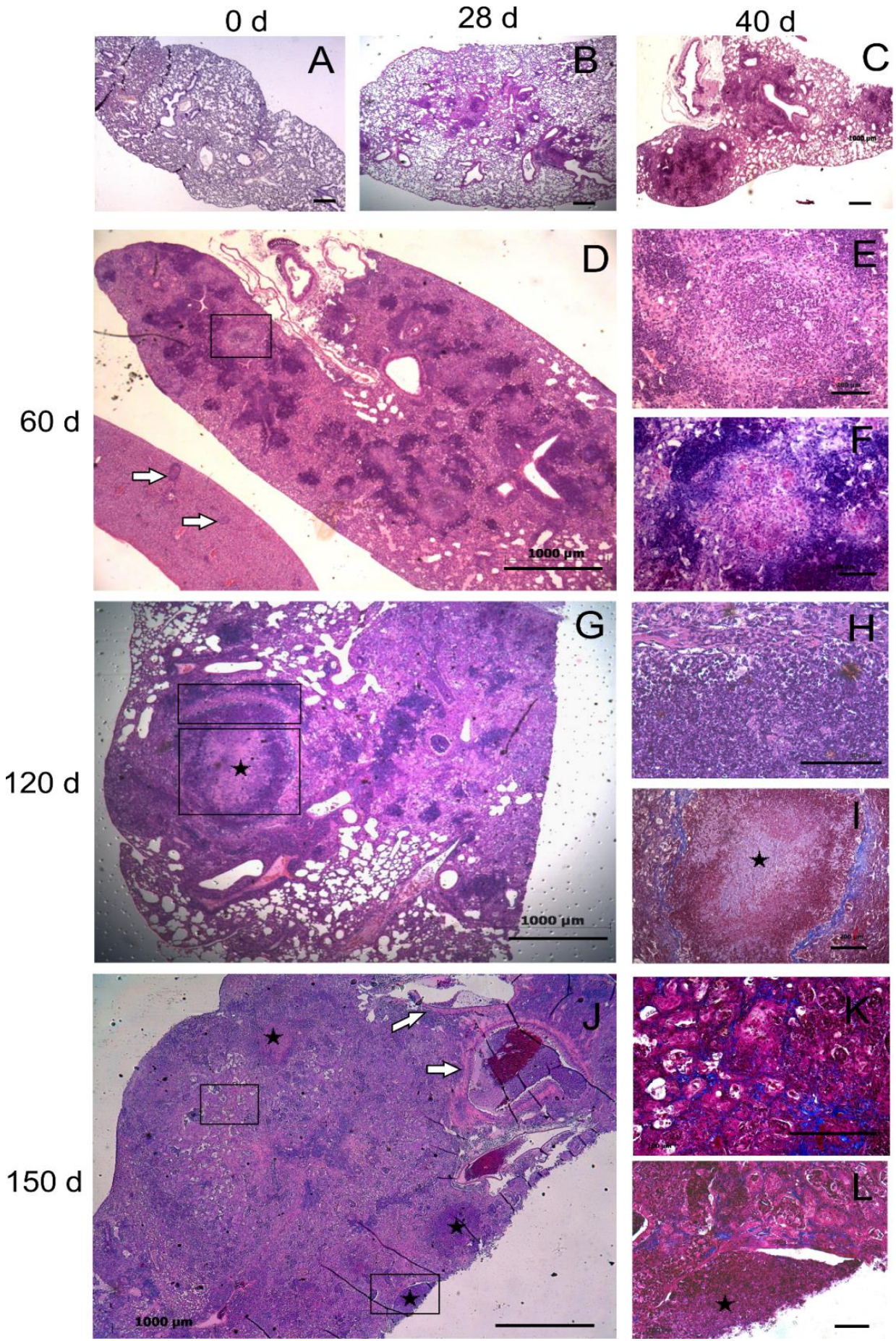


Figura 15 – Alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos infectados com a cepa 10953 de *M. kansasii* altamente virulenta. Camundongos C57BL/6 foram infectados e a patologia pulmonar foi examinada durante um período de 150 dias, no dia 0 (A), 28 (B), 40 (C), 60 (D–F), 120 (G–I) e 150 (J–L). Lâminas de pulmão representativas coradas por H&E (A–E, G, H, J), Ziehl-Neelsen (F) ou métodos Tricrômico de Masson (I, K, L) são mostradas. Pequenos granulomas observados no dia 28 (B), aumentaram no dia 40 (C) e progrediram para pneumonia granulomatosa extensa no dia 60 (D). A área de necrose intragranulomatosa inicial, marcada pelo quadrado preto no painel (D), é ampliada nos painéis (E, F), demonstrando grande número de células morrendo (E) e BAAR (F). No painel (D), uma seção do fígado (I) eventualmente está localizada ao lado da seção do pulmão; as setas brancas indicam vários granulomas no fígado. No dia 120, as lesões necróticas progrediram para grandes granulomas caseosos marcados por quadrados pretos (G). Os quadrados superior e inferior referem-se às áreas de maior ampliação no painel (H) (área periférica composta por infiltrados de células com predominância de neutrófilos) e (I) (área central ocupada por necrose caseosa), respectivamente. Observe uma cápsula fibrótica circundando a lesão necrótica (I). No dia 150 (J), a necrose leva à destruição da estrutura pulmonar normal (símbolo *) com fácil deslocamento do material necrótico amorfo [quadrado preto inferior ampliado no painel (L)] e sua presença em vias aéreas brônquicas ocluídas [setas pretas no painel (J)]. A área marcada pelo quadrado superior no painel (J), ampliada no painel (K), demonstra fibrose intersticial significativa do pulmão. Barras, 1.000 µm (A–D, G, J), 100 µm (E, F, H, I, K).

A análise morfométrica da área ocupada pela pneumonia demonstrou que a infecção com cepas mais virulentas de Mkan (8835 e 10953) conduziu ao comprometimento de 90% do tecido pulmonar no estágio final pré-letal da infecção, embora a duração da doença antes da morte tenha variado de acordo com a virulência da bactéria causadora (**Figura 16**). Para a cepa menos virulenta (6849), a área de pneumonia nos pulmões dos animais foi de apenas 20% do tecido pulmonar em todos os estágios da doença avaliados. Enquanto para a cepa de referência 12478, o comprometimento pulmonar foi de 36% em 28 dias p.i. com aumento da área comprometida nos estágios posteriores até 80% de área de pneumonia em 150 dias p.i., embora a progressão da área de pneumonia tenha ocorrido de forma retardada comparado as cepas de maior virulência, o que também foi observado para a cepa 4404 (**Figura 16**).

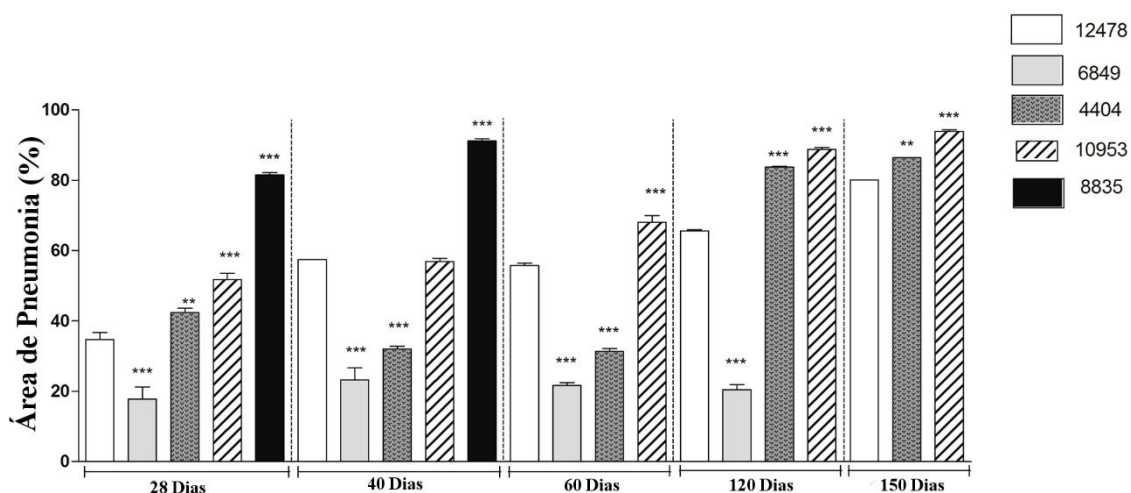


Figura 16 – Análise morfométrica da patologia pulmonar em animais infectados com cepas de *Mkan*. Para determinação morfométrica da área inflamatória ocupada nos pulmões por exsudatos celulares ou líquidos (área de pneumonia), imagens de dez cortes pulmonares de cada grupo de animais foram capturadas e analisadas no programa Image J. As diferenças estatisticamente significativas entre cada grupo infectado com o isolado clínico individual e o respectivo grupo infectado com a cepa de referência 12478 são apresentadas por asteriscos como segue: *** P < 0,001 e ** P < 0,01.

5.5. Análise da produção de citocinas e óxido nítrico pelas células dos pulmões dos animais infectados com cepa de *M. kansasii*

O perfil de mediadores inflamatórios produzidos pelas células pulmonares dos animais infectados por *Mycobacterium* está associado ao nível de ativação das subpopulações celulares presentes no foco inflamatório granulomatoso. Deste modo, avaliamos inicialmente a produção de citocinas produzidas pelas células pulmonares, a partir do sobrenadante da cultura *ex vivo* das células do pulmão por 48 h. Foi quantificada a produção de três citocinas importantes envolvidas na resposta inflamatória e na indução da resposta imune protetora, IL-1 β e TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) e IL-10 (citocina anti-inflamatória) através do ensaio de ELISA sanduíche.

Na **Figura 17** pode ser observado que houve produção de todas as citocinas em estudo após 28 dias de infecção para todas as cepas avaliadas em comparação aos animais não infectados.

Ao analisarmos a produção de IL-1 β pelas células pulmonares dos animais infectados, foi observado que em animais infectados pela cepa 6849, de baixa virulência, como esperado, houve diminuição da produção de IL-1 β após 28 dias de infecção, atingindo menor nível no dia 150 p.i. (p < 0,001). A indução

da produção de TNF- α por esta cepa foi menor comparada com as demais no dia 28 p.i., principalmente comparado com as cepas 4404 e 10953, e baixos níveis de produção desta citocina foram mantidos nestes animais durante todo período de observação. A indução da produção de IL-10 se mostrou similar até 40 dias p.i. as demais cepas avaliadas, sendo menor posteriormente ao longo do período acompanhado (**Figura 17**), mostrando uma tendência de controle da infecção pelos animais ou mesmo eliminação dessa cepa.

A produção das citocinas pelas células dos animais infectados pela cepa 8835, caracterizada pela maior letalidade, no dia 28 p.i. foi similar ao observado para as demais cepas. No dia 40 p.i., quando animais apresentaram sinais de doença fatal, a produção da IL-1 β foi mantida no mesmo nível, e a produção das citocinas TNF- α e IL-10 sofreu uma redução ($p < 0.05$).

As demais cepas de Mkan, que foram capazes de induzir em camundongos infecção progressiva crônica, induziram níveis similares de IL-1 β no dia 28 p.i., que foram mantidos com pequena variação até dia 120 p.i., demonstrando um aumento no dia 150 p.i. nos animais infectados pelas cepas mais virulentas (cepas 10953 e 4404) comparado ao nível exibido pela cepa 12478 no mesmo período. As cepas 10953 e 4404 apresentaram tendência ao aumento na indução de TNF- α e IL-10 a partir do dia 60 p.i. Entretanto, níveis maiores na produção dessas citocinas foram mantidos até dia 150 p.i. somente nos animais infectados pela cepa 10953 (**Figura 17**) que apresentaram o desenvolvimento acelerado da patologia no pulmão e maior letalidade.

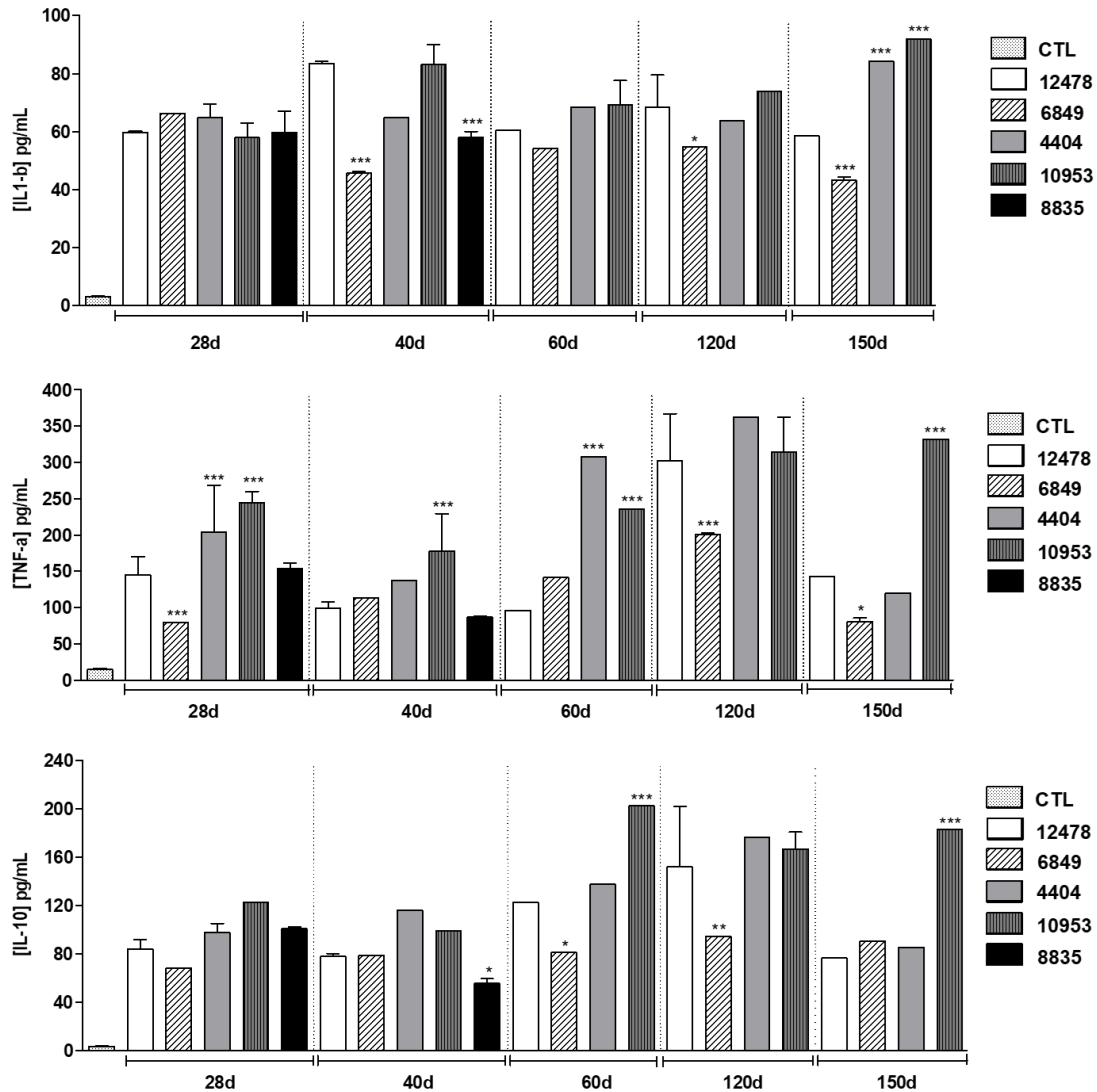


Figura 17 – Análise da produção de citocinas no sobrenadante da cultura *ex vivo* de células dos pulmões dos animais infectados com cepa de *M. kansasii*. Os sobrenadantes da cultura *ex vivo* do homogenato pulmonar foram coletados 48 h após a abertura dos animais e utilizados para quantificação de citocinas (IL-1 β , TNF- α e IL-10) através de ELISA *sanduíche* utilizando kits específicos. Os animais não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Além da quantificação dos níveis de citocinas produzidos pelas células pulmonares dos animais infectados, outro mediador inflamatório foi avaliado no sobrenadante *ex vivo*, o óxido nítrico (NO). Na **Figura 18** é possível verificar a indução exacerbada de NO pela cepa 8835 em 28 dias de infecção, que diminuiu no dia 40 p.i., o que foi associado com maior nível de severidade da doença nestes animais. Outras cepas foram capazes de induzir níveis intermediários de NO no dia 28d p.i., à exceção da cepa 6849 cuja indução foi muito baixa, se houve quando comparado ao controle negativo (animais não infectados). Em

relação à cepa 10953, o pico de produção de NO foi atingido no dia 60 p.i., com posterior diminuição nos demais períodos avaliados. A produção de níveis intermediários de NO foi observada na cultura de células pulmonares dos animais infectados pela cepa de referência 12478 ao longo dos 120 dias, com tendência de diminuição em 150 dias p.i.. Um aumento na produção de NO foi observado na infecção pela cepa 4404 em 120 dias p.i (Figura 18).

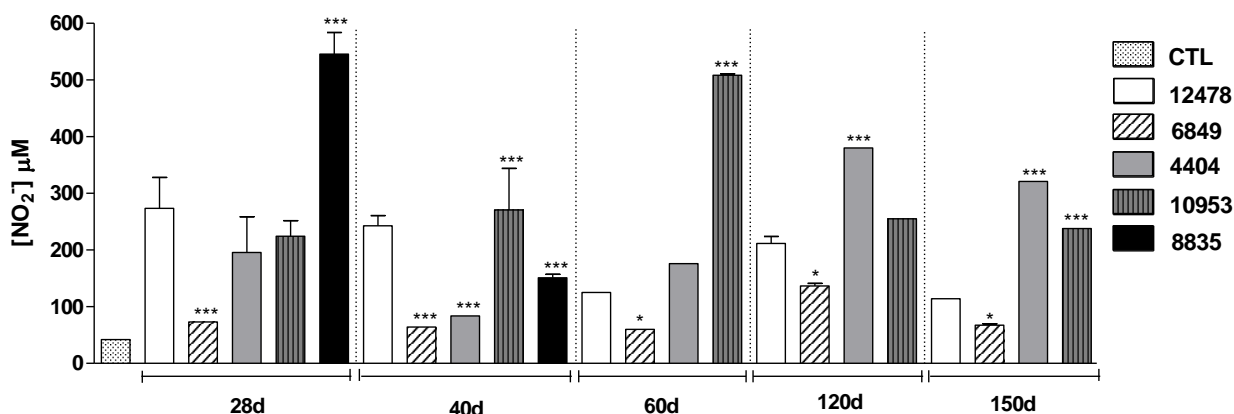


Figura 18 – Análise da produção de NO no sobrenadante da cultura *ex vivo* de células dos pulmões dos animais infectados com cepa de *M. kansasii*. Os sobrenadantes foram coletados 48 h após a abertura dos animais e utilizados para quantificação de NO através da reação de Griess. Os animais não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μM usando como referência uma curva de nitrito de sódio, decrescida do valor obtido com os aditivos sem células. Os valores foram calculados e depois reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

5.6. Estudo da produção de IL-1 β e ativação de inflamassoma em macrófagos infectados *in vitro*

A fim de verificar os possíveis mecanismos patogênicos que podem contribuir para maior ou menor virulência das cepas de Mkan, avaliamos a capacidade das cepas Mkan em ativar a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β nos macrófagos infectados uma vez que a ativação de inflamassoma depende pelo menos parcialmente da secreção de IL-1 β .

A cultura de macrófagos foi infectada separadamente em diferentes proporções de infecção pelas cinco cepas Mkan em estudo, e a produção da IL-1 β foi quantificada nos sobrenadantes de cultura (Figura 19 A). Em paralelo, a capacidade de crescimento intracelular micobacteriano também foi avaliada (Figura 19 B) assim como a capacidade de induzir morte celular necrótica (Figura 19 C).

Os resultados demonstraram que a indução de IL-1 β pelas cepas mais virulentas (cepas 8835 e 10953) em 24 h e 72 h de infecção foi significativamente menor em comparação com as cepas de virulência intermediária (cepas ATCC 12478 e 4404) no mesmo intervalo de tempo; e a cepa 6849 não induziu produção de IL-1 β nos macrófagos infectados em 24 h ou 72 h (**Figura 19 A**). Os dados confirmaram que a capacidade das cepas 8835 e 10953 de crescer nos macrófagos e induzir morte necrótica foi significativamente maior em 24h e 72 h que o observado para as demais cepas, confirmando maior virulência apresentada por essas cepas (**Figura 19 B e C**).

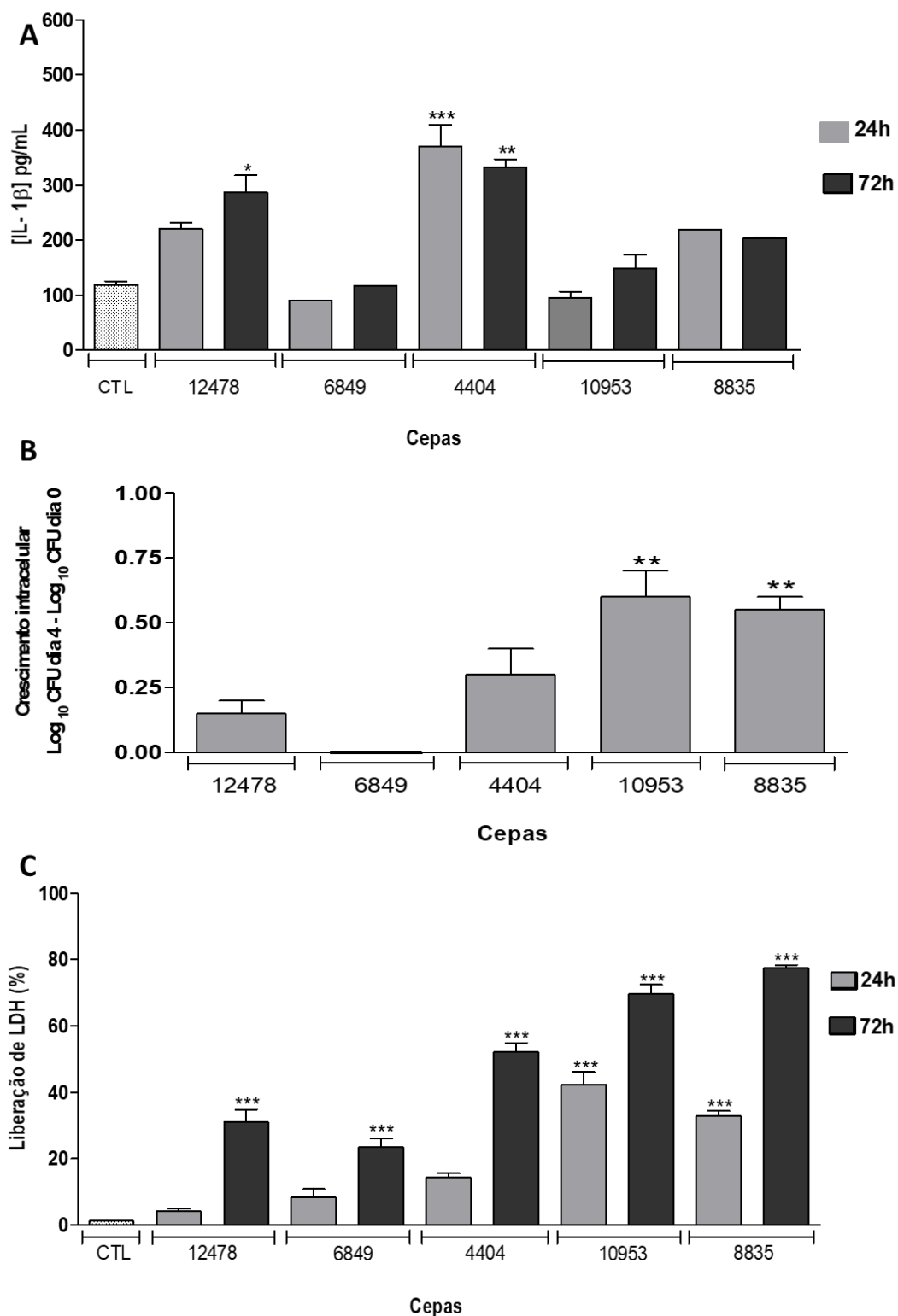


Figura 19 – Avaliação da produção de IL-1β em macrófagos infectados pelas cepas de *M. kansasii*. (A) Os macrófagos J774A.1 foram infectados com MOI 10:1 e os sobrenadantes de cultura foram coletados em 24 h e 72 h p.i. para avaliação da produção de IL-1β. (B) Os macrófagos RAW 264.7 foram infectados na proporção 1:1 para avaliação do crescimento intracelular durante 4 dias através da contagem de CFU e (C) na proporção MOI 10:1 para avaliar a morte celular necrótica por meio de quantificação da liberação da enzima LDH no sobrenadante de cultura. Os valores estão apresentados como média ± desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa de referência 12478, e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

A IL-1 β é uma citocina produzida principalmente através da ativação do inflamassoma, que culmina na ativação da caspase-1 que, por sua vez, atua na clivagem da pró- IL-1 β formando a citocina IL-1 β madura. Assim, verificamos a modulação da ativação da caspase-1 no interior dos macrófagos infectados pelas cepas de Mkan. Os macrófagos infectados foram lisados e estes então submetidos a eletroforese e *Western blotting* (**Figura 20**). O anticorpo anti-caspase 1 utilizado marcou a banda de 45 kDa correspondentes a pró-caspase 1, as quais foram observadas para todas as amostras. As bandas de menor peso molecular, correspondentes aos fragmentos da caspase 1 ativada (p20 e p10), foram observadas somente para a cultura de macrófagos infectada pelas cepas 12478, 6849 e 4404, e com menor intensidade de marcação. Os quadrados vermelhos marcam posição dessas bandas. Não foi observada a presença de bandas da proteína caspase-1 clivada nas amostras das cepas 8835, 10953 e na amostra de controle não infectado (CTL).

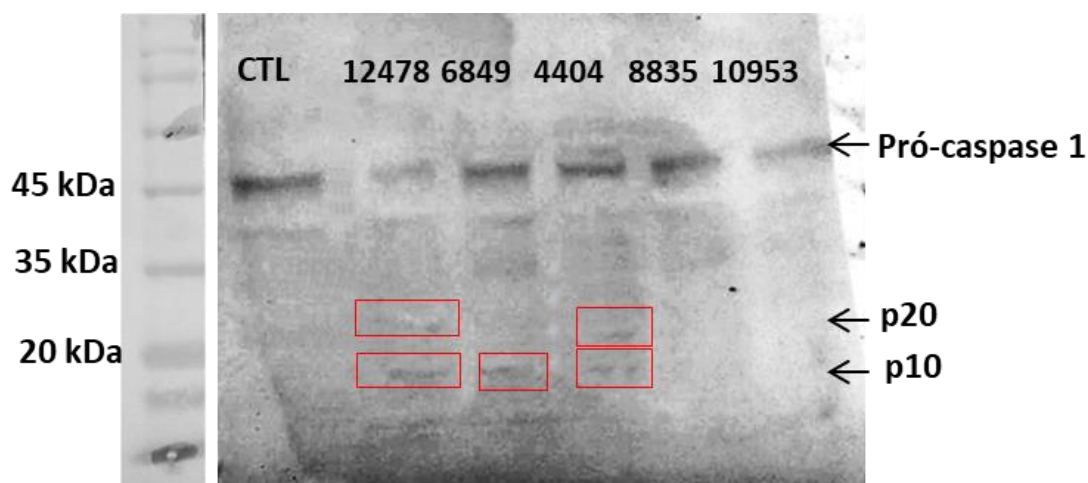


Figura 20 – Expressão de caspase-1 nos macrófagos J774A.1 infectados pelas cepas de *M. kansasii*. Os macrófagos J774.A1 foram infectados com as cepas de Mkan na proporção de 10:1. Após 72 h de infecção, as células foram lisadas e o lisado celular submetido à eletroforese e *Western Blotting*. As membranas foram tratadas com o anticorpo anti-caspase 1 p20. Os fragmentos da clivagem correspondentes à forma ativa da caspase-1 (p20 e p10) estão marcados pelos quadrados vermelhos. O controle corresponde a cultura de macrófagos não infectada.

É conhecido que a ativação do inflamassoma NRLP3 em macrófagos infectados por micobactérias é induzida pelo menos em parte pela proteína ESAT-6 secretada pela micobactéria. Deste modo, comparamos a capacidade das cepas de Mkan em estudo de secretar ESAT-6 no sobrenadante da cultura

bacteriana cultivada em meio líquido (**Figura 21**). O sobrenadante da cultura de cada cepa de Mkan e da cepa Mtb M299, utilizada como controle positivo, foram coletados e submetidos a eletroforese e *Western blotting*. As membranas foram tratadas com anticorpo anti-ESAT6. Os resultados apresentados na **Figura 21** mostraram que a cepa Mtb produziu significativamente mais ESAT-6 que cepas de Mkan. Além disso, entre as cepas de Mkan foi observado que a cepa 6849, com morfologia lisa e considerada de baixa virulência foi a que mais induziu a produção de ESAT-6, juntamente com o controle positivo (Mtb M299). Enquanto as cepas que mostraram ser mais virulentas (8835, 10953) não induziram grandes quantidades de ESAT-6.

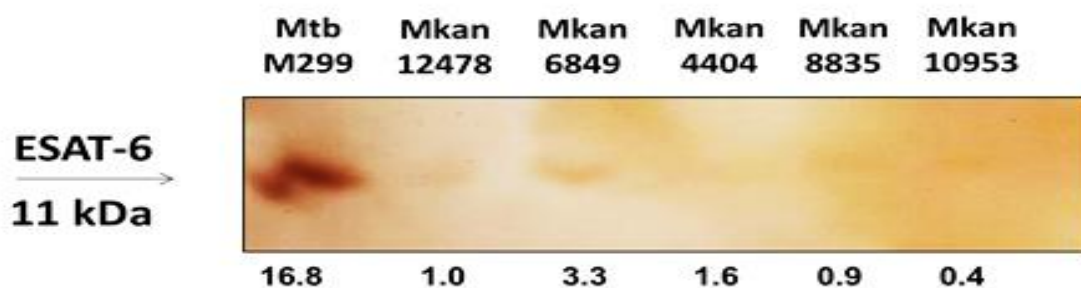


Figura 21 – Capacidade das cepas de *M. kansasii* secretar ESAT-6 durante cultivo bacteriano em meio líquido. As cepas de Mkan e Mtb (M299) foram cultivadas em meio Sauton por 5 dias. O sobrenadante da cultura devidamente filtrado foi submetido a eletroforese e *Western blotting* para a detecção da proteína ESAT-6 secretada pela micobactéria. As bandas da proteína nas amostras de Mkan foram comparadas com a banda de cepa Mtb M99 através da análise densitométrica e os resultados foram dispostos na parte inferior da imagem.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, verificamos a hipótese de que a infecção de camundongos da linhagem C57BL/6, considerada resistente a micobactérias, com dose bacilar elevada dos isolados clínicos de Mkan altamente virulentos, por inoculação intratraqueal, pode resultar em doença pulmonar mais grave do que a normalmente observada em modelos murinos de infecção por Mkan, infectados com a cepa de referência (cepa 12478 ATCC). Para selecionar as cepas com alto grau de virulência, avaliamos em nossa coleção de isolados clínicos de Mkan, as cepas disponíveis quanto as características associadas à virulência no modelo de infecção de macrófagos.

Com base nos resultados obtidos *in vitro*, cinco cepas, exibindo grau distinto de virulência *in vitro*, incluindo cepas de maior e menor virulência em comparação com a cepa de referência 12478, foram utilizados para infecção dos camundongos C57BL/6. Os resultados mostraram que cepas virulentas de Mkan, incluindo a cepa ATCC 12478, foram capazes de causar infecção produtiva e cronicamente progressiva em camundongos, reproduzindo sinais de patologia pulmonar necrótica observados em pacientes humanos imunocompetentes, como granulomas caseosos encapsulados, oclusão de vias aéreas brônquicas com massas necróticas e fibrose intersticial.

Importante ressaltar que os granulomas necróticos encapsulados observados nos pulmões de camundongos infectados por Mkan neste modelo não foram detectados em nenhum outro modelo de infecção por Mkan ou no modelo C57BL/6 de infecção com Mtb. Granulomas pulmonares sólidos, e não necróticos, são uma manifestação patológica típica da TB experimental em camundongos C57BL/6 causada pela infecção por aerossol de baixa dose de Mtb. Micobactérias não-tuberculosas em geral, e *M. kansasii* especificamente, são menos virulentas que Mtb, e na maioria das vezes são eliminadas dos pulmões dos camundongos (*wild type*) não modificados para induzir imunodeficiência. A utilização de doses bacilares elevadas de Mkan (10^7 - 10^8 bacilos) para infecção intranasal foi necessária para induzir pequenos granulomas sólidos em camundongos desta linhagem (WIELAND *et al.*, 2006b). Nesses modelos prévios não foram observados patologia pulmonar

necrótica, granulomas necróticos ou formação de cavidades, que são típicas na doença pulmonar causada por Mkan em humanos.

Vários fatores podem contribuir para o agravamento da doença induzida no nosso modelo apesar da utilização de uma dose menor de Mkan (5×10^4 bacilos).

Em nosso modelo, a infecção foi realizada através de inoculação intratraqueal da suspensão micobacteriana. Possivelmente, o uso das vias intratraqueal ou intranasal para acessar a via respiratória em pequenos roedores aumenta a gravidade da doença induzida, uma vez que essas técnicas, ao contrário da inalação de aerossol, não excluem a administração de pequenos aglomerados de bactérias que podem aumentar a aptidão das bactérias inoculadas, apesar de apresentar o mesmo número de unidades formadoras de colônias na dose inoculada e na dose inalada. Nos trabalhos anteriores do nosso grupo, o uso de isolados clínicos altamente virulentos por via intratraqueal para administração de micobactérias em baixa dose de infecção possibilitou o aumento da gravidade de TB em camundongos C57BL/6, com extensa pneumonia necrosante (RIBEIRO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017; BOMFIM *et al.*, 2021), não observada nos modelos de infecção por aerossol, utilizando a mesma linhagem de camundongos.

A virulência das cepas de Mkan foi outro fator determinante em relação a gravidade da doença em nosso modelo, uma vez que a cepa 6849, de baixa virulência, não conseguiu causar infecção persistente e foi eliminada após 40 dias. Assim, duas cepas com maior virulência (8835 e 10953) induziram progressão mais rápida da doença, levando à morte prematura em uma proporção dos animais infectados. A taxa de letalidade foi um critério para discriminação de cepas de Mkan altamente virulentas e aquelas com um nível intermediário de virulência (**Tabela 2**).

No geral, observamos uma boa correlação entre a virulência de Mkan determinada com modelos *in vitro* e *in vivo*. Anteriormente, a avaliação *in vitro* da capacidade de sobrevivência e citotoxicidade de micobactérias em cultura de macrófagos foi mostrada como um bom preditor de virulência de isolados de Mtb (PARK *et al.*, 2006; LASUNSKAIA *et al.*, 2010). Nos experimentos com Mkan foi demonstrado que cepas que exibiram maior capacidade de crescimento intracelular nos macrófagos RAW 264.7 e elevada indução de morte celular

necrótica destas células *in vitro*, no modelo de infecção *in vivo* utilizando camundongos C57Bl/6 apresentaram progressão mais rápida no desenvolvimento de lesões necróticas e destruição do tecido pulmonar, incluindo para uma das cepas de alta virulência avaliada (8835), a morte prematura dos animais.

A semelhança no comportamento de Mtb e Mkan na infecção dos macrófagos *in vitro* pode estar relacionada aos importantes fatores de virulência compartilhadas por ambas as espécies. No estágio inicial da infecção, tanto Mtb quanto Mkan utilizam um sistema de secreção tipo VII, codificado pelos genes ESX-1, para secretar fatores de virulência essenciais, como ESAT-6 e CFP-10. Essas proteínas estão envolvidas no escape fagossômico de micobactérias e na regulação da viabilidade e ativação de macrófagos (HOUBEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2015; JANKUTE *et al.*, 2017; JAGIELSKI *et al.*, 2020), contribuindo para a patogenicidade bacteriana.

No entanto, *in vivo*, Mtb geralmente apresenta maior virulência e melhor adaptação ao hospedeiro humano do que Mkan. Portanto, doses maiores de Mkan, em comparação com Mtb, são necessárias para indução de uma infecção persistente em camundongos e provavelmente também em humanos. A dose exata de Mkan que pode causar infecção pulmonar nos humanos é desconhecida, mas esta deve ser muito maior que a dose infecciosa de Mtb (entre 1 e 200 bacilos). No entanto, devido à capacidade de Mkan crescer em baixos níveis de nutrientes e formar biofilmes que promovem sua sobrevivência e disseminação em sistemas de distribuição de água potável, (FALKINHAM, 1996), as situações em que os indivíduos entram em contato com uma dose alta dessas bactérias em aerossol pode ser mais comum do que o imaginado. A exposição a uma alta dose de infecção com cepa de Mkan altamente virulenta pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento da doença nos indivíduos suscetíveis infectados.

Observamos que todos os isolados de Mkan altamente virulentos exibiram a morfologia rugosa das colônias (R), enquanto a cepa 6849 menos virulenta exibiu colônias lisas do tipo S. Embora um pequeno número de cepas de Mkan tenha sido estudado neste trabalho, incluindo apenas um isolado do tipo S, nossos resultados complementam observações anteriores estabelecendo maior importância clínica de cepas de MNT do tipo R, que estão mais

frequentemente envolvidas em infecções graves e persistentes em comparação as do tipo S.

Foi demonstrado que, em contraste com o tipo liso, o tipo R de Mkan exibiu alterações nos lipídios da membrana externa, reduzindo a expressão de lipooligossacarídeos hidrofílicos polares (LOS), aumentando assim a proporção de glicolipídeos menos polares, como PDIMs, LAM, TDM e outros, que de outra forma eram “mascarados” ou revestidos por LOS (NOBRE *et al.*, 2014), levando a um aumento da hidrofobicidade geral, virulência e probabilidade de transmissão bacteriana em aerossol (BELISLE e BRENNAN, 1989; JANKUTE *et al.*, 2017).

Outro fator que pode contribuir para o aumento da virulência micobacteriana é a capacidade da bactéria alterar a resposta imune, seja ela inata e/ou adaptativa. No início da infecção, macrófagos alveolares, que fagocitam micobactérias, são as primeiras células que podem eliminar o micro-organismo se ativadas adequadamente para produção dos fatores bactericidas e citocinas inflamatórias. A Interleucina-1 β , uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos infectados, depende do processamento da pró-citocina pelas caspases IL-1 ou IL-11, cuja ativação nos macrófagos depende da ativação do inflamassoma NLRP3/ASC pelas micobactérias, tanto Mtb (MISHRA *et al.*, 2010) quanto Mkan (CHEN *et al.*, 2012). Por meio do ensaio de ELISA para quantificar a produção de citocinas, demonstramos que em macrófagos infectados *in vitro* pelas cepas relativamente menos virulentas (cepas 12478 e 4404) ocorreu secreção significativamente maior de IL-1 β em comparação com macrófagos infectados com cepas mais virulentas (cepas 8835 e 10953).

A menor produção de IL-1 β foi associada com menor nível de ativação da caspase-1 nos macrófagos infectados pelas cepas 8835 e 10953, como demonstrado por *Western blotting*. A partir destes dados, observamos que a clivagem da pró-caspase-1 nas subunidades diméricas p20 e p10, um pré-requisito para a formação da forma ativa da caspase-1, foi observado somente para as amostras de células infectadas pelas cepas 12478, 4404 e 6849.

A ativação da caspase-1 e a secreção da IL-1 β nos macrófagos infectados por Mtb foram relacionadas à produção da proteína ESAT-6 pela micobactéria, como importante indutor de inflamassoma NLRP3 (MISHRA *et al.*, 2010). Para verificar se as diferenças na ativação da caspase-1 observada em nossos

experimentos poderiam ser relacionadas a diferença na produção de ESAT-6 pelas diferentes cepas de Mkan, quantificamos o nível de secreção dessa proteína no sobrenadante das culturas bacterianas de cada cepa em estudo por Western blotting. Os resultados demonstraram que as cepas mais virulentas (cepas 8835 e 10953) secretaram menos ESAT-6 que as demais cepas. Estes dados sugerem que uma maior resistência das cepas mais virulentas de Mkan em macrófagos pode ser relacionada à baixa capacidade dessas bactérias, que secretam menos ESAT-6, de ativar o complexo inflamassoma e assim induzir a produção de IL-1 β , uma citocina que de maneira autócrina contribui para a ativação bactericida e pró-inflamatória dessas células. Esta hipótese ainda necessita ser verificada em experimentos futuros.

A natureza de menor virulência da cepa 6849 também deve ser investigada mais profundamente. A cepa 6849 foi a menos virulenta, e embora produza altas concentrações de ESAT-6 e ative o inflamassoma, induziu baixa produção de IL-1 β nos experimentos *in vitro* e *in vivo*, o que provavelmente decorre da baixa capacidade de crescer em macrófagos associada com o morfotipo S dessa bactéria.

Realizamos análise dos dados genéticos obtidos no sequenciamento completo do genoma das cepas de Mkan em estudo pelos nossos colaboradores da Fiocruz (MUSSI *et al.*, 2021). Os dados apresentados nas Figuras suplementares dessa publicação descreveram a presença de pelo menos duas mutações missense em dois genes que codificam as enzimas de biossíntese LOS em cepas com o morfotipo R: no gene MKAN_27485, que codifica a policetídeo sintase *pks5* (cepas 1580, 3657, 4404, 8835, 8837 e 8839) e no gene MKAN_27535, codificante da aciltransferase *papA4* (cepas 1580, 3657, 8837 e 8839). Trabalhos anteriores mostraram que ambos os genes estão envolvidos no biossíntese de LOS, cuja alteração pode levar a transformação da morfologia da colônia do tipo S para R em uma variedade de MNT (VAN DER WOUDE *et al.*, 2012), incluindo Mkan (LUO *et al.*, 2020). Entretanto, ainda deve ser determinado se as alterações genéticas observadas podem resultar em perda de função. Além disso, uma vez que a expressão de LOS na superfície bacteriana pode ser alterada por vários fatores que regulam a transativação dos genes LOS, síntese de lipídeos, grau de glicosilação e eventual transporte para a superfície celular (BURGUIÈRE *et al.*, 2005), é crucial estabelecer o conteúdo

lipídico da parede celular e composição de proteínas associadas à virulência secretadas durante a infecção por Mkan, o que planejamos fazer nos futuros experimentos.

Além disso, de acordo com observações anteriores (WANG *et al.*, 2015; TAGINI *et al.*, 2021), nossa análise mostrou a presença de todos os principais genes do sistema de secreção ESX-1 na região RD1, responsáveis pela secreção de ESAT-6 e CFP-10 nos genomas de Mkan. Apesar de estes genes estarem conservados em todos os genomas de Mkan estudados, em alguns dos isolados clínicos foi observada uma heterogeneidade no número de cópias e numerosos SNPs nestes genes. Assim, foram observados SNPs idênticos no gene MKAN_07615, que codifica a proteína EspG associada à secreção de ESX, em vários isolados, incluindo a cepa 8835 (MACHADO *et al.*, 2018). As alterações nestes genes pode interferir no fenótipo de secreção de ESAT-6, observado nos nossos experimentos em cepas mais virulentas, onde os genes Rv0503c e Rv3223c, que codificam os fatores de virulência *cmaA2* e *sigH*, respectivamente, têm um impacto conhecido na virulência de Mtb, o que nos permitiu hipotetizar que mutações observadas nos respectivos ortólogos MKAN_18440 (*cmaA2*) e MKAN_21605 (*sigH*) possam ter impacto no perfil de virulência da cepa 10953, uma vez que apenas este isolado carrega mutações não sinônimas nestes loci.

Embora estes genes estejam conservados em todos os genomas de Mkan estudados, foi observada uma heterogeneidade no número de cópias e numerosos SNPs nestes genes. No entanto, foi observado SNPs idênticos no gene MKAN_07615, que codifica a proteína EspG associada à secreção de ESX, em vários isolados geograficamente distantes, como para as cepas isoladas de pacientes do Estado de Pernambuco (cepas 8835, 8837 e 8839) e do Rio de Janeiro (cepas 1580, 3657 e 4404) (MACHADO *et al.*, 2018). Além da possível influência da presença ou ausência, o número de cópias de genes específicos, a presença de SNPs também pode interferir no fenótipo de virulência. No entanto, experimentos de transfecção são necessários para fornecer evidências experimentais para a real contribuição dos elementos genéticos propostos para a virulência de Mkan.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados clínicos de Mkan obtidos de pacientes com doença pulmonar no Brasil apresentaram grande variedade na sua virulência.
- Pelo menos dois isolados clínicos (cepas 8835 e 10953) apresentaram maior grau de virulência em experimentos *in vitro* e *in vivo* em comparação com a cepa de referência ATCC 12478.
- Propomos a infecção intratraqueal de camundongos C57BL/6 como um novo modelo confiável de reprodução de patologia pulmonar necrótica semelhante à humana, adequado para investigar a virulência e patogenicidade de Mkan.
- As cepas Mkan com o morfotipo R de colônias foram mais virulentas que a cepa com morfotipo de colônias lisas S.
- A maior virulência de algumas cepas Mkan pode estar associada às alterações em genes e seus produtos funcionais, responsáveis pela composição da parede celular e expressão de importantes fatores de virulência, que aumentam a capacidade da micobactéria de crescer em macrófagos e induzir a morte dessas células.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKRAM, Sami M.; RAWLA, Prashanth. *Mycobacterium kansasii*. **StatPearls [Internet]**, 2021.
- AL SHAMMARI, Basim *et al.* The extracellular matrix regulates granuloma necrosis in tuberculosis. **The Journal of infectious diseases**, v. 212, n. 3, p. 463-473, 2015.
- ALMEIDA, Fabrício M. *et al.* Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. **PLoS one**, v. 12, n. 3, p. e0173715, 2017.
- AMARAL, Eduardo P. *et al.* Pulmonary infection with hypervirulent Mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 7, p. e1004188, 2014.
- BOMFIM, Caio César *et al.* Harmful Effects of Granulocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells on Tuberculosis Caused by Hypervirulent Mycobacteria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 223, n. 3, p. 494-507, 2021.
- BELISLE, JOHN T.; BRENNAN, PATRICK J. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 6, p. 3465-3470, 1989.
- BLANC, Landry *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* inhibits human innate immune responses via the production of TLR2 antagonist glycolipids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 42, p. 11205-11210, 2017.
- BOTTAI, Daria *et al.* Mycobacterial pathogenomics and evolution. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 1, p. 2.1. 19, 2014.
- BOZZANO, Federica; MARRAS, Francesco; DE MARIA, Andrea. Immunology of tuberculosis. **Mediterranean journal of hematology and infectious diseases**, v. 6, n. 1, 2014.
- BURGUIERE, Adeline *et al.* LosA, a key glycosyltransferase involved in the biosynthesis of a novel family of glycosylated acyltrehalose lipooligosaccharides from *Mycobacterium marinum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 51, p. 42124-42133, 2005.
- BUHLER, Victor B; POLLACK, A. Human Infection with Atypical Acid-Fast Organisms. Report of Two Cases with Pathologic Findings. **American journal of clinical pathology**, v. 23, n. 4, p. 363-74, 1953.

- BUTLER, Rachel E. *et al.* The balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. **PLoS one**, v. 7, n. 10, p. e47573, 2012.
- CARNEIRO, Maiara dos Santos *et al.* Doença pulmonar por micobactérias não tuberculosas em uma região de alta incidência de tuberculose no Brasil. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 44, p. 106-111, 2018.
- CASSIDY, P. Maureen *et al.* Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 12, p. e124-e129, 2009.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Nontuberculous mycobacteria reported to the Public Health Laboratory Information System by state public health laboratories United States, 1993–1996. 2013. http://www.cdc.gov/tb/Laboratory_Services/NontuberculousMycobacteria.pdf. (Acessado dia 25 de Janeiro de 2022).
- CHADHA, Attinder *et al.* Suppressive role of neddylation in dendritic cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis**, v. 95, n. 5, p. 599-607, 2015.
- CHAN, John *et al.* The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: **Seminars in immunology**. Academic Press, 2014. p. 588-600.
- CHEN, Chang-Chieh *et al.* Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e36292, 2012.
- COWMAN, Steven; WILSON, Robert; LOEBINGER, Michael R. Opportunistic mycobacterial diseases. **Medicine**, v. 40, n. 6, p. 346-348, 2012.
- DA COSTA, Ana Roberta Fusco *et al.* Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 68, n. 4, p. 390-394, 2010.
- DE MELLO, Karla Gripp Couto *et al.* Clinical and therapeutic features of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Rio de Janeiro, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 393, 2013.
- DELOGU, Giovanni *et al.* PE and PPE genes: a tale of conservation and diversity. **Strain Variation in the *Mycobacterium tuberculosis* Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control**, p. 191-207, 2017.
- EHLERS, Stefan; SCHAIBLE, Ulrich E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. **Frontiers in immunology**, v. 3, p. 411, 2013.
- ESSER, Mark T. *et al.* Memory T cells and vaccines. **Vaccine**, v. 21, n. 5-6, p. 419-430, 2003.

- FALKINHAM 3RD, J. O. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. **Clinical microbiology reviews**, v. 9, n. 2, p. 177-215, 1996.
- FEDRIZZI, Tarcisio *et al.* Genomic characterization of nontuberculous mycobacteria. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
- FLYNN, JoAnne L. Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 4, p. 1179-1188, 2006.
- GANGULY, Niladri *et al.* Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. **Tuberculosis**, v. 88, n. 6, p. 510-517, 2008.
- GOPALASWAMY, Radha *et al.* Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections—a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 1-17, 2020.
- GRIFFITH, David E. *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 175, n. 4, p. 367-416, 2007.
- GROENEWALD, Wilma *et al.* Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry and physics of lipids**, v. 180, p. 15-22, 2014.
- GUTIERREZ, C.; Somoskovi, A. Human Pathogenic Mycobacteria. In Reference Module in Biomedical Sciences; **Elsevier**: Amsterdam, The Netherlands, 2014.
- HASAN, Zahra *et al.* *M. leprae* inhibits apoptosis in THP-1 cells by downregulation of Bad and Bak and upregulation of Mcl-1 gene expression. **BMC microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-9, 2006.
- Houben, Diane *et al.* ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. **Cellular microbiology**, v. 14, n. 8, p. 1287-1298, 2012.
- JAGIELSKI, Tomasz *et al.* Genomic insights into the *Mycobacterium kansasii* complex: an update. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2918, 2020.
- JANKUTE, Monika *et al.* The role of hydrophobicity in tuberculosis evolution and pathogenicity. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.
- JOHNSON, Margaret M.; ODELL, John A. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. **Journal of thoracic disease**, v. 6, n. 3, p. 210, 2014.

- JOHNSTON, James C.; CHIANG, Leslie; ELWOOD, Kevin. *Mycobacterium kansasii*. **Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections**, p. 725-734, 2017.
- KATO-MAEDA, Midori *et al.* Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. **The International journal of tuberculosis and lung disease**, v. 15, n. 1, p. 131-133, 2011.
- KEANE, Joseph; REMOLD, Heinz G.; KORNFELD, Hardy. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 4, p. 2016-2020, 2000.
- KHALEDI, Azad *et al.* Prevalence of nontuberculous mycobacteria isolated from environmental samples in Iran: A meta-analysis. **Journal of research in medical sciences: the official journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 21, 2016.
- KOH, Won-Jung. Nontuberculous mycobacteria—overview. **Microbiology spectrum**, v. 5, n. 1, p. 5.1. 11, 2017.
- KOIRALA, J. *Mycobacterium kansasii*. 2020. Disponível em: <<http://emedicine.medscape.com/article/223230-overview>>. Acessado em 21 de janeiro de 2022.
- KOLLOLI, Afsal; SUBBIAN, Selvakumar. Host-directed therapeutic strategies for tuberculosis. **Frontiers in medicine**, v. 4, p. 171, 2017.
- KUMAR, Ajit; SHIVANGI, Preeti Agarwal; MEENA, Laxman S. Interconnection of *Mycobacterium tuberculosis* with host immune system. **J Respir Dis**, v. 2, p. 1-6, 2020.
- LASUNSKAIA, Elena *et al.* Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. **Microbes and infection**, v. 12, n. 6, p. 467-475, 2010
- LAZZARINI, Luiz Claudio Oliveira *et al.* Discovery of a novel *Mycobacterium tuberculosis* lineage that is a major cause of tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical microbiology**, v. 45, n. 12, p. 3891-3902, 2007.
- LEAO, Sylvia Cardoso *et al.* Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Vanden Broele, Brugges, Belgium, 2004.
- LEITE, Clarice QF *et al.* Incidence of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria on pulmonary infections in Araraquara-SP, 1993. **Rev. microbiol**, p. 101-5, 1995.

- LERNER, Thomas R.; BOREL, Sophie; GUTIERREZ, Maximiliano G. The innate immune response in human tuberculosis. **Cellular microbiology**, v. 17, n. 9, p. 1277-1285, 2015.
- LI, Yong; WANG, Yujiong; LIU, Xiaoming. The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, 2012.
- LIM, Yun-Ji et al. *Mycobacterium kansasii*-induced death of murine macrophages involves endoplasmic reticulum stress responses mediated by reactive oxygen species generation or calpain activation. **Apoptosis**, v. 18, n. 2, p. 150-159, 2013.
- LUO, Tao et al. Population genomics provides insights in diversity, epidemiology, evolution and pathogenicity of the waterborne pathogen *Mycobacterium kansasii*. **Nat. Commun.** 12:2491, 2020.
- LY, Angel; LIU, Jun. Mycobacterial virulence factors: Surface-exposed lipids and secreted proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 3985, 2020.
- MA, Jialu et al. The roles of inflammasomes in host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Pathogens**, v. 10, n. 2, p. 120, 2021.
- MACHADO, Edson et al. Whole genome sequence of *Mycobacterium kansasii* isolates of the genotype 1 from Brazilian patients with pulmonary disease demonstrates considerable heterogeneity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, 2018.
- MARTINS, Andrea Barral; MATOS, Eliana Dias; LEMOS, Antonio Carlos M. Infection with the *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions: a case report and literature review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, p. 173-179, 2005.
- MATSUMOTO, Yuki et al. Comprehensive subspecies identification of 175 nontuberculous mycobacteria species based on 7547 genomic profiles. **Emerging microbes & infections**, v. 8, n. 1, p. 1043-1053, 2019.
- MATVEYCHUK, Alona et al. Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* and other NTM infections. **Respiratory medicine**, v. 106, n. 10, p. 1472-1477, 2012.
- MEEHAN, Conor J. et al. Whole genome sequencing of *Mycobacterium tuberculosis*: current standards and open issues. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 9, p. 533-545, 2019.
- MISHRA, Bibhuti B. et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular microbiology**, v. 12, n. 8, p. 1046-1063, 2010.

- MOKROUSOV, Igor. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 26, n. 2, p. 342-360, 2013.
- MORIMOTO, Kozo *et al.* A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2014.
- MURPHY, Michael E. *et al.* Spot sputum samples are at least as good as early morning samples for identifying *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC medicine**, v. 15, n. 1, p. 1-10, 2017.
- MUSSI, Vinicius O. Caracterização da virulência das cepas de *Mycobacterium kansasii* isoladas de pacientes com doença pulmonar não tuberculosa. Dissertação. UENF, 2017.
- NALBANDIAN, Ani *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. **Nature medicine**, v. 27, n. 4, p. 601-615, 2021.
- NATARAJ, Vijayashankar *et al.* MKAN27435 is required for the biosynthesis of higher subclasses of lipooligosaccharides in *Mycobacterium kansasii*. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122804, 2015.
- NOBRE, Ana *et al.* The molecular biology of mycobacterial trehalose in the quest for advanced tuberculosis therapies. **Microbiology**, v. 160, n. 8, p. 1547-1570, 2014.
- ONWUEME, Kenolisa C. *et al.* The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria. **Progress in lipid research**, v. 44, n. 5, p. 259-302, 2005.
- ORME, Ian M.; ROBINSON, Richard T.; COOPER, Andrea M. The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. **Nature immunology**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2015.
- PARK, Jae Seuk *et al.* Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 79, n. 1, p. 80-86, 2006.
- PORVAZNIK, I.; SOLOVIČ, I.; MOKRÝ, J. Non-tuberculous mycobacteria: classification, diagnostics, and therapy. **Respiratory treatment and prevention**, p. 19-25, 2016.
- POULIN, R.; COMBES, C. The concept of virulence: interpretations and implications. **Parasitology today (Personal ed.)**, v. 15, n. 12, p. 474-475, 1999.
- PREVOTS, D. Rebecca *et al.* Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. **American**

journal of respiratory and critical care medicine, v. 182, n. 7, p. 970-976, 2010.

- RAMAZANZADEH, Rashid; SAYHEMIRI, Kourosh. Prevalence of Beijing family in *Mycobacterium tuberculosis* in world population: systematic review and meta-analysis. **International journal of mycobacteriology**, v. 3, n. 1, p. 41-45, 2014.
- RAO, Martin *et al.* B in TB: B cells as mediators of clinically relevant immune responses in tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. suppl_3, p. S225-S234, 2015.
- REED, Jennifer M *et al.* Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 28, n. 10, p. 611-622, 2008.
- REED, Michael B. *et al.* A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. **Nature**, v. 431, n. 7004, p. 84-87, 2004.
- RIBEIRO, Simone CM *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2615-2624, 2014.
- ROMBOUTS, Yoann *et al.* *Mycobacterium marinum* lipooligosaccharides are unique caryophyllose-containing cell wall glycolipids that inhibit tumor necrosis factor- α secretion in macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 31, p. 20975-20988, 2009.
- ROMAGNOLI, Alessandra *et al.* ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. **Autophagy**, v. 8, n. 9, p. 1357-1370, 2012.
- RYU, Yon Ju; KOH, Won-Jung; DALEY, Charles L. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: clinicians' perspectives. **Tuberculosis and respiratory diseases**, v. 79, n. 2, p. 74-84, 2016.
- SADAPHAL, P. *et al.* Image processing techniques for identifying *Mycobacterium tuberculosis* in Ziehl-Neelsen stains. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v. 12, n. 5, p. 579-582, 2008.
- SEISCENTO, Márcia *et al.* Derrame pleural por micobactéria não tuberculosa. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, p. 459-463, 2005.
- SHAO, Yan *et al.* The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003623, 2015.

- SHARMA, Surendra K.; UPADHYAY, Vishwanath. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 152, n. 3, p. 185, 2020.
- SMITH, Issar. Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clinical microbiology reviews**, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.
- SOHN, Hosung *et al.* Induction of macrophage death by clinical strains of Mycobacterium kansasii. **Microbial pathogenesis**, v. 48, n. 5, p. 160-167, 2010.
- SOUSA, Sara *et al.* Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. **International journal of mycobacteriology**, v. 4, n. 1, p. 36-43, 2015.
- TAGINI, Florian *et al.* Pathogenic determinants of the *Mycobacterium kansasii* complex: an unsuspected role for distributive conjugal transfer. **Microorganisms**, v. 9, n. 2, p. 348, 2021.
- TAN, Belinda H. *et al.* Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 3, p. 1864-1871, 2006.
- TRAN, Tru *et al.* A paucity of knowledge regarding nontuberculous mycobacterial lipids compared to the tubercle bacillus. **Tuberculosis**, v. 115, p. 96-107, 2019.
- UEKI, Suely Yoko Mizuka *et al.* Micobactérias não-tuberculosas: diversidade das espécies no estado de São Paulo. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 41, p. 1-8, 2005.
- VAN DER WOUDE, Aniek D. *et al.* Unexpected link between lipooligosaccharide biosynthesis and surface protein release in *Mycobacterium marinum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 24, p. 20417-20429, 2012.
- VANKAYALAPATI, Ramakrishna; BARNES, Peter F. Innate and adaptive immune responses to human *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis**, v. 89, p. S77-S80, 2009.
- WANG, Joyce *et al.* Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. **Genome biology and evolution**, v. 7, n. 3, p. 856-870, 2015.
- WHO - World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2021. Geneva.

- WIELAND, Catharina W. *et al* (a). Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. **Microbes and infection**, v. 8, n. 9-10, p. 2409-2413, 2006.
- WIELAND, Catharina W. *et al* (b). CD4+ cells play a limited role in murine lung infection with *Mycobacterium kansasii*. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 34, n. 2, p. 167-173, 2006.
- WILDNER, Letícia Muraro *et al*. Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. **Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology**, v. 40, n. 3, p. 207-230, 2011.
- WINSLOW, Gary M. *et al*. Early T-cell responses in tuberculosis immunity. **Immunological reviews**, v. 225, n. 1, p. 284-299, 2008.
- ZHANG, Guo-Liang *et al*. Hepatoprotective role of Ganoderma lucidum polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. **World Journal of Gastroenterology**, v. 8, n. 4, p. 728, 2002.
- ZUMLA, Alimuddin *et al*. Host-directed therapies for tackling multi-drug resistant tuberculosis: learning from the Pasteur-Bechamp debates. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 9, p. 1432-1438, 2015.

9. ANEXOS


Anexo 1 Certificado de autorização para o uso experimental de animais durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 350, intitulado "Estudo de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e novas abordagens terapêuticas para o tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar no modelo murino" sob a responsabilidade da Dra. Eliana Lassounskaia, Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) bem como a lei federal 11.794 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA DE USO DE ANIMAIS (CEUA - UENF) em reunião ocorrida em 28/03/2017. Este programa está licenciado na presente formatação e tem validade até 28/03/2021.

Campos dos Goytacazes, 28 de março de 2017.


Clovis de Paula Santos
Presidente da Comissão de Ética de uso de Animais
Clovis de Paula Santos
Presidente CEUA/UENF



A Murine Model of *Mycobacterium kansasii* Infection Reproducing Necrotic Lung Pathology Reveals Considerable Heterogeneity in Virulence of Clinical Isolates

Vinicius O. Mussi¹, Thatiana L. B. V. Simão¹, Fabricio M. Almeida¹, Edson Machado², Luciana D. de Carvalho³, Sanderson D. Calixto¹, Guilherme A. M. Sales¹, Eulógio C. Q. Carvalho⁴, Sidra E. G. Vasconcelos², Marcos Catanho⁵, Philip N. Suffys^{2*} and Elena B. Lasunskaja^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Xiaohui Zhou,

¹Laboratory of Biology of Recognition, State University of North Fluminense, Campos, Brazil, ²Laboratory of Molecular Biology Applied to Mycobacteria, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ³National Reference Laboratory for Tuberculosis, Reference Center Professor Helió Fraga, National School of Public Health, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Laboratory of Animal Morphology and Pathology, State University of North Fluminense, Campos, Brazil, ⁵Laboratory of Molecular Genetics of Microorganisms, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil