

**Papel das Metaloproteinases de Matriz na patogenia da
tuberculose pulmonar: um potencial alvo para intervenção terapêutica**

Andreza Linhares Rezende

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Dezembro de 2019

Papel das Metaloproteinases de Matriz na patogenia da tuberculose pulmonar: um potencial alvo para intervenção terapêutica

Andreza Linhares Rezende

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

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes – RJ

Dezembro de 2019

Papel das Metaloproteinases de Matriz na patogenia da tuberculose pulmonar: um potencial alvo para intervenção terapêutica

Andreza Linhares Rezende

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 a orientação da Profa. Elena Lassounskaia.

Apoio financeiro:

- UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

"Mantenha-se bom, puro, sério, livre de afetação, amigo da justiça, gentil, apaixonado, vigoroso em todas as suas atitudes. Lute para viver como a filosofia gostaria que vivesse." — Marco Aurelio 121 - 180

AGRADECIMENTOS

- ❖ Primeiramente, a DEUS, pelo dom da vida e ter me guiado até este momento.

- ❖ Aos meus pais, José Esmael e Iza Maria pelos ensinamentos, apoio, incentivo e amor que me deram durante toda minha vida. Além dos meus irmãos Ismenia e Helder pelo carinho e admiração.

- ❖ À Prof^a. Dra. Elena Lassounskaia, pela orientação, no mestrado e no doutorado, por todo o ensinamento e cuidado.

- ❖ Aos amigos de grupos de pesquisa: Fabrício, Giliane, Sanderson, Thatiana e Vinícius, pela convivência e toda a ajuda que me deram no desenvolvimento deste trabalho.

- ❖ A técnica Verônica Rodrigues Lanes, por todo o cuidado, carinho e ajuda nos experimentos.

- ❖ Aos técnicos: Rita, Maria Núbia e Fernando que sempre estiveram dispostos a me ajudar.

- ❖ A técnica Juliana Azevedo, por toda a ajuda com as leituras e análises da citometria de fluxo.

- ❖ A equipe de técnicos do Laboratório de Morfologia e Patologia Animal pelo auxílio na preparação de amostras para histologia.

Índice

Lista de abreviaturas.....	ix
Índice de figuras.....	xii
Resumo.....	xiv
Abstract.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Classificação de Mtb.....	1
1.2- Epidemiologia.....	4
1.3- Características estruturais.....	5
1.4- Fatores de virulência.....	7
1.5- Desenvolvimento de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> resistente à medicamentos.....	9
1.6-Histórico da doença.....	11
1.7-Dados relevantes.....	12
1.8- Patologia da TB.....	13
1.8.1-Resposta imunológica inata.....	14
1.8.2-Resposta imunológica adaptativa.....	17
1.9 - Tuberculose extrapulmonar.....	19
1.10- Diagnóstico e tratamento.....	20
1.11- Mecanismos de evasão da resposta imunológica.....	23
1.12- Matriz Extracelular.....	25
1.13- Metaloproteinases de matriz.....	26
1.14- Inibidores e Indutores de MMPs.....	29
1.15- MMPS como alvo da Terapia Adjunta da TB.....	32
2- JUSTIFICATIVA.....	37
3- OBJETIVOS.....	38
3.1- Objetivo geral.....	38
3.2- Objetivos específicos.....	38
4- METODOLOGIA.....	39
4.1- Micobactérias.....	39
4.2- Animais.....	39
4.3- Anticorpos e reagentes	40
4.4-Infecção e tratamentos experimentais dos animais.....	40

4.5- Homogenização do tecido pulmonar e/ou extração de células pulmonares para cultivo <i>ex vivo</i>	41
4.6- Lavagem broncoalveolar.....	42
4.7- Quantificação da atividade de MMPs através de ensaios de zimografia.....	42
4.8-Quantificação de Mtb em teste de CFU.....	42
4.9- Testes histológicos.....	43
4.9.1-Análise histopatológica por coloração com Hematoxilina e Eosina.....	43
4.9.2- Análise histopatológica por coloração com Tricômico de Masson.....	43
4.9.3-Coloração pelo método de Ziehl Neelsen.....	44
4.10-Análise de morfometria das lesões pulmonares (áreas de pneumonia e necrose pulmonares).....	44
4.11- Análise imunoistoquímica de MMP-2, MMP-8, MMP-9, EMMPRIN do pulmão infectado.....	45
4.12- Isolamento de células do pulmão e citometria de fluxo.....	46
4.13- Western blotting.....	46
4.14- Medidas de biossegurança de nível III.....	47
4.15- Análises estatísticas.....	47
5- RESULTADOS.....	49
5.1- Mtb induz expressão e produção de MMPs em camundongos infectados.....	49
5.1.1- Avaliação da produção das gelatinases MMP-9 e MMP-2 e colagenase MMP-8 por células de pulmão dos camundongos infectados pelas cepas Mtb de alta e baixa virulência.....	49
5.1.2- Teste Imunoistoquímico para avaliar expressão e imunolocalização de MMPs (EMMPRIN, MMP-8 e MMP-9) no pulmão de camundongos com grau de patologia severa (pneumonia tuberculosa necrotizante) ou amena (granulomas sólidos).....	50
5.2. Avaliação dos efeitos terapêuticos de doxiciclina e 2'2-bipiridina (inibidores de MMPs) e da depleção de leucócitos mielóides pelo anticorpo anti-Gr-1 no	

modelo de infecção de camundongos pelas cepas Mtb de alta e baixa virulência.....	53
5.2.1- Esquema do tratamento dos animais infectados com os fármacos.....	53
5.2.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos na produção das gelatinases MMP-9 e MMP-2 e colagenase MMP-8 por células pulmonares de camundongos infectados.....	54
5.2.3. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos no crescimento de micobactéria nos camundongos infectados.....	55
5.2.4. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos na morbidade dos animais infectados.....	56
5.2.4.a- Quantificação do peso dos animais.....	57
5.2.4.b- Macropatologia do pulmão.....	58
5.2.4.c- Análise histopatológica.....	59
5.2.2.d- Morfometria da área de pneumonia e área de necrose pulmonar.....	61
5.2.2.e- Quantificação de leucócitos mielóides recrutados no pulmão.....	64
6- DISCUSSÃO.....	67
7- CONCLUSÕES.....	76
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

Lista de Abreviaturas

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ADAM – adamalisina

ADAMTS – adamalisina com motivos de trombospondina

a-Gr-1 – anticorpo monoclonal anti-Gr-1

ATPase – adenosina trifosfatase

BAAR – bacilos álcool-ácido resistentes

BCG – Bacillus Calmette-Guérin

BP – biperidina

CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia

CCR7 – receptor de quimiocina tipo 7

CD44 –conjunto de diferenciação 44

CFP-10 – proteína de filtrado da cultura de 10kDa

CMTB – complexo de *Mycobacterium tuberculosis*

COPD – doença pulmonar obstrutiva crônica

CTL – linfócitos T citotóxicos

DC – células dendríticas

DC-SIGN –molécula não integrina específica de células dendríticas que capta a molécula de adesão intercelular 3

DNA – ácido desoxirribonucleico

Dox – doxiciclina

EC2 – domínio extracelular 2

EGF – fator de crescimento epidermal

EMPRIMM - indutora de metaloproteinase de matriz extracelular

ESAT-6 – alvo antigênico secretório precoce de 6kDa

GTPase – guanosina trifosfatase

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

i/p – intraperitoneal

IL-12p40 – interleucina 12p40

IFN- γ – interferon-gamma

IgA – imunoglobulina A
IgSF – superfamília de imunoglobulinas
L – Linhagem
LFA-1 – antígeno 1 associado a função de linfócitos
LAM – lipoarabinomanana
LM – lipomanana
LXA4 – lipoxina A4
Man-LAM – lipoarabinomanana manosilada
MAC – complexo de *Mycobacterium avium*
MAIT – linfócitos T invariáveis associados a mucosa
MDR-TB – tuberculose multirresistente a medicamentos
MEC – matriz extracelular
MHC I – complexo principal de histocompatibilidade classe-I
MMP – metaloproteinase de matriz
Mo – monócitos
MNT – micobactéria não tuberculosa
MT-MMP – metaloproteinase de matriz ligada a membrana
Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
NADH – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NB – nível Biossegurança
NF-KB – fator de transcrição nuclear kappa B
NOD2 – proteína 2 do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos
OMS – Organização Mundial de Saúde
PAS – ácido para-acetil salicílico
PAMPs – padrões moleculares associados ao patógeno
PCR – reação em cadeia da polimerase
PDIM –fitiocerol dimicoceroserato
PMF – células polimorfonucleares
PGE2 – prostaglandina E2
PPD – derivado proteico purificado
PET-CT – tomografia computacional de emissão de pósitrons

PRR – receptores de reconhecimento padrão

PtpA – proteína tirosina fosfatase

RD – região de diferenciação

rRNA – ácido ribonucleico ribossômico

SFB – soro fetal bovino

TB – tuberculose

TBEP – tuberculose extrapulmonar

TCR – receptor de linfócito T

TDM – trealose dimicolato

TGF- β – fator de crescimento transformador

TIS – tipos internacionais de spoligotipos

Th17 – linfócitos T tipo helper 17

TLR – receptores do tipo Toll

T7SS – Sistema de secreção do tipo sete

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

TIMP – inibidor tissular de metaloproteinase de matriz

UFC – unidade formadora de colônia

V- variável

WT – *wild type*

XDR-TB – tuberculose extensivamente resistente a medicamentos

Zn²⁺ – íon zinco

Índice de figuras

Figura 1: As filogenias do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> e de BCG.....	2
Figura 2: Filogenia do complexo MTB baseada em estudos de genoma.....	4
Figura 3: Estrutura da parede celular de bactérias gram-positivas e de Mtb.....	6
Figura 4: Incidência anual de casos de TB.....	12
Figura 5: Resposta imunológica durante a infecção por Mtb.....	15
Figura 6: Diferença estrutural entre os subgrupos de MMP.....	28
Figura 7: TIMPs na regulação da função e da ativação de MMPs.....	30
Figura 8: Sinalização de EMMPRIN.....	32
Figura 9. Produção de gelatinases MMP-9 e MMP-2 e da collagenase MMP-8 pelas células do pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas Mtb H37Rv e M299.....	50
Figura 10. Análise histopatológica e imunoistoquímica dos pulmões de camundongos infectados por Mtb.....	52
Figura 11: Delineamento experimental do tratamento de camundongos C57BL/6 com doxiciclina, 2'2-bipiridina ou com o anticorpo monoclonal anti-Gr-1.....	53
Figura 12. Produção de MMPs pelas células do pulmão dos camundongos infectados pelas cepas Mtb M299 e H37Rv (RV) e tratados com fármacos no dia 28 pi.....	55
Figura 13. Carga bacteriana nos pulmões, baço e fígado de camundongos infectados com cepas Mtb e tratados com fármacos.....	56
Figura 14. Monitoramento do peso corporal dos animais.....	57
Figura 15. Análise de peso dos pulmões de animais infectados e tratados com fármacos.....	58
Figura 16. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 28 dias após a infecção e tratamento com doxiciclina, 2'2-bipiridina e anti-Gr-1.....	60
Figura 17. Morfometria da área intra-alveolar aerada.....	62
Figura 18. Delimitação de áreas de pneumonia e de necrose nos cortes histológicos.....	63

Figura 19. Morfometria das áreas de alveolite (A) e de necrose (B) nas lesões patológicas do pulmão.....	64
Figura 20. Número de células isoladas dos pulmões de camundongos infectados com cepas Mtb e tratados com fármacos aos 28 dias após a infecção.....	66

RESUMO

A patologia pulmonar necrótica nos pacientes com tuberculose (TB) está associada a degradação da matriz extracelular pulmonar promovida pelas enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs), que são produzidas pelas células do pulmão após a exposição ao *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Neste trabalho foi avaliada a capacidade das cepas de Mtb H37Rv e M299 em induzir a secreção de MMPs nos pulmões de camundongos infectados. Além disso, foi analisado o potencial terapêutico de fármacos anti-MMP doxiciclina (Dox) e 2'2'-bipiridina (BP) na patologia e na carga bacteriana, em comparação ao tratamento com o anticorpo monoclonal anti-Gr-1, utilizado para deplecionar neutrófilos e monócitos positivos para Gr-1. Foi demonstrado que a cepa Mtb hipervirulenta M299 induziu maior produção de MMP-2, -8 e -9, comparado com a cepa laboratorial H37Rv, o que foi associado com maior recrutamento de células mielóides inflamatórias produtoras de MMPs no pulmão e desenvolvimento da patologia mais grave. O tratamento dos camundongos com Dox e com BP reduziu a produção de MMPs no pulmão, o que sugere efeito direto destes fármacos na inibição de MMPs. O efeito da Dox na redução da patologia pulmonar foi maior comparado com efeito da BP, sendo que somente a Dox foi capaz de inibir o desenvolvimento do núcleo necrótico na lesão. Além disso, ambos os fármacos foram capazes de reduzir a carga bacteriana no pulmão, o que pode ser associado tanto ao direto efeito antibacteriano da Dox, quanto a capacidade destes fármacos de reduzir levemente o acúmulo no pulmão de fagócitos permissíveis ao crescimento de Mtb. O tratamento dos animais com anti-Gr-1 (controle positivo) levou a redução do acúmulo de células inflamatórias no pulmão e redução da produção de MMPs, além da diminuição da carga bacteriana. Em comparação com este tratamento, o efeito terapêutico da Dox pode ser considerado como moderado. Estes dados sugerem que a utilização da Dox, o único fármaco licenciado para uso como inibidor de MMPs, no tratamento de casos de TB pulmonar agressiva associada ao desenvolvimento rápido da patologia necrótica pode ser útil para prevenção da necrose, principalmente em casos da TB droga resistente.

Palavras-chave: tuberculose, metaloproteinase de matriz, doxiciclina, bipiridina

ABSTRACT

Necrotic pulmonary pathology in tuberculosis (TB) patients is associated with pulmonary extracellular matrix degradation promoted by matrix metalloproteinases (MMPs), which are produced by lung cells following exposure to *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). In this work we evaluated the ability of Mtb H37Rv and M299 strains to induce MMPs secretion in the lungs of infected mice. In addition, the therapeutic potential of anti-MMP drugs doxycycline (Dox) and 2'2-bipyridine (BP) in pathology and bacterial burden was compared to treatment with the anti-Gr-1 monoclonal antibody used to deplete neutrophils and Gr-1 positive monocytes. The M299 hypervirulent Mtb strain has been shown to induce higher production of MMP-2, -8 and -9, compared to laboratory strain H37Rv, which was associated with increased recruitment of inflammatory myeloid cells producing MMPs in the lung and development of more serious pathology. Treatment of mice with Dox and BP reduced the production of MMPs in the lung, suggesting a direct effect of these drugs on inhibition of MMPs. The effect of Dox in reducing pulmonary pathology was greater compared to the effect of BP, and only Dox was able to inhibit the development of the necrotic nucleus in the lesion. In addition, both drugs were able to reduce bacterial burden in the lung, which may be associated with both the direct antibacterial effect of Dox and the ability of these drugs to slightly reduce lung accumulation of phagocytes permissible for Mtb growth. Treatment of animals with anti-Gr-1 (positive control) led to a reduction in the accumulation of inflammatory cells in the lung and a reduction in MMP production, as well as a reduction in bacterial load. Compared to this treatment, the therapeutic effect of Dox can be considered as moderate. These data suggest that the use of Dox, the only drug licensed for use as an MMP inhibitor, in the treatment of cases of aggressive pulmonary TB associated with the rapid development of necrotic pathology may be useful for prevention of necrosis, especially in drug resistant TB cases.

Keywords: tuberculosis, matrix metalloproteinase, doxycycline, bipyridine

1- INTRODUÇÃO

1.1-Classificação de *Mycobacterium tuberculosis*

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB) compreende um grupo de subespécies próximas causadoras de tuberculose ou de ecótipos adaptados a diferentes hospedeiros animais, incluindo humanos. Todas as espécies do CMTB têm uma origem em comum, apesar disso, suas características biológicas, ecológicas e clínicas são bem distintas, o que sugere diferentes caminhos evolutivos (BAÑULS, 2015).

De acordo com as distâncias filogenéticas, o CMTB pode ser classificado em oito linhagens principais (L1 a L8), os ecótipos adaptados a humanos são *M. tuberculosis* (L1 a L4 e L7), *M. africanum* (L5 e L6), e *M. canettii* (Figura 1). Também existem os ecótipos adaptados a animais que estão agrupados na linhagem L8: *M. bovis* (que hospedam humanos e bovinos), *M. caprae* (hospedam ovelhas e cabras), *M. microti* (hospedam roedores), *M. pinnipedii* (hospedam focas e leões marinhos), *M. orygis* (hospedam antílopes) e *M. mungi* (hospedam mangustos) (BROSET, MARTÍN & GONZALO-ASENSIO, 2015).

Assim como as espécies do L8, que evoluíram com capacidade de infectar mamíferos específicos, as cepas adaptadas aos humanos evoluíram com capacidade de causar tuberculose em subpopulações de humanos. *M. canettii* originalmente foi isolada no Sudeste Africano (que inclui Somália, Eritreia, Somalilândia e Etiópia), cepas de L5 e L6 de *M. africanum* são comumente encontradas em países do Oeste Africano, L7 de *M. tuberculosis* é frequente na Etiópia e a L1 nas margens do Oceano Índico. As linhagens de *M. tuberculosis* L2, L3 e L4 possuem maior distribuição e infectam predominantemente pessoas no Leste Asiático, no Leste da Índia, e nas Américas e Europa, respectivamente (COMAS *et al.*, 2013).

Análises genômicas têm sido fundamentais para o estudo da ancestralidade dos membros do CMTB e ajudaram a identificar 14 regiões (conhecidas como regiões de diferenciação ou RD1-14) e participam da identificação de genes cromossomais relacionados a patogenicidade (FORRELAND *et al.*, 2013).

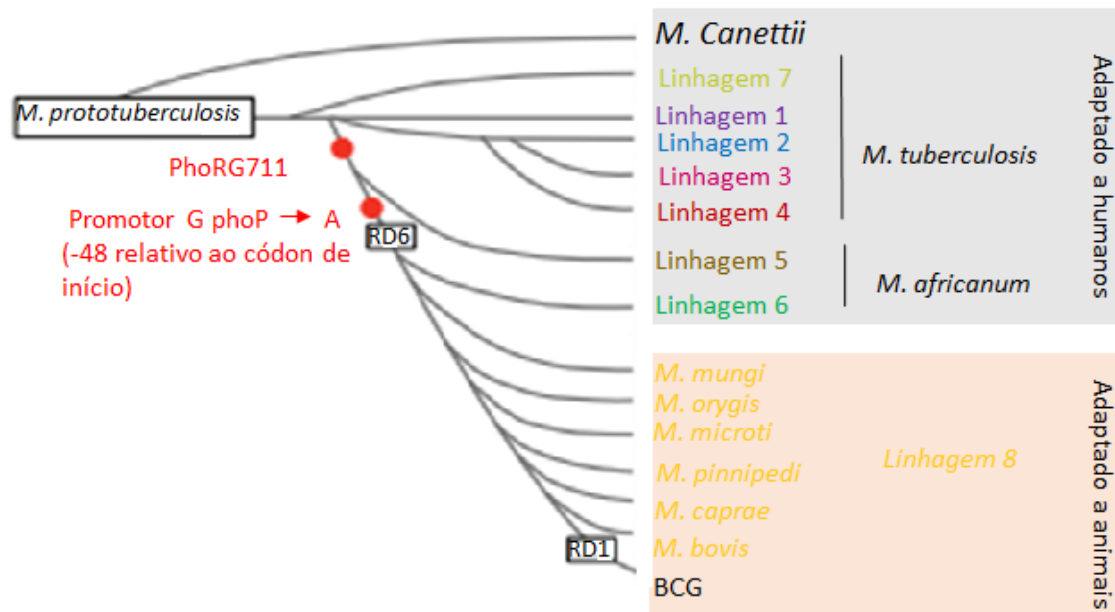


Figura 1: As filogenias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* e de BCG incluem vários polimorfismos no sistema de virulência PhoPR. Cenário evolucionar do complexo mostrando a presença de diferentes membros que pertencem a linhagens específicas. A adaptação dessas espécies em humanos e em animais também é indicada. Traduzido de BROSET, MARTÍN & GONZALO-ASENSIO, 2015

Micobactérias apresentam grande homogeneidade genética, entre 0,01-0,03% de variação nucleotídica. No caso de espécies pertencentes ao CMTB as sequências de nucleotídeos são quase idênticas e sequências de 16S ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) são totalmente idênticas. Esta similaridade comprova que todas as espécies derivam de um ancestral comum. Entretanto, elas diferem quanto ao tropismo pelo hospedeiro, ao fenótipo e à patogenicidade, o que sugere diferentes caminhos evolutivos (BROSET, MARTÍN & GONZALO-ASENSIO, 2015).

É importante observar que bactérias do CMTB são altamente clonais (apresentam ausência de troca genética horizontal), e isto se reflete na conservação evolucionária de epítomos reconhecidos por linfócitos T. Dos 491 epítomos analisados, 95% apresentaram mudanças nos aminoácidos, este fator é bastante benéfico para as espécies do complexo quanto ao reconhecimento pelo sistema imunológico do hospedeiro em alguns estágios do ciclo da patogênese (COMAS *et al.*, 2010). Baseado nestes dados, especula-se que respostas imunológicas desencadeadas pelos epítomos de linfócitos T podem ser mais benéficas para as bactérias do que para os hospedeiros. Isso porque ao

invés de escapar da resposta imunológica, as bactérias do CMTB querem ser reconhecidas pelo sistema imunológico para que esta resposta do hospedeiro contribua para destruição tissular e consequente formação de cavidade pulmonar, aumentando assim a chance de transmissão (GAUGNEUX, 2012).

A relação de antiguidade das linhagens entre si foi determinada a partir de um estudo de 20 regiões genômicas variáveis resultantes de eventos de inserção/deleção (BROSCH *et al.*, 2002). Em particular, com base na presença ou ausência de uma deleção específica em *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) (TbD1), essas linhagens poderiam ser subdivididas em ancestral (TbD1+) ou modernas (TbD1-). As linhagens que infectam animais, L1, L5, L6 e L7 (*M. bovis*, *M. microti* e *M. pinnipedi*), e *M. canettii* se agrupam como CMTB ancestral (TbD1+), enquanto que as linhagens L2, L3, e L4 constituem o grupo moderno (TbD1-) (Figura 2). O fato de a *M. canettii* e as linhagens ancestrais de Mtb não apresentarem nenhuma das deleções observadas em linhagens animais sugerem que o bacilo do tubérculo foi originalmente um patógeno humano. Esta hipótese foi corroborada em uma ampla análise genética (BAÑULS *et al.*, 2015).

As linhagens de Mtb podem ser subdivididas em famílias ou tipos internacionais de spoligotipos (TIS) por *spoligotyping*, uma técnica de genotipagem de referência. Um banco de dados mundial inclui 7.104 diferentes spoligotipos correspondentes a 58.187 isolados clínicos de 102 países. Dentre os 7.104 spoligotipos da base de dados, 24 representam a maioria dos isolados clínicos caracterizados. Particularmente, as principais famílias de Mtb são: Beijing, Ásia Central, Leste Indiano da África, Haarlem, Mediterrâneo da América Latina, T e X. Coincidentemente, a maioria das principais famílias descritas no banco de dados pertence a linhagens consideradas modernas: Beijing pertence a L2, CAS a L3, e Haarlem, LAM, X e T à L4 (BRUDEY *et al.*, 2006).

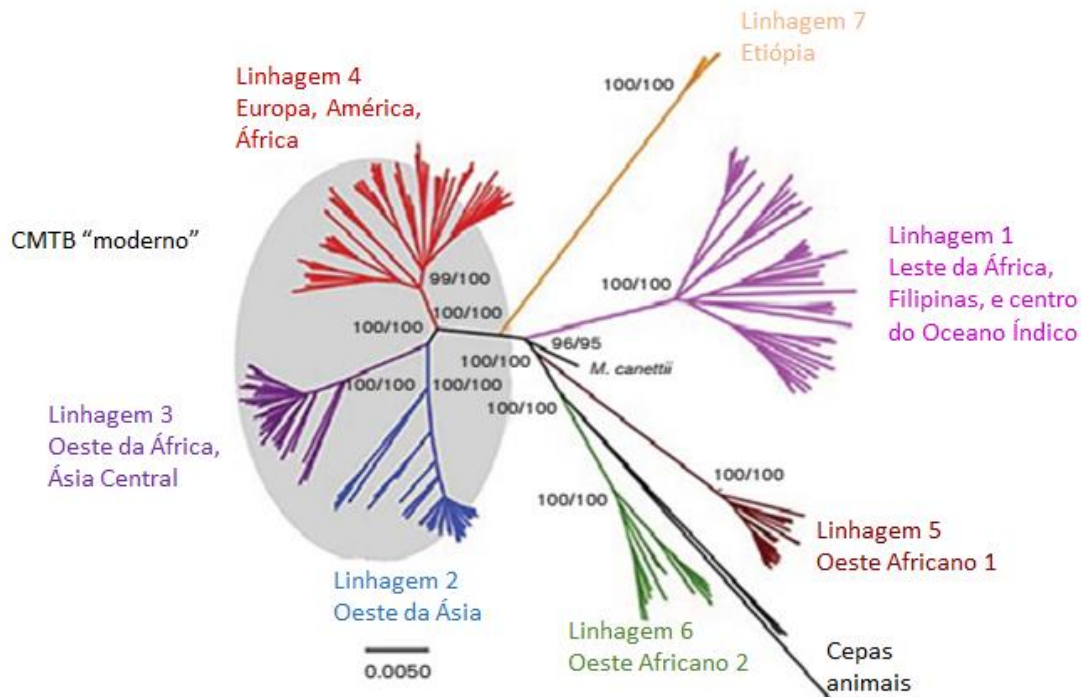


Figura 2: Filogenia do complexo Mtb baseada em estudos de genoma. As 5 linhagens Mtb (L1, L2, L3, L4 e L7) estão representadas. Destaque para 2 linhas individualizadas de *M. africanum* (L5 e L6) e para a posição do ancestral de *M. canettii*. Traduzido de Bañuls, *et al.*, 2015.

1.2- Epidemiologia

Com aproximadamente 1 bilhão de mortes nos últimos 200 anos, o bacilo de Mtb é considerado um dos patógenos de maior êxito em se tratando de capacidade de infecção (BRITES & GAGNEUX, 2017).

As características apresentadas por *M. canettii* e sua alta similaridade de nucleotídeos (97,3%) com linhagens CMTB levam a crer que o ancestral destas linhagens foi um organismo similar ao *M. canettii*. As linhagens de CMTB adaptadas a humanos são consideradas patógenos obrigatórios porque apenas em hospedeiros humanos eles completam seu ciclo de vida, e porque estes microrganismos precisam causar tuberculose pulmonar para serem transmitidos para outros hospedeiros (BRITES & GAGNEUX, 2017).

Especula-se que o patógeno ancestral de bactérias do CMTB tenha tido amplo espectro quanto aos seus hospedeiros e consequentemente divergiram em linhagens separadas que se tornaram mais específicas aos seus hospedeiros ao longo do tempo. Isto porque as sete linhagens que compõem o

CMTB não formam uma unidade monofilética, ou seja, elas não compartilham o ancestral mais recente em comum (BRITES & GAGNEUX, 2015).

Mtb, assim com *M. bovis* e *M. Canettii*, pode sobreviver no solo por um longo período de tempo e manter seu potencial de infecção (GHODBANE *et al.*, 2014). Mtb e *M. africanum* geralmente causam tuberculose pulmonar ativa ao serem transmitidas de um hospedeiro para outro, já a epidemiologia da *M. canettii* é totalmente diferente. Esta bactéria foi descrita pela primeira vez em 1960 e apenas 100 cepas foram isoladas até o momento. Casos clínicos são raros e na maioria dos casos apresentam tuberculose na forma extrapulmonar. Ainda não foi demonstrado nenhum caso de transmissão inter-humana. Estes dados sugerem que exista um reservatório ambiental (FABRE *et al.*, 2010).

1.3- Características estruturais

As micobactérias pertencem à família Mycobacteriaceae são classificadas como gram-positivas, não esporuladas, apresentam ausências de mobilidade, em forma de haste e um bastonete delgado, aeróbico obrigatório (NEGI *et al.*, 2010). O gênero *Mycobacterium* geralmente é dividido em espécies de crescimento rápido ou lento, baseado na sua capacidade de desenvolver colônias em menos ou mais de sete dias, respectivamente. Espécies de crescimento rápido são em sua maioria bactérias oportunistas ou não patogênicas, enquanto as de crescimento lento incluem as micobactérias patogênicas aos humanos, como a *M. tuberculosis*, *M. ulcerans*, e *M. leprae*, causadoras de tuberculose, úlcera Buruli e hanseníase, respectivamente (BROSET, MARTÍN, GONZALO-ASENSIO, 2015). Os bastonetes de Mtb crescem lentamente (20 horas ou mais de tempo de geração), algumas vezes formam filamentos e tendem a crescer em cachos (TORTORA, 2012).

Sua parede celular composta por 60% de lipídeos é a maior determinante de virulência bacteriana, os lipídeos também conferem para a parede celular a dificuldade de permeabilidade a corantes, pois micobactérias coradas com carbol-fucsina não podem ser descoradas com ácido ou álcool, e assim, são classificadas como bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR).

Apresentam resistência a muitos antibióticos, resistência a morte por compostos ácidos ou alcalinos, resistência a lise osmótica via complemento, resistência a oxidações letais, e sobrevivência dentro de macrófagos (MDLULI *et al.*, 2006).

Dentre as macromoléculas que compõem a parede estão peptidoglicanos ligados covalentemente ao galactofurano, que por sua vez está anexado a vários filamentos de arabinofurano altamente ramificados unidos a ácidos micólicos, que são ácidos graxos de cadeia longa α -alquil β -hidroxi (MOUGOUS *et al.*, 2004). Manosídeos fosfatidil-mioinositol, lipoarabinomanana (LAM) e lipomanana (LM) estão ancoradas na membrana plasmática e alcançam o exterior da parede celular. A camada mais externa da micobactéria é a capsula que contém polissacarídeos e menores quantidades de lipídeos no interior. Nesta matriz existem várias proteínas relacionadas a síntese e a manutenção da parede celular que também são responsáveis pela adesão, infecção, transporte de solutos (porinas) e pela sobrevivência da micobactéria nas células hospedeiras (DAFFÉ & ETIENNE., 1999).

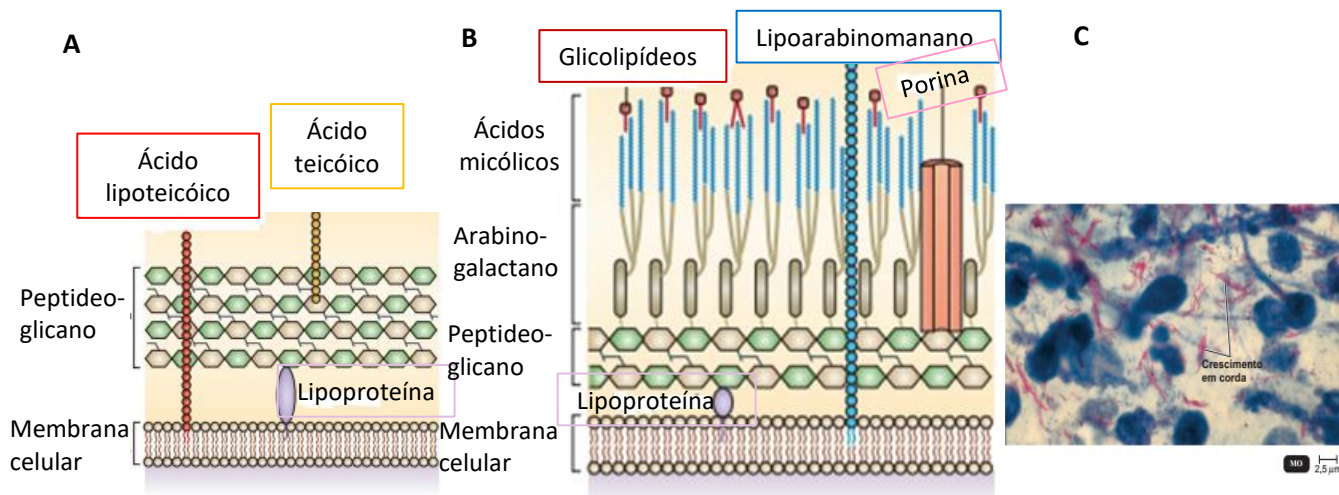


Figura 3: Estrutura da parede celular de bactérias gram-positivas (A) e de Mtb (B). Em A a bactéria gram-positiva possui uma única membrana lipídica ao redor da membrana celular composta por uma espessa camada de peptidoglicano e de ácido lipotéico, que está ancorado na membrana celular por diacilglicerol. (B) Paredes celulares de micobactérias consistem em fina camada de peptidoglicano e de arabinogalactano, e uma espessa camada de ácidos micólicos. Glicolipídeos e porinas também são encontrados, assim como lipoarabinomanana, que está ancorado à membrana celular por diacilglicerol. Esta parede celular circula uma única membrana lipídica. (C) o crescimento filamentososo, semelhante a um crescimento fúngico, corado em vermelho mostrado aqui em um esfregaço de tecido pulmonar. Sob outras condições, ele cresce como bacilos delgados individuais. Um componente céreo da célula, o fator corda, é responsável por este arranjo em forma de cordão. Traduzido de Brown *et al.*, 2015 e Tortora, Gerard J., 2012.

1.4- Fatores de virulência

Nos modelos da biologia evolucionária a virulência é correlacionada com a transmissão e com o acesso ao maior número possível de hospedeiros susceptíveis favorecendo uma virulência forte e um curto período de latência (LEVIN, 1996). A rápida expansão humana e a grande densidade populacional em cidades superpopulosas da Europa nos séculos XVIII e XIX poderiam selecionar bactérias menos seletivas, já que o acesso a hospedeiros susceptíveis não era um fator limitante. Este cenário poderia explicar porque linhagens modernas parecem ser mais virulentas e estão associadas a um período de latência mais curto do que as linhagens ancestrais. Portanto, estas linhagens tiveram maior sucesso evolucionário em termos de propagação geográfica do que as linhagens ancestrais. Provavelmente por se adaptarem melhor ao aumento da disponibilidade de hospedeiros susceptíveis, que ocorreu em consequência do aumento da população humana nos últimos séculos (BAÑULS *et al.*, 2015).

A patogenicidade é multifatorial e requer que os microrganismos supram suas condições básicas de sobrevivência. Para que tenham acesso ao tecido do hospedeiro, os bacilos devem ser capazes de colonizar superfícies de mucosas; entrar nas células; multiplicar no ambiente dos tecidos; resistir ou interferir nos mecanismos de defesa; e de causar danos no tecido. Caso o microrganismo não consiga cumprir algum desses requisitos ele perde sua virulência (DAFFE & ETIENNE, 1999).

A identificação de genes de virulência de micobactéria tem sido essencial para melhor entendimento da patogenicidade, virulência e persistência da micobactéria. A maioria dos genes de virulência identificados até o momento codifica enzimas de diversas vias lipídicas, proteínas de superfície celular, reguladores e proteínas de sistemas de transdução de sinal (FORRELAND *et al.*, 2013).

Lipídeos micobacterianos da parede celular como o trealose dimicolato (TDM), a lipoarabinomanana manossilada (Man-LAM) e o fitiocerol dimicoceroserato (PDIM) têm papel importante no tráfico intracelular e no impedimento da maturação do vacúolo por *M. tuberculosis* (AXELROD *et al.*, 2008). A capacidade de o bacilo Mtb crescer em cordas, uma fração lipídica de

cepas virulentas, conhecido como fator corda, se dá ao componente principal da família TDM, que se liga a membros da família das lectinas tipo C, exibe inúmeras atividades biológicas dentre elas toxicidade extrema em camundongos com inibição da respiração e da fosforilação nas vias de succinato e de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), perda do controle respiratório entre outros. Outra substância presente na superfície do bacilo, os fosfatidilinositol manosídeos, são capazes de inibir a proliferação de monócitos do sangue periférico induzida por antígenos. A inibição da proliferação linfocitária acarreta em mudança no padrão de produção de citocinas e falha na ativação de macrófagos (DAFFE & ETIENNE, 1999).

A expressão de PDIM pelo bacilo limita o reconhecimento do Mtb pelas células da imunidade inata, reduzindo o recrutamento de macrófagos ativados por receptores do tipo Toll (TLR) e mascarando padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs). Estes efeitos restringem a ativação de macrófagos e fornece um nicho para replicação intracelular da bactéria (ORME, ROBINSON & COOPER, 2015).

Além disso, outros lipídeos micobacterianos modificam a sinalização celular do hospedeiro, afetam a secreção de citocinas necessárias para proteção contra o microrganismo, participam do processo de inflamação durante a infecção tuberculosa, ou são reconhecidos como antígenos pelo sistema imunológico adaptativo (DAFFÉ & ETIENNE, 1999).

A secreção de proteínas é um importante mecanismo para interação com células do hospedeiro exportando toxinas e proteínas sinalizadoras que permitem que as bactérias causem patologia. O sistema de secreção ESX, também chamado de sistema de secreção tipo sete (T7SS) é composto por cinco membros. Os membros ESX-1 e ESX-5 estão envolvidos na virulência da micobactéria por afetarem a migração de micobactérias patogênicas entre as células (ABDALLAH *et al.*, 2007).

O sistema ESX-1 é responsável pela produção de duas proteínas relevantes associadas a virulência no CMTB, elas são a ESAT-6 (alvo antigênico secretor inicial de 6kDa) e a CFP-10 (proteína de filtrado da cultura de 10kDa), também chamadas de ESXA e ESXB, respectivamente. Os genes responsáveis pela expressão dessas proteínas estão no segmento RD-1 e está ausente em *M. marinum* e na vacina do Bacillus Calmette-Guérin (BCG) (PYM *et al.*, 2003).

Os antígenos ESAT-6 e CFP-10 são necessários para que *Mtb* escape do compartimento fagossomal de células fagocitárias. A liberação de ESAT-6 no citoplasma celular também está relacionada ao acesso ao complexo principal de histocompatibilidade de classe-I (MHC-I) que comporta o proteassoma. Estes eventos explicam o recrutamento e a ativação de linfócitos TCD8 para o pulmão de camundongos infectados por *Mtb* (VAN DER WEL *et al.*, 2007).

A atividade do ESX-1 é regulada após a transcrição pela serino protease MycP1. Na ausência desta proteína a virulência da cepa é atenuada em modelos animais de infecção crônica. Ela faz o ajuste fino da secreção da ESAT-6 e da CFP-10, ponderando a virulência e as propriedades imunogênicas dessas proteínas, mantendo a infecção a longo prazo (OHOL *et al.*, 2010).

O sistema de regulação de virulência PhoPR controla importantes fatores de virulência do CMTB como ESAT-6 e outros. O ancestral comum de *M. africanum* L6 e de linhagens adaptadas a animais possui três mutações que afetam os genes PhoPR. Ao transferir estas mutações para *Mtb* adaptado a humanos, as cepas de referência CG1237 (linhagem 2) e H37Rv (linhagem 4) diminuem a secreção do antígeno ESAT-6 (GONZALO-ASENSIO *et al.*, 2014).

1.5- Desenvolvimento de *Mycobacterium tuberculosis* resistente à medicamentos

Diferenças genômicas entre as linhagens de CMTB impactam em suas capacidades de causar doença ou de desenvolver resistência a medicamentos. Cepas de linhagens modernas além de estarem associadas a maior quantidade de casos de doenças do que as linhagens ancestrais, também apresentam maior resistência a medicamentos, provavelmente por causa do acúmulo de mutações espontâneas durante a replicação (MCGRATH *et al.*, 2014).

Em *Mtb* a resistência a medicamentos codificada geneticamente surge exclusivamente através de mutações cromossômicas, sendo que a maioria delas são polimorfismos de um único nucleotídeo. Em geral, mutações acontecem espontaneamente devido a erros durante a replicação do DNA (ANDERSSON & HUGHES, 2011).

A concentração do medicamento é um fator determinante para mutações associadas a resistência durante o tratamento. As mutações se desenvolvem

quando a concentração do medicamento não é ideal, pois elas acarretam um custo ao metabolismo de bactérias ao visarem genes codificadores de funções biológicas essenciais, geralmente acarretando em uma redução do crescimento bacteriano, da sobrevivência e da virulência (AL-SAEEDI & AL-HAJAJ, 2017).

A evolução compensatória ocorre quando cepas de *Mtb* sofrem mutações sem custo ou de baixo custo com altas taxas de resistência. Este mecanismo permite que a cepa adquira uma mutação secundária que minimiza o efeito deletério da mutação original, assim há um aumento no metabolismo sem perda do fenótipo resistente (ANDERSSON & HUGHES, 2010). Um exemplo de mutação secundária ocorre na RNA polimerase de cepas resistentes a rifampicina, no qual o efeito deletério é compensado por mutações no gene *RpoB* (codifica a subunidade β da RNA polimerase na bactéria) na ausência da rifampicina (COMAS *et al.*, 2013).

Outro fator mutagênico é o estresse oxidativo. Macrófagos são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio e de intermediários reativos de nitrogênio. Estes, por sua vez, interagem com nucleotídeos resultando em modificações químicas que levam a perda do emparelhamento e ao dano no ácido desoxirribonucleico (DNA). O dano no DNA acarreta em aumento a propensão de erros na regulação do sistema de reparo do DNA (MCGRATH *et al.*, 2014).

Vários mecanismos são observados quando se fala em resistência a diferentes medicamentos por *Mtb*. Alguns estão relacionados a impermeabilidade da parede ou da membrana celular de *Mtb* (genes essenciais para atividades enzimáticas e componentes celulares que aumentam os níveis de resistência ao diminuir a permeabilidade celular) (AL-SAEEDI & AL-HAJAJ, 2017). Outros à ação do efluxo da bomba (depende da sua expressão basal e pela expressão do gene induzido pelo medicamento ou resultado da super expressão adquirida pelas mutações) (LI *et al.*, 2015).

Cepas Beijing tem sido associadas com o aparecimento de resistência a medicamentos. Este potencial pode ser atribuído a fatores além da taxa de mutação, como pelo melhor desenvolvimento de sistemas de efluxo, a maior taxa

de replicação ou pelo aumento da habilidade para se adaptarem ao custo do metabolismo que leva a resistência (MCGRATH *et al.*, 2014).

Todos esses mecanismos citados levam a resistência a medicamentos e permitem que micobactéria module seu metabolismo aumentando sua transmissibilidade e estabilizando seu fenótipo de resistência dentro da sua população (AL-SAEEDI & AL-HAJOJ, 2017).

1.6- Histórico da doença

Acreditava-se que a tuberculose (TB) humana tivesse originado a partir de animais, porém análises filogenéticas mais recentes do CMTB têm sugerido que as cepas adaptadas a induzirem tuberculose em animais divergiram das principais cepas humanas antes da Transição Neolítica Demográfica (período no qual se deu início a domesticação de animais favorecendo a ocorrência de transferências zoonóticas de novos patógenos para humanos). Foi proposto que bactérias do CMTB que infectam humanos originou na África há milhares de anos, e as migrações de indivíduos para fora da África juntamente ao aumento da densidade populacional durante o período Neolítico podem ter dado início da expansão do CMTB (BANULS *et al.*, 2015). Assim, especula-se que o período Neolítico tenha contribuído para o sucesso do CMTB, porém não devido a transferência zoonótica, mas sim por uma combinação do aumento do tamanho da população e da densidade de hospedeiros (COMAS *et al.*, 2013).

Após a descoberta de um fóssil de *Homo erectus* de 500 000 anos de idade na Turquia com lesões nos ossos típicas de infecção por TB, Roberts *et al.* (2009) propôs que a TB pode ter antecedido a era moderna dos humanos. Este estudo sugere que a Mtb pode não ter originado de animais, como afirma a hipótese mais divulgada, mas sim de humanos.

O que podemos constatar é que houve uma longa co-evolução do CMTB com humanos que influenciou a biologia e a epidemiologia da TB humana, assim como ocorreu em muitas outras doenças infecciosas. Geralmente o que é observado é que a TB apresenta características de uma doença que afeta locais com de alta densidade populacional e também de doença que acomete locais de

baixa densidade populacional. Isso porque a transmissão por via aérea é uma característica de doença transmitida em áreas com maior concentração populacional. Porém, sua capacidade de permanecer em estado latente no indivíduo por várias décadas é típica de doença transmitida em regiões com baixa densidade populacional. Esta característica resultaria de uma coadaptação da interação hospedeiro-patógeno que permitiu a sobrevivência do CMTB durante um longo período quando a transmissão entre indivíduos era rara e esporádica. Esta dualidade é uma demonstração da sua adaptação a história demográfica dos homens (GAGNEUX, 2012).

1.7- Dados relevantes

Desde 2007 a TB tem sido a maior causa de morte entre agentes infecciosos, em posição acima do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) causador da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2018 a estimativa de incidência foi 10 milhões de novos casos em todo o mundo. Sendo que 44% do total da incidência ocorreram no Sudeste da Ásia. Nas Américas somente foram relatados 2,9% do total, dos quais 33% dos novos casos foram contabilizados no Brasil. Entre os anos de 2000 e 2016 houve uma redução global em torno de 1,4%.

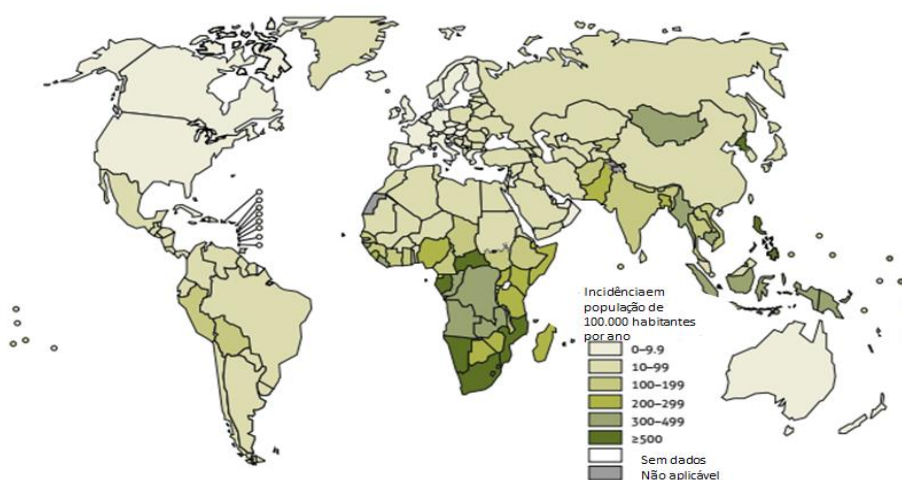


Figura 4: Incidência anual de casos de tuberculose em relação ao tamanho da população (taxa de incidência) variou amplamente entre países em 2018, de menos de 10 por 100 000 habitantes

na maioria dos países de alta renda para 150-300 na maioria dos 30 países de alta carga de TB. OMS, 2018

Dados do Plano Nacional de Tuberculose de 2018 afirmam que o Brasil ocupa a 20ª posição mundial quanto à carga da doença e a 19ª posição no que se refere a coinfeção TB-HIV no ano de 2015. No ano de 2018 foram diagnosticados 72.788 novos casos, com um coeficiente de incidência de 34,8 a cada 100 mil habitantes. Embora, de 2009 a 2018, tenha sido observada uma queda na média anual de 1%, o coeficiente de incidência aumentou nos anos de 2017 e 2018 em relação aos anos de 2014 e 2016. Nota-se que, apesar da queda observada dos coeficientes de incidência e mortalidade o país possui elevada variabilidade entre os estados quanto a esses indicadores. Isso implica na necessidade de buscar estratégias específicas para cada local.

A OMS preconiza que para o controle da doença a meta de cura seja igual ou superior a 85% e a de abandono seja menor do que 5%. Apesar dos percentuais apresentarem melhoria na série histórica (75,1% de cura e 11,3% de abandono em 2014), o país ainda possui encerramentos aquém dos valores definidos pela OMS.

1.8 – Patologia da TB

A transmissão ocorre por via aérea, quando um paciente acometido por TB expele o bacilo por tosse e um indivíduo inala este bacilo presente no aerossol. O resultado das infecções por micobactérias é dependente da interação entre a bactéria e as respostas imunológicas inata e adquirida do hospedeiro. Durante a infecção por Mtb, essas interações podem conduzir ao controle do patógeno, ao estabelecimento da infecção latente ou a progressão da doença (CASANOVA & ABEL, 2002).

A doença causada por Mtb é predominantemente pulmonar, a TB pulmonar representa 70% dos casos da doença, apesar de o bacilo ser capaz de disseminar para outros órgãos, incluindo vasos linfáticos, ossos, e meninges, levando ao desenvolvimento de tuberculose extrapulmonar (CCDC, 2007). Classicamente, a patogênese da TB pode ser dividida em dois estágios. Após a infecção inicial com Mtb, alguns indivíduos progridem rapidamente com a forma

ativa da doença, geralmente referida como TB primária, que acomete principalmente crianças e alguns adultos. Em outros casos, há contenção da infecção inicial e conseqüentemente presume-se como infecção latente, entretanto a doença ativa pode se apresentar após um intervalo de muitos anos da exposição. Indivíduos com infecção latente tem um risco de 5 a 10% de desenvolver TB ativa durante a vida, o termo para esta situação é reativação ou TB pós-primária (O’GARRA *et al.*, 2013).

A latência acomete um grupo heterogêneo de indivíduos, há aqueles que tem a doença subclínica; aqueles que irão progredir para a doença primária ativa; aqueles que mantem a infecção persistente por período vitalício; aqueles que suprimem a infecção temporariamente, mas depois sucumbem e desenvolvem a doença ativa, possivelmente por resultado de uma imunossupressão; ou finalmente aqueles que conseguem eliminar o patógeno através da resposta imunológica inata ou adaptativa (O’GARRA *et al.*, 2013).

1.8.1- Resposta imunológica inata

As primeiras barreiras de defesa contra o Mtb após a inalação do aerossol com o bacilo são formadas pelas células epiteliais das vias aéreas, que formam uma barreira que evita a invasão; a lamina própria, constituída de tecido conectivo e células do sistema imunológico; e o líquido da superfície aérea, composto por muco, imunoglobulina A (IgA) e peptídeos antimicrobianos. Essas células epiteliais reconhecem PAMPs presentes na superfície do bacilo e constitutivamente expressam receptores de reconhecimento padrão (PRR) como receptores do tipo *Toll*, receptores de lecitina tipo-C, dectina-1, proteína 2 do domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos (NOD2), molécula não integrina específica de células dendríticas que capta a molécula de adesão intercelular 3 (DC-SIGN) e receptores de manose (LI *et al.*, 2012) (Figura 5).

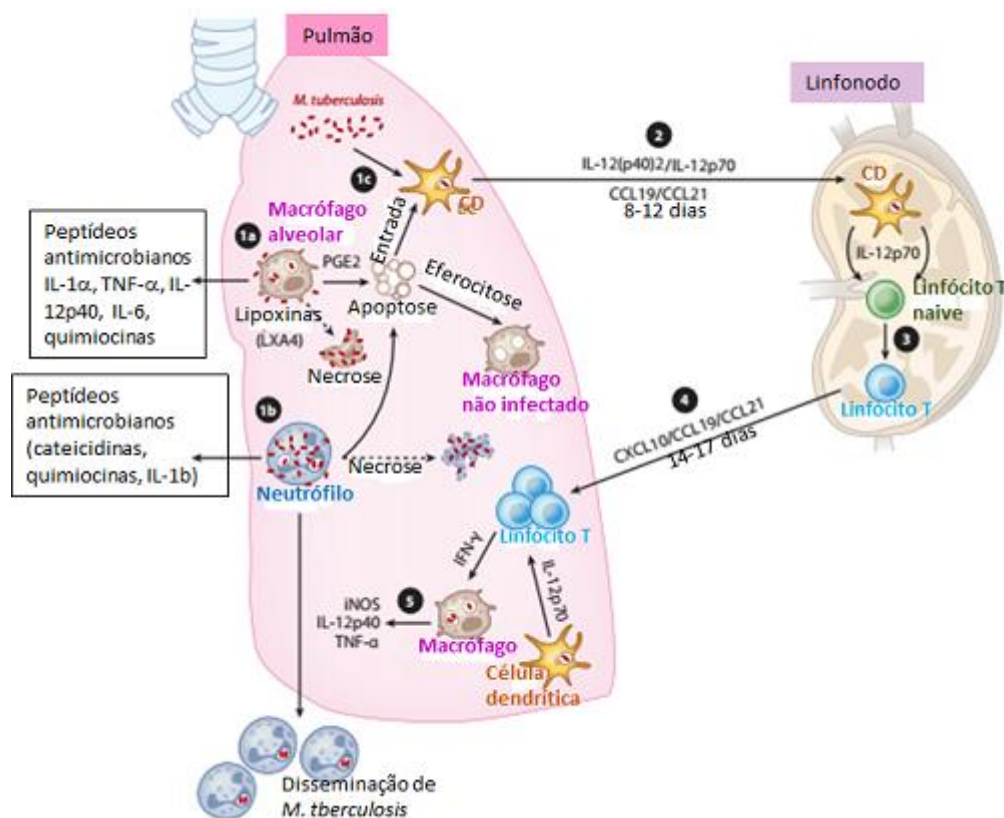


Fig 5: Resposta imunológica durante a infecção por *M. tuberculosis*. Após a infecção pelo aerossol com Mtb, macrófagos alveolares (1a), neutrófilos (1b), e células dendríticas (1c) podem ser infectadas levando a produção e secreção de peptídeos antimicrobianos, citocinas e de quimiocinas. O balanço de mediadores lipídicos, como prostaglandina E2 (pró apoptótica) ou de lipoxina A4 (pró necrótica), dentro de macrófagos infectados regulam vias que levam a indução tanto da apoptose como da necrose. Células apoptóticas infectadas podem ser fagocitadas por células dendríticas residentes pulmonares ou sofrerem eferocitose por macrófagos pulmonares não infectados (1c). Células dendríticas infectadas por Mtb migram para o linfonodo local 8-12 dias após a infecção por influência de IL-12(p40)2 e IL-12p70 e das quimiocinas CCL19 e CCL21 (2), para estimular linfócitos T *naive* para diferenciação no fenótipo Th1 (3). Estes linfócitos migram de volta aos pulmões pelo gradiente quimioatrativo dependente de quimiocinas 14-17 dias após a exposição/infecção inicial (4) e produzem IFN- γ , levando a ativação de macrófagos, produção de citocinas e a indução de fatores microbicidas incluindo o iNOS (5). Traduzido de O'Garra *et al.*, 2013.

As células epiteliais das vias aéreas ainda apresentam o antígeno para linfócitos T invariáveis associados a mucosa (MAIT) estimulando-os a secretar interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alpha (TNF- α) e granzimas, contribuindo para a remoção de Mtb. Linfócitos MAIT fornecem o IFN- γ inicial para ativação de macrófagos (GOLD *et al.*, 2010).

Os receptores dos macrófagos alveolares que mediam a entrada do bacilo na célula são os receptores de varredura, receptores do complemento e receptores de manose. Uma vez internalizada, a bactéria é envolvida por fagossomos, que maturam em fagolisossomos ácidos e hidrolíticos. Este processo leva a morte e degradação da bactéria por compostos microbicidas e hidrolíticos (AXELROD *et al.*, 2008).

A infecção de macrófagos por Mtb inibe a morte por apoptose e promove a morte necrótica estimulando a produção de lipoxinas, como a lipoxina A4 (LXA4), que inibe a produção de prostaglandina E2 (PGE2), que é necessária para a proteção da membrana interna da mitocôndria. Esta é uma atividade chave para o aumento da sobrevivência da bactéria, podendo inclusive afetar a ativação de linfócitos (TORRADO, ROBINSON & COOPER, 2011).

Em indivíduos com TB ativa a população celular predominantemente infectada é a de neutrófilos (EUM *et al.*, 2010). Eles fagocitam o bacilo e secretam efetores antimicrobianos de seus grânulos, constituindo importante mediadores da atividade antimicrobiana e da imunopatologia na TB humana. Isso porque moléculas como a elastase, a colagenase e a mieloperoxidase, durante a explosão respiratória, danificam indiscriminadamente células do hospedeiro e bacterianas. Após estimulação por Mtb, os neutrófilos secretam quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias para o recrutamento e a ativação de outras células do sistema imunológico (SIA *et al.*, 2015).

Apesar de os neutrófilos terem papel protetor imediatamente após a exposição ao bacilo, eles estão fortemente associados a perda da contenção do Mtb e a progressão da doença ativa. Uma das formas pelas quais os neutrófilos podem interferir na resposta protetora é limitando a interação entre fagócitos infectados e linfócitos T específicos (ORME, ROBINSON & COOPER, 2015).

Células dendríticas no alvéolo maturam e apresentam antígenos micobacterianos para linfócitos residentes em linfonodos locais através do MHC classe I e II (MARINO *et al.*, 2004). A migração de células dendríticas até os linfonodos é dependente da expressão de interleucina 12p40 (IL-12p40) e do receptor IL-12R β -1 na população dendrítica (ORME, ROBINSON & COOPER, 2015). Células dendríticas são consideradas as indutoras mais eficientes de

linfócitos T *naive*, pois elas não só fornecem o estímulo com antígenos específicos, mas também fornecem sinais secundários e terciários para promover o desenvolvimento eficiente de linfócitos T efetores (COOPER, 2009).

1.8.2- Resposta imunológica adaptativa

Para que os linfócitos T *naive* se tornem ativados, eles devem expressar o receptor de linfócito T (TCR) que reconheça o antígeno micobacteriano no contexto de MHC/HLA na superfície da célula dendrítica. Caso outros sinais co-estimulatórios sejam apresentados, o linfócito se torna ativado, se expande, aumenta a regulação do grupamento de diferenciação 44 (CD44) e reduz a regulação de CD62L (BEHAR *et al.*, 2014). Uma vez iniciada a resposta adaptativa, linfócitos T devem migrar pela circulação até o parênquima pulmonar e em seguida ao local da infecção. A expressão da citocina protetora IFN- γ por linfócitos T CD4 mantém o ambiente pulmonar rico em monócitos, limita a sobrevivência de neutrófilos e reduz a expressão de IL-17 e o recrutamento de neutrófilos agindo em células residentes no pulmão (ORME, ROBINSON & COOPER, 2015).

Existem vários subtipos de linfócitos T CD4 efetores, variando desde células ativadas que produzem IL-12, até as células produtoras de IFN- γ , as células multifuncionais que expressam IL-12, IFN e TNF, cuja presença está associada a proteção (DARRAH *et al.*, 2007). Os linfócitos T CD8, também chamados de linfócitos T citotóxicos (CTL), ajudam no controle de Mtb tanto por exocitose de perforina para a lise de macrófagos infectados como pela morte direta dos bacilos. Linfócitos do tipo T helper 17 (Th17) produzem IL-17 e são importantes para o recrutamento de células polimorfonucleares e outras. A resposta Th17 geralmente é inibida por IFN- γ , produzido por células Th1 (CRUZ *et al.*, 2010).

A maioria dos linfócitos T efetores, CD4⁺ e CD8⁺ $\alpha\beta$ TCR⁺, entra em apoptose após a remoção do antígeno, mas um grupo com cerca de 10% deles sobrevive por anos após a infecção (HARRINGTON *et al.*, 2008). Eles têm a vantagem de circular através de tecidos não-linfoides e de se diferenciarem mais

rápido em células efetoras com atividade CTL e com produção de citocinas. Estas células de vida longa são os linfócitos T de memória, que expressam altos níveis de IL7-R (CD127) e de CD44, e aquelas com grande potencial proliferativo ainda expressam CD62L e do receptor de quimiocina tipo 7 (CCR7) (KAECH *et al.*, 2002).

Outra função de linfócitos é seu papel fundamental na formação do granuloma. Citocinas derivadas de linfócitos T, como o TNF e quimiocinas como CCL3, recrutam macrófagos inflamatórios, neutrófilos e linfócitos B para o granuloma. Linfócitos T CD4 moldam o microambiente do granuloma, que podem mudar ao longo do tempo em relação ao seu tamanho e a sua atividade metabólica – alguns encolhem enquanto outros se expandem (SAUNDERS & BRITTON, 2007). Depois de formado, o granuloma desenvolve áreas centrais de necrose, chamada de necrose caseosa, resultando na morte da maioria das bactérias e na destruição do tecido circulante. A chegada de linfócitos fornece uma estrutura mais organizada ao granuloma, que se torna rodeado por linfócitos e cercado por fibroblastos demarcando sua estrutura periférica. Alguns bacilos, entretanto, conseguem sobreviver e ficam protegidos da morte no ambiente caseoso, onde eles resistem em estado de persistência e podem ser reativados para desenvolver a infecção ativa (GROSSET, 2003).

Um dogma central da patogenia da tuberculose é a necrose caseosa que leva a destruição da matriz extracelular e a transmissão da bactéria. A cavitação é uma consequência da necrose caseosa e uma característica patológica importante devido ao risco de transmissão da infecção, recaída após o tratamento e ao surgimento de resistência a medicamentos (ORDONEZ, *et al.*, 2016). Para que cavidades se formem o parênquima pulmonar tem que ser totalmente destruído e proteases devem degradar a intrincada malha de colágeno fibrilar que sustenta a estrutura pulmonar.

Parte do sucesso de Mtb como patógeno está na sua habilidade de entrar em uma fase não replicante ou dormente durante anos dentro das células do hospedeiro. A persistência acontece em cerca de 90% dos indivíduos que são infectados por bactérias do CMTB. Ela pode ser definida como uma infecção persistente por CMTB na ausência de sintomas clínicos (DAFFE & ETIENNE, 1999). A dormência do bacilo de Mtb no hospedeiro é atribuída a uma sofisticada

capacidade de evasão da resposta imunológica que permite que o bacilo persista indefinidamente. Estratégias adotadas na fase de dormência incluem manifestações imunológicas (manipulação de receptores TLR, de citocinas, e da função das células imunológicas), bioquímicas (desenvolvimento da resistência a intermediários reativos e a antibióticos), e genéticas (ativação de genes associados a dormência) (PEDDIREDDY, DODDAM & AHMED, 2017).

1.9 – Tuberculose extrapulmonar

O estabelecimento da tuberculose extrapulmonar (TBEP) pode acontecer com ou sem infecções pulmonares locais e sua manifestação tem taxa de morbidade substancial. Cerca de 15% da TB reativada do estado de latência pode acontecer em órgãos extrapulmonares sem que a TB pulmonar esteja ativa. A taxa de desenvolvimento da TBEP está entre 10% e 25% nos pacientes imunocompetentes (YANG & KONG, 2015).

A disseminação do bacilo acontece durante a migração da bactéria fagocitada por macrófagos alveolares ou por células dendríticas até os linfonodos e a corrente sanguínea através do epitélio alveolar. O fenótipo de disseminação de Mtb do local de infecção inicial nas células do hospedeiro é um sinal de falha na contenção da bactéria pelo granuloma. Entretanto, como os linfonodos são locais críticos para apresentação de antígenos por fagócitos profissionais para linfócitos T, e estimulação destes linfócitos T, a disseminação nos linfonodos regionais ajuda a desenvolver a resposta imunológica protetora mediada por linfócitos T (YANG & KONG, 2015).

Os locais frequentemente afetados pela TBEP são a pleura, os linfonodos, os ossos e as cartilagens, o sistema nervoso central (meninges), a laringe, o esqueleto (em particular a espinha), o trato geniturinário, os olhos, o trato gastrointestinal, a glândula adrenal e a pele. Apesar de diferentes estudos mostrarem variações quanto aos locais mais afetados pela doença, acredita-se que essas variações podem estar relacionadas a fatores sociais ou ambientais (SUNNETCIOGLU *et al.*, 2015).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da TBEP estão a infecção pelo HIV, os soropositivos tem risco cinco vezes maior do que indivíduos HIV negativos (JONES *et al.*, 1993); a raça/etnia, maior risco na população afro americana pode estar relacionado a maior exposição à TB, ao menor status socioeconômico e a falta de acesso a cuidados médicos (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2008); o gênero, ainda não está claro porque mulheres tentem a apresentar mais casos de TBEP mas, fatores hormonais, tabagismo e a exposição a TB podem ser as causas (HOLMES *et al.*, 1998); e a idade, foi demonstrado que pessoas de até 25 anos tem duas vezes mais chance de apresentar TBEP do que pacientes mais velhos (YANG *et al.*; 2004).

1.10 – Diagnóstico e Tratamento

A apresentação clínica clássica da TB não é específica e os sintomas coincidem com os de outras doenças como pneumonia, câncer de pulmão e sarcoidose, o que acarreta em atraso no diagnóstico feito pelo médico (STORLA, YIMER & BJUNE, 2008). A combinação de sintomas e achados de laboratoriais podem variar de respostas sistêmicas como febre, perda de peso e suores noturnos a consequências locais da infecção desde tosse e hemoptise na doença pulmonar até anormalidades sistêmicas tais como linfadenopatia torácica e cavidades e densidades pulmonares (BRANDLI, 1998).

A exposição ao Mtb pode ser verificada através da reatividade do hospedeiro a antígenos usando o teste de derivado proteico purificado (PPD), no qual o paciente é desafiado com uma injeção intradérmica (REICHMAN, 1979). O endurecimento resultante na pele, devido a reação de hipersensibilidade tardia, é medido em milímetros. Como o PPD é preparado a partir de um filtrado da cultura de Mtb, contém mais de 200 antígenos que também estão presentes na vacina atenuada de BCG e em micobactérias não tuberculosas do ambiente e, portanto, sua especificidade é limitada (RICHELDI, 2006). Como consequência, reações falso-positivas podem acontecer tanto em indivíduos vacinados (contabilizam mais de 3 bilhões de pessoas no mundo), e naqueles

sensibilizados por antígenos comuns através da exposição a micobactérias não tuberculosas (MNT) ambientais (VAN RHIJN *et al.*, 2009).

Técnicas de imagem podem ser usadas para aferir a extensão da doença e para monitorar o tratamento. A radiografia de tórax ajudou muito na redução da prevalência de TB na Europa e na América do Norte durante os anos 1950 e 1960, com unidades de radiografia móvel usadas para triagem em massa de comunidades. A introdução da radiografia digital melhorou a qualidade da imagem e facilitou o arquivamento e compartilhamento das imagens, caso seja requerida uma segunda opinião em local de acesso eletrônico remoto (JAEGER *et al.*, 2014). Tecnologias alternativas de imagem como a ressonância magnética, a tomografia computacional e a tomografia computacional de emissão de pósitron (PET-CT) podem ser úteis na investigação de TB extrapulmonar (BOMANJI *et al.*, 2015).

Em virtude dessa inespecificidade, novas alternativas têm sido buscadas para melhor discriminar indivíduos vacinados e indivíduos infectados. O ensaio de liberação de IFN- γ avalia a reatividade dos antígenos ESAT-6 e CFP-10, que não estão presentes na BCG e nem na maioria da MNT, em termos de produção de IFN- γ por células do sangue. A liberação de IFN- γ é medida através do ensaio de imunoabsorção enzimática (após incubação do sangue total) ou pela técnica *immunospot* (requer isolamento de células periféricas mononucleares do sangue) (O'GARRA, 2013).

Na TB pulmonar a indicação da presença de micobactéria é feita no escarro detectado por exame de microscopia (denominado teste de positividade do esfregaço). Ele possui sensibilidade variável entre 32% e 97%, dependendo da técnica utilizada, além de não distinguir entre micobactéria tuberculosa e não tuberculosa (STEINGART *et al.*, 2006). O diagnóstico, porém, requer o isolamento e a confirmação de Mtb na cultura, que requer até 6 semanas. A OMS aprovou a utilização do Xpert Mtb/RIF baseado no teste molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificar o DNA de Mtb em espécies clínicas e detectar resistência a rifampicina, o teste fornece resultado dentro de poucas horas (BOEHME *et al.*, 2010).

Para os pacientes com TB em que a cultura do escarro não seja possível (entre 30% a 50% dos casos) ou naqueles com a doença na forma extrapulmonar, são requeridos exames mais invasivos para coleta de amostra, como broncoscopia e biópsia (SCHOCH *et al.*, 2007). Para a coleta da amostra com suspeita de TB extrapulmonar o local vai depender de onde se suspeita que haja a doença. Tentativas de desenvolver testes baseados no sangue, urina e da exalação tiveram sucesso limitado, pois eles carecem de sensibilidade e de especificidade (STEINGART *et al.*, 2011).

O tratamento da doença demanda a utilização de vários medicamentos, usados para prevenir a seleção de bacilos mutantes resistentes a medicamentos dentro daquela população bacteriana. O período de tratamento é de no mínimo 6 meses, dividido em uma fase inicial mais intensa com o objetivo de matar o bacilo que se replica ativamente, seguido por uma fase de continuação que visa garantir a eliminação dos bacilos persistentes (FOX, ELLARD & MITCHISON, 1999). O tratamento inclui os medicamentos de primeira linha: isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida. O único marcador aceito para identificar se o tratamento está sendo efetivo é a conversão da cultura do escarro para negativo após 2 meses de tratamento. Contudo, radiografias do pulmão são comumente usadas para avaliar a resposta ao tratamento (MITCHISON, 1993).

Sem tratamento a taxa de mortalidade por TB é alta. Estudos de história natural da doença mostram que na ausência de tratamento com medicamentos anti-TB (avaliados antes do tratamento estar disponível) 70% dos indivíduos com exame de microscopia positivo para TB pulmonar morreram em 10 anos após o diagnóstico (OMS, 2018).

Caso o monitoramento do tratamento não seja efetivo a consequência pode ser o desenvolvimento e o crescimento de tuberculose multirresistente (MDR-TB) e de extensivamente resistente a medicamentos (XDR-TB), que são atribuídas principalmente a não adesão ao tratamento ou ao tratamento não apropriado. Este risco tem impacto negativo no controle mundial de TB e prejudica o monitoramento da eficácia do tratamento de novos medicamentos mal utilizados (O'GARRA *et al.*, 2013). Na MDR-TB o paciente é resistente a rifampicina e a isoniazida, dois dos medicamentos mais eficazes contra a TB, o tratamento requer medicamentos de segunda linha (como as fluoroquinolonas).

Nos casos de XDR-TB o tratamento também requer antibióticos de segunda linha, pois além da resistência a pelo menos um medicamento das duas classes mais importantes utilizadas no tratamento da TB, são também resistentes a quaisquer fluoroquinolonas e a pelo menos um dos agentes injetáveis de segunda linha (amicacina, capreomicina ou canamicina). As taxas de sucesso do tratamento são de 83% nos casos de pacientes acometidos por TB, 78% nos pacientes de TB associado ao HIV, 54% em pacientes MDR-TB e de 30% nos XDR-TB (OMS, 2017)

A vacina BCG, desenvolvida há quase 100 anos, previne casos severos de TB infantil, porém ela não é efetiva na prevenção da doença em adultos, tanto antes como após à exposição a infecção com TB. Por conferir proteção na infância, acredita-se que seja uma boa estratégia fazer um reforço em adolescentes ou em jovens adultos que poderia prevenir a progressão da forma pulmonar da TB. Existem 12 vacinas anti-TB nas fases I, II ou III de teste clínico (OMS, 2017). Como grande parte da população em países com endemia de TB já apresenta a infecção latente, o candidato a vacina que provavelmente terá maior impacto na transmissão deveria ser aquele que atue antes e durante a infecção latente por tuberculose (KAUFMANN, EVANS & HANEKOM, 2015).

1.11 – Mecanismos de evasão da resposta imunológica

Macrófagos alveolares contém diversos mecanismos antimicrobianos, porém a bactéria *Mtb* tem a capacidade de evadir e/ou tolerar alguns destes mecanismos, e o resultado dependerá da capacidade intrínseca microbicida do hospedeiro e de fatores de virulência do bacilo fagocitado (GOLDBERG, SAINI & PORCELLI, 2013).

O destino da micobactéria intracelular pode ser influenciado pela autofagia, processo no qual os componentes do citoplasma, incluindo organelas e patógenos intracelulares, são sequestrados no autofagossoma e levados ao lisossomo para degradação (COLOMBO, GUTIERREZ & ROMANO, 2006). *Mtb* consegue evadir da autofagia inibindo a fusão de autofagossomas com lisossomos através da secreção de proteínas do EXS-1 (ROMAGNOLI *et al.*, 2012).

A persistência intracelular da micobactéria patogênica se dá pela sua capacidade de explorar o tráfico vesicular e de modificar as funções celulares do hospedeiro. Dessa forma, após a fagocitose, Mtb pode bloquear a acidificação do fagossoma, assim como a aquisição de enzimas hidrolíticas e de peptídeos antimicrobianos. A retenção de marcadores endossomais iniciais, como o Rab5 guanosinotri-fosfatase (GTPase), a transferrina e seu receptor, e a não acidificação abaixo de pH 6.2 devido a exclusão da bomba vacuolar de prótons adenosinotri-fosfatase (ATPase) indicam impedimento na fase inicial do processo de maturação do conteúdo endossomal-lisossomal (RUSSEL, 2005).

A cápsula da micobactéria patogênica, compartimento mais externo do envelope celular que consiste de uma mistura de polissacarídeos, proteínas e lipídeos, participa da resistência passiva do bacilo às defesas do hospedeiro. Domínios ricos em lipídeos associados ao ácido micólico, compostos por substâncias inerentemente resistentes à degradação por enzimas do hospedeiro, ou devido a sua impermeabilidade, limitam o acesso de agentes do hospedeiro às estruturas que de outra forma seriam susceptíveis (DAFFE & ETIENNE, 1999). Os fatores de virulência envolvidos no bloqueio da maturação fagossomal são a LAM e a tirosina fosfatase secretada (PtpA) (WONG & JACOBS, 2011). Existem duas hipóteses de mecanismos possivelmente relacionados a inibição da fusão fagolisossomal. Uma delas consiste em uma influência ativa da bactéria nas células, inclusive na exclusão da próton ATPase do fagossoma no estágio inicial endossomal. A outra propõe um defeito na maturação do fagossoma: micobactérias viáveis constituem de partes não digeríveis com características de superfície e de um tamanho que fecham a posição da membrana do fagossoma e, conseqüentemente, impedem a formação do túbulo da membrana requerido para o tráfico vesicular e maturação (AXELROD *et al.*, 2008).

Para escapar do reconhecimento de receptores da resposta inata, bactérias patogênicas fazem a encapsulação, cobrindo a superfície da bactéria com proteínas do hospedeiro; variam as estruturas moleculares da parede celular, etc. desta forma elas conseguem sobreviver e se multiplicar dentro de fagócitos após o engolfamento (TISCHLER & MCKINNEY, 2011). Para reduzir as respostas inflamatórias, patógenos inibem a produção de citocinas pró-

inflamatórias e secretam suas próprias proteases para degradar componentes do complemento, interleucinas, interferons, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (GARIB & RIZOPULU, 2012).

Quando se trata da inibição da atividade de células dendríticas, o bacilo de Mtb estimula ativações simultâneas de TLR e a inibição do receptor DC-SIGN, resultando na produção de grande quantidade de IL-10 por estas células. A ligação de ManLAM à célula dendrítica inicia uma complexa cascata de sinalização que ativa Raf1 serina/treonina quinase, que por sua vez, induz a fosforilação da subunidade p65 do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B). No núcleo da célula o NF- κ B promove a regulação positiva de longa duração da transcrição de IL-10. Esta interleucina tem atividade anti-inflamatória, e está envolvida na inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias (ZHANG *et al.*, 2010).

1.12 – Matriz Extracelular

Nos tecidos, as células aderem fortemente umas às outras e a matriz em sua volta, de modo a preservar a integridade tissular e a arquitetura dimensional. Essas interações celulares fortificam a percepção de topografia extracelular e a adaptações a mudanças no ambiente. Manter a arquitetura normal tissular é primordial para a função apropriada do tecido e fisiologia, e ainda para outras funções celulares importantes que também estão ligadas a adesão celular incluindo a proliferação, a motilidade, a migração e a apoptose (BROOKS *et al.*, 2010).

A matriz extracelular (MEC) é um material conectivo secretado por células que suporta um aglomerado de proteínas especializadas de famílias fibrosas, incluindo fibronectinas, lamininas, colágenos, proteoglicanos e tenacinas. Elas não são simples fornecedoras de barreira estrutural para os tecidos, órgãos e células, mas também participam ativamente de mecanismos celulares importantes como a proliferação ou repressão do ciclo celular, motilidade ou imobilidade, sobrevivência ou apoptose (KADLER, HILL & CANTY-LAIRD, 2008). Em condições fisiológicas, interações ausentes ou deficientes entre a matriz e as células estimula a morte celular do tipo *anoikis*, uma apoptose

induzida por perda de adesão. Interações de adesão entre as células, sua MEC e o microambiente são bidirecionais, uma troca de informações é realizada por receptores e ligantes seguido pelo recrutamento de proteínas do citoesqueleto, ativação de cromatina nuclear e finalmente resultando na alteração da expressão genética que por sua vez influencia o microambiente (NELSON & BISSEL, 2006).

A MEC também pode ser considerada um reservatório de fatores de crescimento inativos e de outras moléculas bioativas ocultas que são liberadas após a degradação da matriz. Quando os fatores de crescimento são liberados da matriz eles iniciam a sinalização para seus receptores. Fatores de crescimento são componentes essenciais da MEC e tem papel na contribuição da homeostase do tecido. Proteínas da MEC também possuem domínios tipo fatores de crescimento, que após a degradação proteolítica se tornam solúveis podendo se ligar a seus receptores cognatos induzindo sua ativação. Além disso, a MEC contém fragmentos gerados da clivagem de colágenos que agem com inibidores angiogênicos (GARAMSZEGLI *et al.*, 2010).

Fibrilas de colágeno, especificamente os colágenos tipo I, III e IV, são os componentes majoritários na estrutura do pulmão. As fibrilas de colágeno tipo I e III são altamente resistentes as atividades enzimáticas e podem ser degradadas apenas por proteases específicas. O processo de clivagem do colágeno deve envolver enzimas hidrolíticas, como proteases, nucleases e lipases. A infecção por Mtb estimula o recrutamento de leucócitos e a ativação de redes intercelulares, que resultam em danos, como a destruição tissular e a cavitação. Várias vias regulatórias são ativadas durante este processo, tendo como efetores finais as enzimas hidrolíticas e, em particular, as metaloproteinases de matriz (ONG, ELKINGTON & FRIEDLAND, 2014).

1.13 – Metaloproteinases de matriz

O grupo de metaloproteinases inclui, dentre outras, as metaloproteinases de matriz (MMPs), as astacinas (que engloba as meprinases), e as adamalinas (onde estão as ADAMs e as ADAMs com motivo trombospondina - ADAMTSs). Elas são endopeptidases e sua função principal é o remodelamento tissular por degradação proteolítica seletiva. Elas

compreendem 25 membros da família de proteases que dependem de zinco, das quais 24 estão presentes nos genes de humanos. Além disso, 22 genes de ADAMs (dos quais 12 codificam proteínas com atividade proteolítica) foram identificados em humanos. Elas compartilham domínios estruturais, mas diferem na especificidade, nas fontes celulares e na regulação. MMPs são subdivididas com base na especificidade aos seus substratos como colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisina e elastase (KHOKHA, MURTHY & WEISS, 2013). Também podem ser classificadas quanto a sua localização celular em secretadas ou ancoradas na superfície celular, na última a atividade catalítica é limitada ao ambiente pericelular imediato. (SOSLAU *et al.*, 2014).

MMPs consistem tipicamente de 4 domínios. O domínio pró-peptídeo tem aproximadamente 80 aminoácidos de comprimento e com motivo de desvio cisteína. Depois o domínio catalítico tem aproximadamente 170 aminoácidos de comprimento. Esta região contém 2 íons zinco (um catalítico e um estrutural) que coordenado ao motivo de ligação ao zinco HEXXHXXGXXH. O domínio catalítico também inclui uma estrutura de 8 resíduos, após o íon catalítico, que o estabiliza. O resíduo cisteína no domínio pró-peptídeo interage com o íon zinco catalítico, que previne sua associação com a molécula de água, e assim inativa a MMP até que o domínio pró-peptídeo seja removido. A terceira subunidade da MMP é a região ligante de comprimento variável. Por último está o domínio hemopexina de aproximadamente 200 aminoácidos de comprimento. Esta região forma uma estrutura de lâmina da hélice e, dentre outras funções, confere a especificidade do substrato à MMP. Alguns membros da família das MMPs possuem pequenas diferenças na organização de suas subunidades; por exemplo, a MMP-2 e a MMP-9 contém 3 repetições do motivo tipo fibronectina que se liga à gelatina. A MMP-23 tem uma região única rica em cisteína e um domínio tipo imunoglobulina no lugar do domínio de hemopexina. MMPs tipo membrana (MT-MMPs) contém um domínio transmembrana ou uma ancora glicosilfosfatidilinositol (KHOKHA, MURPHY & WEISS, 2013) (Figura 6).

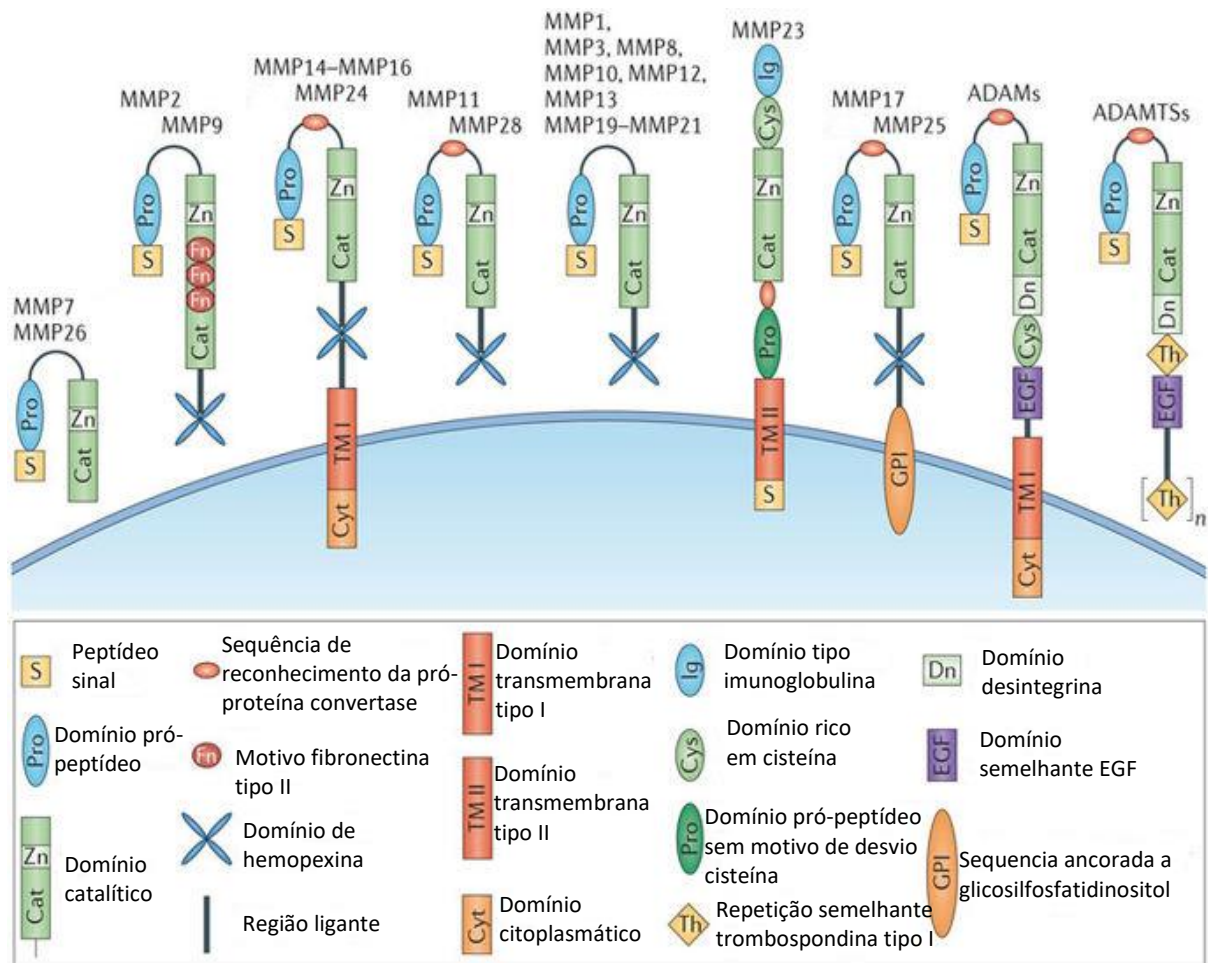


Figura 6: Diferença estrutural entre os subgrupos de metaloproteínas de matriz. Traduzido de KHOKHA, MURTHY & WEISS, 2013

As metaloproteínas e desintegrinas (ADAMs) fazem parte da subfamília adamalisina. A organização das subunidades das ADAMs é muito similar à das MT-MMPs com poucas diferenças específicas: no lugar do domínio de hemopexina, a ADAM contém uma região rica em cisteína, uma série de repetições tipo fator de crescimento epidermal (EGF) e um domínio desintegrina. Esses domínios adicionais conferem a habilidade de interagir com substratos nas células vizinhas (KHOKHA, MURTHY & WEISS, 2013).

A atividade catalítica de MMPs é regulada por quatro pontos principais: expressão genética, compartimentalização (como no ambiente pericelular imediato), ativação da pró-enzima (ou zimogênio) e inativação da enzima. A atividade da MMP também é controlada pela disponibilidade do substrato e afinidade. As proteases agem clivando pequenos fragmentos de citocinas, quimiocinas e de fatores de crescimento com a finalidade de alterar seus estados bioativos e seus locais de entrega. Após a clivagem do receptor pela MMP, a

proteólise pela γ -secretase intramembrana (membro das ADAMs) pode liberar o domínio intracelular para translocação ao núcleo de forma a alterar o promotor gênico. A atividade de MMPs proporciona uma regulação pós-translacional única para transmissão de sinais cruciais. Dentre os estímulos externos que induzem a transcrição de MMPs estão ésteres forbol, sinais dirigidos por integrinas, componentes da MEC, fatores de crescimento, citocinas e PAMPS (CLARK *et al.*, 2008).

1.14 – Inibidores e Indutores de metaloproteinase de matriz

Sabendo do seu potencial com efeitos na estrutura e bioquímica em larga escala no microambiente, MMPs necessitam de regulação fina para homeostase tissular (CHERNOV & STROGIN, 2011). Quando estão livres no plasma, as MMPs são capturadas e inibidas pela protease inibidora α_2 -macroglobulina secretada pelo fígado, enquanto que as MMPs extracelulares ou tissulares são reguladas pelos inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs), que se ligam de forma não covalente 1:1 para inativa-las. Existem quatro membros de TIMPs, o TIMP-1, -2, -3 e -4. Eles também têm papel no desenvolvimento de fibrose, que é uma característica da cura da infecção por TB (NAGASE, VISSE & MURPHY, 2006).

Cada um dos domínios N- e C-terminal contém seis resíduos de cisteína que formam três laços dissulfeto. A região N-terminal se liga ao domínio catalítico da MMP e assim inibe a sua atividade, enquanto a região C-terminal interage com a pró-forma de MMP-2 e de MMP-9 no domínio hemopexina C-terminal para estabilizar o complexo inibidor da pró-enzima. TIMP-2 é o único membro da família que interage especificamente com a superfície celular tanto de MT1-MMP como de pró-MMP facilitando a ativação de pró-MMP-2. Assim, o TIMP-2 é o único que funciona como inibidor e como ativador de MMP (HERNANDES-BARRANTES *et al.*, 2000).

Todas as MMPs podem ser inibidas por TIMPs, entretanto, não com a mesma eficácia. TIMP-1 inibe preferencialmente a MMP-7, a MMP-9, a MMP-1 e a MMP-3, já o TIMP-2 é mais efetivo como inibidor de MMP-2. TIMP-3 pode inibir a MMP-2 e a MMP-9, e também a maioria das ADAMs, e finalmente o TIMP-

4 inibe a MT1-MMP e a atividade catalítica da MMP-2. A função dos TIMPs é, portanto, regular a atividade proteolítica e todas as atividades mediadas pelas MMPs. Novas atividades biológicas de TIMPs têm sido relatadas atribuindo especificamente a configuração genética e proteica em vez de uma consequência de sua atividade inibitória de protease. Apesar de serem secretados como proteínas extracelulares, uma série de relatos identificou receptores celulares de TIMPs, sugerindo que essas moléculas modulam o comportamento celular de fora para dentro da célula (BOURBOULIA & STETLER-STEVENSON, 2010). O envolvimento de TIMPs em várias atividades biológicas tem sido relatado, incluindo na diferenciação celular, crescimento, migração, invasão, angiogênese e apoptose, e esses efeitos celulares são mediados independentemente da atividade de inibição de TIMPs em MMPs (BREW & NAGASE, 2010) (Figura 7).

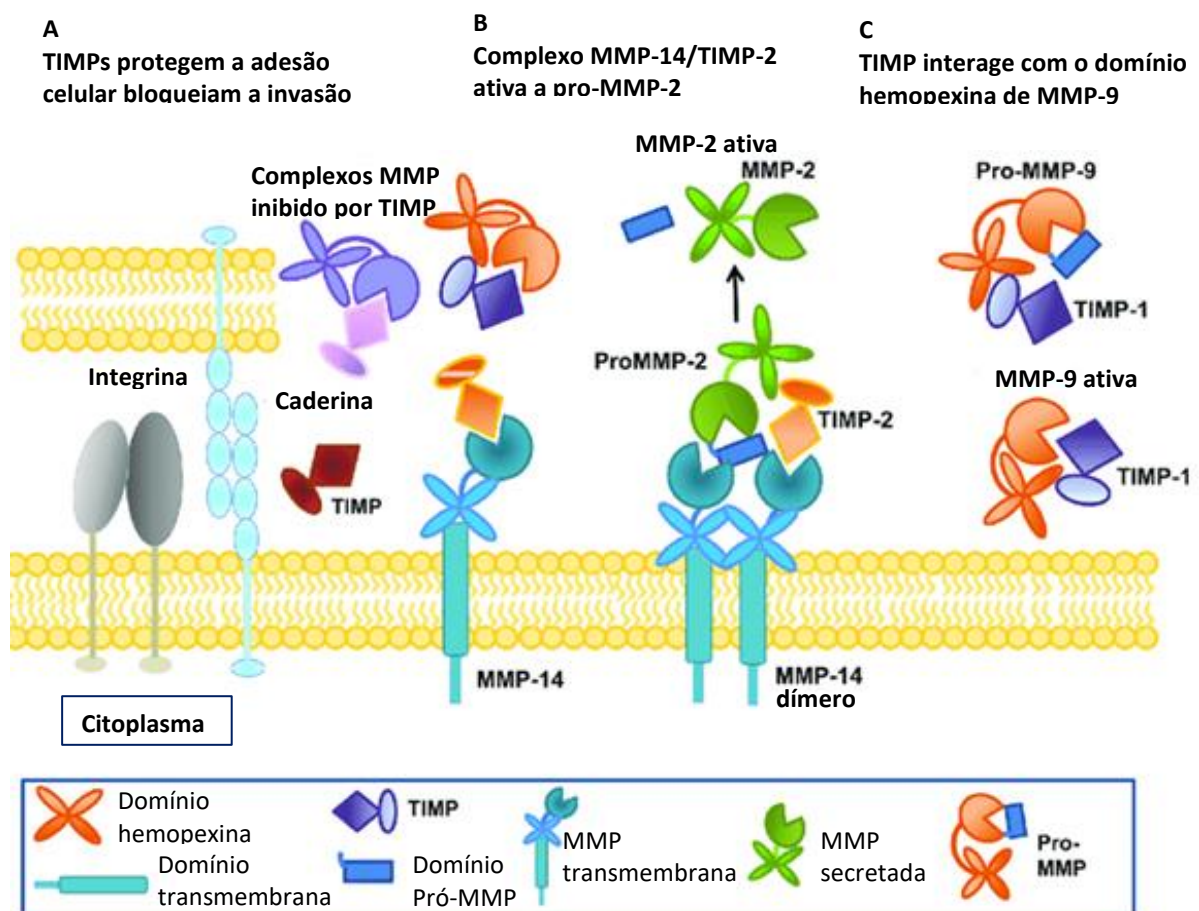


Figura 7: TIMPs na regulação da função e da ativação de MMPs. (A) TIMPs solúvel e associado a MEC formam interações inibitórias com domínios catalíticos de MMP transmembrana e extracelular, protegendo a adesão celular e bloqueando a invasão. (B) a forma dimérica transmembrana de MMP-14 forma um complexo receptor com TIMP-2 que é responsável pela

ativação de MMP-2; pró-MMP-2 é ligado pelo seu C-terminal domínio hemopexina, permitindo a proteólise do pró-domínio pela subunidade de MMP-14 não inibida. (C) TIMP-1 forma interações com o domínio C-terminal com o domínio hemopexina de pró-MMP-9 ou com MMP-9, protegendo a pró-MMP-9 da ativação e extinguindo a atividade após a ativação. Traduzido de Radisky, Raeeszadeh-Sarmazdeh & Radisky, 2017

Um fator de crescimento envolvido no remodelamento da MEC em patologias é o fator de crescimento transformador (TGF- β) ao promover a diferenciação de miofibroblastos, a proliferação celular e a produção de matriz (BIERNACKA, DOBACZEWSKI & FRANGOGIANNIS, 2011). Ligantes extracelulares de TGF- β se ligam ao receptor serino/treonina quinase e ativam vias que induzem a expressão de genes de colágeno e de fibronectina. Simultaneamente, a sinalização de TGF- β inibe a degradação da MEC pelas MMPs ao induzir a expressão de inibidores de MMPs a impulsionar o enrijecimento do microambiente (EDWARDS *et al.*, 1987).

O estímulo para produção de MMPs é induzido pela indutora de metaloproteinase de matriz extracelular (EMMPRIN), também chamada de CD147, basigina e de HAb18G. CD147 é uma proteína transmembrana de cadeia única tipo I membro da superfamília das imunoglobulinas (IgSF) (HAHN, KAUSHIK & YONG, 2015). A molécula possui 4 isoformas que diferem entre si apenas no domínio extracelular. A região da volta C-terminal da isoforma 2 (EC2) apresenta homologia à região variável (V) das imunoglobulinas e também pela cadeia β de MHC-II. A sequência da proteína mostra graus variáveis de conservação entre diversas espécies, especialmente nos domínios extracelulares, mas a sequência ligante entre os domínios tipo Ig, os resíduos cisteína, os locais de glicosilação de asparagina, o domínio transmembrana e o domínio citoplasmático, demonstram forte homologia (MURAMATSU & MIYAUCHI, 2003). CD147 é composto por uma cadeia de 269 aminoácidos, com peso molecular aproximado de 27KDa e na sua forma glicosilada o peso varia entre 43-66KDa. Os padrões de glicosilação variam nos diferentes órgãos ou tipos celulares, provavelmente este seja o motivo de possuir funções fisiológicas diversas (BAI *et al.*, 2014).

Tem-se demonstrado que o domínio EC1 de CD147 é importante na indução de MT1-MMP e MT2-MMP, MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, na

oligomerização, na ligação de integrinas e provável de CD98 (glicoproteína transmembrana envolvida na adesão e no transporte de aminoácidos) (YURCHENCO *et al.*, 2010).

Expresso por muitos tipos celulares em níveis variados, incluindo células hematopoiéticas, epiteliais, endoteliais, em todos os tipos de leucócitos (monócitos, granulócitos e linfócitos), em eritrócitos e plaquetas. CD147 tem a expressão aumentada durante o processo de desenvolvimento, na cura de feridas, no transporte de nutrientes, na inflamação, na aterosclerose, na artrite, no câncer e em patologias microbianas (HAHN, KAUSHIK & YONG, 2015).

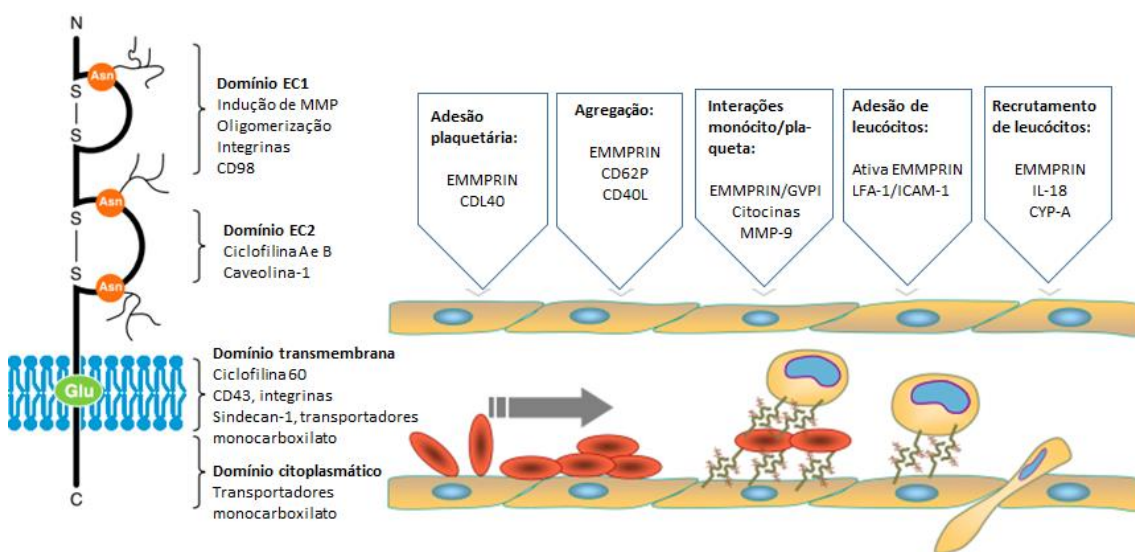


Figura 8: A sinalização de CD147 está envolvida na adesão plaquetária, na agregação e na interação monócito/plaqueta, assim como na adesão e no recrutamento leucocitário. Traduzido de Hahn, Kaushik & Yong e Joghetaei *et al.*, 2013

Inicialmente caracterizado como indutor de MMPs, o CD147 possui múltiplas funções em outros tipos celulares, como nos linfócitos T. Quando este está ativado na presença de níveis elevados de CD147, ele desenvolve ações positivas/indutoras como migração, indução de MMP, adesão e metabolismo energético. A indução de MMP é necessária para que linfócitos T atravessem a membrana basal facilitando a invasão do tecido através do contato com fibroblastos ou outros substratos. Este receptor ainda tem papel no recrutamento de leucócitos para tecidos inflamados (GOETZL, BANDA & LEPPERT, 1996). Acredita-se que o CD147 influencie na habilidade de adesão de integrinas de linfócitos T, $\alpha 4\beta 1$ e LFA-1, importantes na apresentação de antígenos e na adesão de linfócitos T a células endoteliais após a entrada em locais de

inflamação. A oligomerização de CD147 é importante no aumento de interações de avidéz de CD147 com outras moléculas e com ela mesma para variados propósitos funcionais (AGRAWAL *et al.*, 2013).

1.15- MMPs como alvo da Terapia Adjunta da TB

Como a patologia pulmonar associada a TB ocorre principalmente devido a resposta imune do hospedeiro, há uma função em potencial para a terapia de imunomodulação direcionada na redução da patologia pulmonar e prevenção de sequelas associadas a ela. A terapia de imunomodulação ideal precisa ser eficiente, ter um bom perfil de segurança com poucos ou nenhum efeito adverso, não

requerer administração frequente e ser acessível, de fácil disponibilidade transporte em países de poucos recursos onde ocorre a maioria dos casos de TB, principalmente nas fases da doença avançada, quando a atividade excessiva de MMP começa a contribuir com a patologia pulmonar, levando a necrose e a formação das cavidades. (ONG, ELKINGTON & FRIEDLAND, 2014).

O ácido para-acetil-salicílico (PAS), isômero do ácido acetil-salicílico, foi usado para tratar TB por mais de 60 anos apesar de seu efeito na inibição do crescimento de TB em cultura não ter sido confirmado. Estudos mais recentes demonstram que o PAS promoveu a produção e o acúmulo de PGE2 no foco da infecção acarretando na supressão da secreção de MMP-1 (RAND *et al.*, 2009). Estes dados sugerem que o PAS, atualmente usado como tratamento de segunda linha reservado a pacientes com TB-droga resistente, pode representar um exemplo de uso imunomodulador para reduzir a destruição tissular na TB.

Outro fármaco indicado para a terapia adjuvante da TB devido ao seu efeito imunomodulador é o anti-inflamatório esteroide dexametasona. O uso da dexametasona, que age através de efeitos imunossupressores por inibição do recrutamento e da proliferação de linfócitos, é restrito para formas mais graves da doença, como na meningite tuberculosa, onde este mostrou benefícios na redução da mortalidade dos pacientes (THWAITES *et al.*, 2004). Uso da dexametazona reduziu as concentrações de MMP-9 no fluido cerebrospinal,

sem afetar citocinas ou quimiocinas, contribuindo ao efeito terapêutico (SIMMONS *et al.*, 2005).

Na busca de antibióticos mais capazes de inibir o crescimento da micobactéria foi demonstrado que alguns antibióticos de amplo espectro, como as tetraciclina, apresentam atividade contra micobactérias também. A função antimicrobiana das tetraciclina foi atribuída a ligação da subunidade ribossomal 30S próximo ao local A e a subsequente inibição da síntese proteica ao evitar a ancoragem de t-RNA aminoacilado. Para exercerem sua função as MMPs requerem o cofator zinco (Zn^{2+}), que é o alvo primário das tetraciclina. As tetraciclina não somente quelam o íon Zn para inibir a atividade de MMPs, como também se acredita que elas afetam a sua expressão e ativação proteolítica (HIDALGO & ECKHARDT, 2001). A doxiciclina é um antibiótico tetraciclina e é o único inibidor de MMP licenciado para uso nos Estados Unidos. Ela tem sido usada em doses sub-antimicrobianas para reduzir a concentração de collagenase em doenças periodontais (GAPSKI *et al.*, 2009). Estudos indicam que a doxiciclina causa a inibição de fosfolipase A2, a inibição da expressão, assim como a degradação acelerada da enzima óxido nítrico sintase, a inibição da atividade patológica de metaloproteinases de matriz e a eliminação de radicais livres (GU *et al.*, 2012). Seu uso tem demonstrado melhora na função pulmonar na doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) (DALVI *et al.*, 2011) e em pacientes com asma quando adicionada à terapia padrão (BHATTACHARYYA *et al.*, 2010).

A possibilidade de utilização da doxiciclina no tratamento da TB pulmonar ainda está sob investigação. No modelo de infecção de porquinhos da Índia, a doxiciclina suprimiu a secreção de MMPs por macrófagos e células epiteliais respiratórias infectadas por Mtb. Além disso, foi demonstrado que ela reduz a secreção de MMP-1 e -3 em macrófagos humanos e inibe o crescimento de Mtb *in vitro* e *in vivo* (WALKER *et al.*, 2012). Consequentemente, a doxiciclina pode ter potencial como novo agente adjuvante para ser administrada em terapias padrão da TB tendo duas ações benéficas, inibindo a expressão de MMP e limitando a proliferação micobacteriana. Ela é de baixo custo e amplamente disponível em situações de poucos recursos, apesar de apresentar efeitos adversos que proíbem seu uso em crianças (ONG, ELKINGTON & FRIEDLAND,

2013). Entretanto, os efeitos benéficos do uso da doxiciclina na TB ainda devem ser estabelecidos em testes clínicos padronizados. Em 2017, em Cingapura, foi realizado um teste clínico de fase 2, onde a doxiciclina foi utilizada no tratamento de TB de pacientes em combinação a antibióticos anti-TB de primeira linha (Clinicaltrials.gov identificador: NCT02774993), porém os resultados ainda não foram divulgados.

Tetraciclinas modificadas estão em desenvolvimento para investigar suas atividades inibitórias de MMP, e algumas tem demonstrado resultados promissores. Como por exemplo o composto COL-3, que possui uma estrutura sem substituintes no carbono 4-9, tem mostrado potente inibição de MMPs e está em testes pré-clínicos. Estes fatos demonstram que as tetraciclinas são mais do que simples antimicrobianos (ZAKERI & WRIGHT, 2008). A ligação de tetraciclinas a MMPs ocorre pela ação quelante de íons Zn^{2+} estruturais e catalíticos da enzima MMP. A relativa superioridade da doxiciclina como inibidora de MMPs, em comparação a tetraciclinas e minociclina é resultado de sua maior afinidade ao Zn^{2+} (PRESHAW, 2000).

Além das tetraciclinas, uma variedade dos novos inibidores de MMPs de amplo espectro ou específicos para algumas MMP foram testados *in vitro* e em testes de modelos animais. Os inibidores de amplo espectro, como o Batimastat (BB-94) e Marimastat (BB-2516) são drogas que mimetizam o colágeno e se ligam ao átomo de zinco em várias MMPs, inibindo a atividade das proteases. As primeiras tentativas em utilizar estes inibidores para a redução da patologia foram realizadas no modelo de tecido pulmonar *in vitro*, utilizando células humanas para obter granulomas, que foram infectadas pela cepa H37Rv (PARASA *et al.*, 2017). Os autores observaram redução no número e no tamanho de granulomas e no número de bactérias no granuloma. Estes dados correspondem ao estudo de Volkman *et al.*, 2010 com modelo de infecção de peixe-zebra por *M. marinum*, no qual o marimastat agiu na interrupção do recrutamento de macrófagos e na maturação de granulomas nascentes. Entretanto, estes modelos não reproduzem as lesões necróticas típicas da TB humana.

A utilização dos inibidores de MMPs (marimastat, batimastat, prinomastat e outros) em combinação com os medicamentos anti-TB de primeira linha

(isoniazida e rifampicina) no modelo de camundongos C57BL/6, infectados por *Mtb* Erdman (1000 CFU) ou tratados com partículas de matrigel cobertas por TDM para induzir a patologia necrótica, demonstrou um efeito anti-bacteriano cumulativo que foi associado a melhoria na patologia. Entretanto, a monoterapia utilizando os inibidores de MMPs não melhorou a patologia pulmonar, nem reduziu a carga bacteriana neste modelo (XU *et al.*, 2018).

A utilização dos inibidores de MMPs (cipemastat, inibidor de MMP-1, utilizado via gavagem oral) para o tratamento da TB mais severa em modelo de camundongos C3HEB/FeJ que reproduz a formação de cavidades pulmonares nos animais infectados, também não demonstrou o efeito terapêutico esperado (ORDONEZ *et al.*, 2018). Não foi observada a redução no número de unidades formadoras de colônias (CFU) nos grupos tratados pelo cipemastat e nos não tratados. Ao contrário do esperado, o tamanho da cavidade e a área de pneumonia subadjacente aumentou, demonstrando que a patologia nos animais tratados com inibidores de MMP piorou. Da mesma forma, a utilização do cipemastat no modelo da TB em coelhos, repetidamente infectados pelo 500 CFU *Mtb* para promover o desenvolvimento de cavidades no pulmão, não reduziu a destruição do tecido pulmonar (URBANOWSKI *et al.*, 2018). Em posterior análise dos mecanismos de formação de cavidades no pulmão, no modelo de coelhos e em pacientes humanos com TB, observou-se a importância da ação mecânica feita pelos movimentos do tecido pulmonar durante a respiração, além dos efeitos de MMPs e outras enzimas proteolíticas no local dos granulomas caseosos (IHMS *et al.*, 2018). Os autores sugerem que a inibição de MMPs não é suficiente para prevenir a formação de cavidades. A formação de cavidades sempre está associada a hiperinflamação e a presença de áreas necróticas no pulmão (na forma de granulomas caseosos ou pneumonia lipídica). O que sugere que a estratégia de terapias adjuntas com alvo em pacientes com TB cavitária deve incluir uma combinação de fármacos direcionados para a prevenção da necrose, utilizando tanto inibidores de MMPs, quanto outros fármacos com efeito anti-inflamatório.

2 – JUSTIFICATIVA

Os dados recentes, baseados na análise histopatológica de pulmões de pacientes com TB e de animais infectados, demonstram que a necrose intragranulomatosa, que é uma marca típica da TB humana, contribui para sobrevivência de *M. tuberculosis* em aglomerados extracelulares de bactérias capazes de formar biofilmes, aumentando a resistência da micobactéria à ação da resposta imunitária e de medicamentos anti-micobacterianos. Foi sugerida uma teoria de patogênese da TB baseada nestas observações (ORME, 2014). O estudo dos mecanismos de necroses celular e tecidual induzidos nos pulmões durante a TB é importante não somente para nosso entendimento da patogenia da TB, mas também para a geração de novas vacinas e medicamentos terapêuticos.

A infecção de camundongos é o modelo mais utilizado para estudo da TB. Mas os ratos, diferentemente dos mamíferos de maior porte, não desenvolvem nem necrose nem cavernas no pulmão, assim, nem todas as manifestações patológicas da TB humana são reproduzidas, o que limita sua utilização para a pesquisa. Resultados do trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstram que a virulência da cepa Mtb utilizada para infecção é um dos principais fatores que determinam da gravidade da patologia, e as cepas de Mtb hipervirulentas isoladas de pacientes com TB, diferentemente das cepas laboratoriais largamente utilizadas, induzem nos camundongos uma patologia mais severa, incluindo a necrose pulmonar. O desafio atual é estudar os mecanismos patogênicos que determinam a necrose pulmonar. Neste sentido, o papel dos fatores que podem contribuir diretamente para a necrose do granuloma e do tecido pulmonar deve ser estudado como alvo potencial para intervenções terapêuticas. Entre estes fatores, o papel de neutrófilos recrutados para o pulmão e de metaloproteinases de matriz produzidas por neutrófilos e por outras células. Neste trabalho, pretendemos utilizar um modelo de infecção intratraqueal de camundongos da linhagem C57BL/6 inoculados por cepa Mtb hipervirulenta, de modo a compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos nos danos tissulares provocados pela infecção por Mtb hipervirulenta podendo contribuir para identificar possíveis alvos de tratamento e novas abordagens terapêuticas.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Investigar o papel de leucócitos inflamatórios, das metaloproteinases de matriz, assim como de seus indutores na patogenia da tuberculose induzida nos camundongos por cepas hipervirulentas de *M. tuberculosis* com o objetivo de desenvolver um do modelo da TB experimental mais parecido com a TB humana.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- Estudar a produção de gelatinases, MMP-2 e MMP-9, e colagenase, MMP-8, e suas atividades no pulmão, utilizando ensaios imunohistoquímicos e zimografias, e no sobrenadante do tecido pulmonar e no lavado bronco alveolar (zimografias);

3.2.2- Avaliar efeitos da imunodepleção de neutrófilos e a inibição de MMPs por inibidores farmacológicos no caráter da patologia pulmonar com objetivo de intervenção terapêutica (inibição da necrose). Avaliar os efeitos do tratamento na carga bacteriana no pulmão e a sobrevivência dos camundongos.

3.2.3- Estudar o perfil de células recrutadas ao pulmão e o caráter da morte dessas células *in situ*, utilizando métodos de citometria de fluxo e de imunohistoquímica;

3.2.4- Investigar a patogenia da TB nos camundongos C57BL/6 infectados por cepa de Mtb hipervirulenta com foco na necrose celular e tecidual observada nos pulmões;

3.2.5- Investigar os mecanismos patogênicos celulares e moleculares que determinam o desenvolvimento da necrose pulmonar, com foco no papel dos neutrófilos, na produção de metaloproteinases de matriz e de seus indutores (CD147);

3.2.6- Quantificar leucócitos mielóides recrutados ao pulmão após a infecção e com os respectivos tratamentos

4- METODOLOGIA

4.1- Micobactérias

Nos experimentos foram utilizadas as cepas Mtb já caracterizadas nos trabalhos anteriores (LASUNSKAIA *et al.*, 2010, ANDRADE *et al.*, 2012, RIBEIRO, 2014). A cepa hipervirulenta M299 e cepa laboratorial H37Rv foram descongeladas e crescidas em meio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 e 10% de suplemento albumina, dextrose, catalase (ADC) (BD Sparks, MD). Após 7 dias de cultivo, as culturas em suspensão foram agitadas no vórtex (BIOMATIC) e sonicadas em banho ultrassom (Ultrasonic Maxi Cleaner 800-UNIQUE) por 1 min para separação dos grumos de micobactéria. O ajuste de concentração de micobactérias utilizadas nos experimentos foi feito através de leitura prévia de 1 mL de meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 em espectrofotômetro (AJMicronal) a 600 nm, após passagem no ultrassom. Em seguida, as culturas foram diluídas para obter a concentração desejada obedecendo-se o critério de relação da densidade óptica (DO) *versus* número de bacilos, previamente estabelecido em teste de CFU (descrito no item 4.8) para cepas de Mtb, sendo que DO 0,200 corresponde a 2×10^7 bacilos/mL. Todos os procedimentos com Mtb foram realizados no fluxo laminar A2 na sala de biossegurança nível 3 (NB3).

4.2- Animais

Os camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro UENF e mantidos em microisoladores (estantes ventiladas) no Biotério do Laboratório NB3 da UENF em ambiente climatizado com temperatura controlada 25°C. Em cada gaiola ficaram no máximo 05 animais da mesma idade e gênero para minimizar o estresse. Os animais receberam ração autoclavada e água filtrada em bebedouros.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Pesquisa em Animais de Laboratório e de Biossegurança do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da UENF (protocolos nº 198 do ano de 2012 e nº 350 do ano de 2017).

4.3- Anticorpos e reagentes

Anticorpos anti-MMP-2 (MMP-2, H-76 IgG de coelho, sc-10736), anti-MMP-9 (MMP-9 C-20, IgG de cabra SC-6840), anti-MMP-8 (MMP-8, M-20 IgG de cabra sc-8848), anti-CD147 (EMMPRIM T-18, IgG de cabra sc-9756) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology e utilizados em testes de IHC. Anticorpos da Abcam utilizados nos ensaios de *Western blotting* foram os seguintes: anti-MMP-8 policlonal de coelho (ab53017, lot: GR38794-26), anti-MMP-9 monoclonal de camundongo (ab58803, lot: GR3212138-1). Os anticorpos secundários utilizados foram: soro de cabra anti-IgG de coelho (sc-2004) e soro de cabra anti-IgG de camundongo (sc-2005) e soro de coelho anti-IgG de cabra (sc-2922) da Santa Cruz Biotechnology.

4.4- Infecção e tratamentos experimentais dos animais

Os camundongos C57BL/6 WT foram anestesiados com uma solução de Anazedan – xilazina (15 mg/kg - Vetbrands) e Dopalen – ketamina (110 mg/kg - Vetbrands), via intraperitoneal e submetidos a injeção intratraqueal de Mtb. Após uma pequena incisão da pele, a traqueia foi exposta para receber 60 μ L da suspensão bacteriana (10^2 bacilos) utilizando seringa para injeções da insulina de 1 mL. Os animais controles receberam 60 μ L de PBS estéril. Após a injeção, a pele foi suturada com um ponto de sutura utilizando linha cirúrgica estéril.

Após 14 dias da infecção os animais foram separados em grupos para receberem os tratamentos com os fármacos doxiciclina e com 2'2-bipiridina por 14 dias de tratamento. Para inibição de MMPs foram utilizados Hiclato de doxiciclina (D9891 – 1G) da Sigma-Aldrich, 2'2-bipiridina (cedida pelo prof. Mário Sérgio Schultz da UFRJ *campus* Macaé). Os fármacos foram diluídos em água (50 mg/mL) e administrados diariamente via intraperitoneal (i.p), sendo cada dose administrada nos camundongos de 40mg/kg.

Para imunodepleção de leucócitos Gr-1+ (neutrófilos e monócitos inflamatórios) dos camundongos infectados foram utilizados anticorpos monoclonais anti-Gr-1 (Ly6G/C) murino (hibridoma 2H5, doação da prof. Chalil),

que foram inoculados em dias alternados a partir do 14^o dpi por via i/p 200 µg/mL (ESCOCARD *et al.*, 2006).

Os animais de todos os grupos foram monitorados diariamente para sinais de morbidade. Nos dias 0, 14, 21 e 28, os animais foram pesados para estimar peso corporal. Após 28 dias de infecção, os animais infectados foram eutanasiados por inalação de CO₂. Os pulmões, baço e fígado foram retirados e pesados. Para testes histológicos, o lóbulo superior direito dos pulmões dos camundongos infectados e não infectados (controle) foram retirados e fixados em formol a 10%. O lóbulo superior esquerdo, e em alguns experimentos o baço e fígado, foram pesados e homogeneizados para extração de micobactérias e sua quantificação em teste CFU. Para a coleta de células pulmonares ou homogeneização do tecido, os lóbulos pulmonares restantes foram utilizados.

4.5- Extração de células pulmonares para cultivo *ex vivo* e coleta do sobrenadante do meio de cultura

O isolamento das células destinadas para cultivo em cultura celular *ex vivo* e posterior quantificação das MMPs produzidas em meio de cultura foi realizado sem tratamento enzimático. Os lóbulos pulmonares foram cortados em pequenos fragmentos e transferidos para um tubo com meio RPMI (2 mL). O tecido foi dissociado com o auxílio de seringa de agulha de 10 mL, passando por suspensão por 10 vezes. Posteriormente peneirado a fim de separar as células do restante do tecido (sem a utilização de enzimas). Adicionou-se tampão de lise para eritrócitos. As células foram contadas utilizando a câmara de Neubauer, ressuspensas com meio de cultura RPMI com 10% de SFB (Gibco) e 0,5% de gentamicina, e plaqueadas a 5×10^5 células/mL por poço. A coleta do sobrenadante foi feita 48 h após o plaqueamento em placa de cultura de 24 poços. A coleta do sobrenadante de cultura foi feita após 48 h do cultivo em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. O sobrenadante coletado foi centrifugado em *ependorf* com filtro 0.22 µm, aliquoteado e congelado a -80°C.

4.6- Lavagem broncoalveolar

Após a eutanásia em câmara de CO₂ os animais receberam injeções intratraqueais de 500 µL de tampão fosfato-salino (PBS). A aspiração mecânica foi feita utilizando uma seringa conectada ao canal traqueal, sendo a mesma que instilou o líquido. O líquido é armazenado em gelo até que seja filtrado com filtro 0.22 µm, aliquoteado e congelado a -80° C.

4.7- Quantificação da atividade de MMPs através de ensaios de zimografia

Os ensaios de zimografia foram executados para determinar a atividade proteolítica das metaloproteinases. Os lavados broncoalveolares e/ou sobrenadantes das culturas celulares foram descongelados e analisados por zimografia. As amostras foram tratadas com tampão de amostra (água destilada, Tris HCl 1,0M, glicerol, SDS 10% e azul de bromofenol 1%) e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida de 8% com 0,1% de gelatina. Após a corrida, o gel foi lavado três vezes com tampão de lavagem (Tris-HCL 50 nM pH 7,5 e Triton x100 2,5%) e posteriormente incubado com tampão de incubação (Tris-HCL 50 nM pH 7,5, Triton x100 1%, CaCl₂ 10 mM, NaCl 150 mM e NaN₃ 10⁻¹ mg/mL) e deixado por 48 h na estufa a 37°C e 5% de CO₂ para que ocorra a ação lítica das MMPs. Depois, o gel foi corado por 1 h em agitação com o corante Coomassie Blue R-250 0,05%, em seguida, descorado e, finalmente, foi feita a análise densitométrica das bandas correspondentes a lise da gelatina. As imagens dos géis foram obtidas com o auxílio do programa *Molecular Image Gel Doc XR* com o *software Image Lab*.

4.8- Quantificação de Mtb em teste de CFU

Para quantificar micobactérias, as amostras (culturas de Mtb, homogenados de tecidos obtidos de camundongos infectados) foram submetidas ao ensaio de unidade formadora de colônia (CFU). Para extrair bactérias de tecidos, os órgãos (lobo superior esquerdo do pulmão, baço ou fígado) foram pesados e colocados em 2 mL do meio RPMI (Gibco, EUA). Os órgãos foram macerados com o auxílio de pinça curva e mantidos em gelo. A

seguir, os tecidos imersos foram dissociados utilizando seringas de 10 mL, por 10 ciclos de homogeneização. A seguir, as amostras foram filtradas em *cell strainer* (Corning, EUA). Após as diluições seriadas, 100 µL de cada diluição foram plaqueadas em meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 (DIFCO, Detroit, MI), enriquecido de 10% de suplemento OADC (oleato, albumina, dextrose, catalase da BD), em placas de Petri. O número de unidades formadoras de colônias foi avaliado após incubação a 37°C após 3 a 4 semanas.

4.9- Testes histológicos

4.9.1- Análise Histopatológica por coloração com Hematoxilina e Eosina

Os lóbulos pulmonares (superior e médio direito), o baço e o fígado foram removidos e fixados em formol 10% tamponado por 48 h, seccionados para aproveitar o máximo da área lesionada e, submetidos a fixação em formol por no mínimo 24 h. Após lavagem em água destilada, o material fixado foi passado por banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada, e posteriormente passado em 2 banhos de xilol por 1 h cada. O material foi emblocado em parafina e levado ao gelo. Os blocos rígidos foram cortados no micrótomo (Leica, Alemanha) numa espessura de 5 µm. Os cortes foram processados em baterias de xilol e álcool para serem preparados para coloração com hematoxilina (3 minutos) e eosina (1 minuto) - coloração HE- para análise de histopatologia.

4.9.2- Análise Histopatológica por coloração com Tricromáco de Masson

A coloração foi feita da seguinte forma: foi aplicada sobre os cortes a solução de Bouin e deixado *overnigth*. Após os cortes foram lavados em água corrente por 1 hora até retirar a cor amarela deixada pela solução de Bouin na amostra. Em seguida foram corados com Hematoxilina Férrica de Weigert por 10 minutos e lavados novamente em água corrente por 10 minutos e coloração com solução de Escarlata de Biebrich por 5 minutos. Foi feita mais uma lavagem com água destilada e uma nova coloração com solução de Ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico por 10 a 15 minutos. Em seguida, foi realizada uma lavagem com água destilada e aplicada solução de Azul de Anilina durante 5 a 10 minutos. As

amostras foram lavadas uma vez e colocadas em solução de 1% de ácido Acético Glacial por 3 a 5 minutos. As amostras sofreram mais uma lavagem com água destilada e foram banhadas em álcool (70%, 80%, 90% e 100%) por 1 minuto em cada concentração e em xilol por 3 minutos. Os cortes então sofreram fixação permanente com Permunt. Finalizada a técnica as fibras de colágeno adquirem coloração azulada.

4.9.3- Coloração pelo método de Ziehl Neelsen

Após posicionamento das lâminas em suporte metálico, a superfície do tecido foi coberta com solução de carbolfucsina de ZN, previamente filtrada. As lâminas foram aquecidas até emissão de vapor, por chama produzida com o auxílio de um chumaço de algodão embebido em álcool. Registrou-se o tempo de 5 minutos e voltou-se a aquecê-las por mais duas vezes. A descoloração iniciou após os 5 minutos, verteu-se a solução de fucsina e lavou-se cuidadosamente com jato d'água de baixa pressão até que a mesma fosse eliminada. Cobriu-se a superfície com solução álcool-ácida por 1 minuto, sendo então retirada sob jato d'água de baixa pressão. Repetiu-se a operação mais uma vez, rapidamente. A contra-coloração foi feita após recolocação das lâminas sobre o suporte, suas superfícies foram cobertas pela solução de azul de metileno por 30 segundos, após o qual foi eliminado sob jato d'água de baixa pressão. As lâminas foram secas à temperatura ambiente.

4.10- Análise de morfometria das lesões pulmonares (áreas de pneumonia e necrose pulmonar)

Para a morfometria foram utilizadas imagens do corte do tecido pulmonar corado por hematoxilina eosina (obtidos com aumento de 25X) de cada grupo de animais (n=8-10). As imagens foram capturadas com um Microscópio Zeiss Labophot 2 equipado com uma câmera digital colorida Olympus DP25 conectado a um sistema de imagem computadorizado com o software Axionvision (versão 4.6.3 Zeiss). A redução do espaço intra-alveolar aerado foi determinada como descrito pelo Neres *et al.* para quantificação do espaço intravascular na placenta (Neres *et al.*, 2008).

Utilizando o *software ImageJ* (NIH, EUA), as imagens foram transformadas em escala cinza (8-bit) e as áreas correspondentes ao espaço intra-alveolar aerado (branco) foram coloridas em vermelho. A redução de porcentagem da área intra-alveolar foi calculada com o uso da equação $(x-y) \times 100/x$, onde x e y correspondem as porcentagens de pixels demarcadas por vermelho nas imagens dos animais de grupos controles e infectados ou infectados e tratados.

As áreas totais de lesão pulmonar e a área do núcleo necrótico da lesão foram demarcadas manualmente. A área total da lesão inclui regiões de pneumonia (alveolite) e regiões de necrose. A área de pneumonia incluiu áreas ocupadas pelo infiltrado celular intra-alveolar e intrabronquiolar (com núcleos celulares positivos para hematoxilina). O núcleo necrótico foi definido como uma área acelular / anuclear (com material nuclear degradado parcialmente - karyorrhetic debris- ou completamente, com coloração negativa para núcleos). Linhas de contorno foram desenhadas em torno dessas regiões e as medidas das áreas foram obtidas pelo software de análise de imagem (ImageJ). A porcentagem de área de necrose em cada grupo experimental foi quantificada como relação de área de necrose a área total da lesão (n= 6-9).

4.11- Análise Imunoistoquímica (IHC) de MMP-2, MMP-8, MMP-9, EMMPRIN do pulmão infectado

Para análise IHC as seções de tecido pulmonar de 5 μ m foram colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, EUA). Após a desparafinização e procedimentos histológicos convencionais descritos no ítem 4.9.1. a peroxidase endógena foi inativada através de tratamento por 30 minutos em solução para bloqueio [85mL de metanol e 15 mL de peróxido de hidrogênio]. O bloqueio de ligações inespecíficas foi feito por incubação de 1 h em solução de leite em pó desnatado a 1%. As seções foram incubadas com os anticorpos anti-MMP-8, MMP-9, EMMPRIN a 4°C por 18 horas, com posterior incubação com anticorpo secundário biotinizado (LSAB System-HRP, Dako) por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com a segunda solução de estreptavidina e reveladas com Kit cromógeno DAB (Dako, CA, EUA). Em seguida, as lâminas

foram contracoradas com hematoxilina de Harris e montadas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

4.12- Isolamento de células do pulmão e Citometria de fluxo

Os lobos do pulmão indicados para isolamento das células foram pesados e colocados em 2 mL do meio RPMI (Gibco, EUA). Os lóbulos foram macerados com o auxílio de pinça curva e mantidos no gelo. A seguir, os tecidos foram dissociados utilizando seringas de 10 mL, por 10 ciclos de homogeneização. A seguir, as amostras foram filtradas em *cell strainer* (Corning, EUA). As células foram incubadas com tampão de lise dos eritrócitos (40 mM NH₄Cl, 4.2 mM Tris, pH 7.4) por 1 minuto a 4°C. A seguir, as células foram contadas e separadas em microtubos na quantidade de 2×10^5 células. As células foram bloqueadas em soro normal de camundongo 1:50 PBS/BSA 1% por 20 minutos e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Os *pellets* celulares foram incubados com 10 µL de anticorpos conjugados (BD Pharmingen, EUA) anti-CD11b-PerCP (marcador das células mielóides), anti-Ly6G-FITC (marcador dos neutrófilos), anti-CD11c-PE (marcador das células dendríticas), anti-Ly6C-PE (marcador dos monócitos inflamatórios). Após incubação por 45 minutos a 4°C, as células foram lavadas e fixadas com 3% paraformaldeído. As populações celulares foram analisadas por citometria de fluxo (BD FACScalibur) e análises feitas com o *software* CellQuest Pro.

4.13- Western Blotting

O *western blotting* foi realizado a fim de verificar a presença da enzima MMP-8. Os sobrenadantes das culturas pulmonares e/ou lavados broncoalveolares foram analisados por *western blotting* utilizando anticorpos específicos. As amostras foram diluídas em tampão de amostra (água destilada, Tris HCl 1,0M, glicerol, SDS 10% e azul de bromofenol 1% e β-mercaptoetanol), tratadas 5 min a 100°C e submetidas a SDS-PAGE a 10%. Após a corrida, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose utilizando o *Trans-Blot System Bio-Rad*, de acordo com as instruções do

fabricante (Bio-Rad, EUA). A membrana foi bloqueada com solução constituída de leite desnatado em pó Molico (Nestlé) a 5% com PBS-*tween* 20 *overnight*. Após este período, foi incubada com os anticorpos de interesse primários e secundários e revelada através do tratamento com uma solução contendo substrato enzimático e a substância cromógena DAB (diaminobenzidina).

4.14- Medidas de biossegurança de nível III

Todos os procedimentos foram executados adotando as medidas de biossegurança necessárias para a manipulação adequada de agentes biológicos de classe de risco III no qual *M. tuberculosis* está classificado (Manual de Biossegurança do Ministério da Saúde, 2010). Foram adotadas medidas de contenção primária; uso de técnicas de manipulação adequadas e utilização de equipamentos de proteção individual, assim como medidas de contenção secundária; uso dos equipamentos e instalações apropriadas. Todos os procedimentos de infecção e manipulação de animais, células e materiais infectados, foram realizados na sala de experimentação do Laboratório NB3, de acesso restrito, em cabines de biossegurança - capelas de fluxo laminar de nível II-BII, utilizando os equipamentos de proteção individual necessários para a manipulação deste patógeno (jaleco de mangas compridas, jaleco descartável, luvas, máscara N-95, touca, sapatos fechados e pró-pés). As instalações do Lab-NB3 possuem um sistema de ventilação que confere a sala de experimentação uma pressão negativa em relação as salas adjacentes. Todo o material de descarte produzido durante o trabalho, juntamente com todo material contaminado, foi acondicionado em sacos apropriados para autoclave, lacrados por dentro da cabine de biossegurança e seguidos para descontaminação em autoclave, instalado dentro da unidade. A descontaminação foi realizada em 40 minutos a 120°C à 1atm.

4.15- Análises estatísticas

Foi utilizado o método *Two-way* ANOVA e o teste Bonferroni como *post test* para a análise dos efeitos simultâneos de dois fatores, e o método *One-way*

ANOVA e *Tukey* como *post test* para a comparação entre grupos na avaliação dos efeitos de um único parâmetro, sendo estes executados com auxílio do programa GraphPad Prism 4 (GraphPad, EUA), considerando as diferenças significativas quando $p < 0,05$ (5%).

5- RESULTADOS

5.1- Mtb induz expressão e produção de MMPs em camundongos infectados

5.1.1- Avaliação da produção das gelatinases MMP-9 e MMP-2 e colagenase MMP-8 por células de pulmão dos camundongos infectados pelas cepas Mtb de alta e baixa virulência x 10⁵

A fim de verificar as diferenças na indução da produção de metaloproteinases pelas cepas Mtb de diferentes graus de virulência, quantificamos a produção de gelatinases MMP-9 e MMP-2 e colagenase MMP-8 pelas células do pulmão dos camundongos infectados pelas cepas Mtb de alta virulência (cepa M299, isolado clínico hipervirulento) e de baixa virulência (cepa laboratorial H37Rv). Os camundongos C57BL/6 foram infectados com 200 bacilos de cada cepa. Após 28 dias de infecção, os animais foram eutanaziados e as vias aéreas foram lavadas com PBS para obter líquido do lavado broncoalveolar e verificar presença de MMPs produzidas no pulmão. Adicionalmente, as células foram extraídas do pulmão, como descrito na sessão Materiais e Métodos, e cultivadas *ex vivo* por 48h. Os sobrenadantes de culturas foram examinados para presença das MMPs produzidas pelas células em cultura. A atividade de gelatinases nas amostras obtidas foi avaliada pela zimografia, utilizando metodologia de eletroforese em gel adicionado de gelatina para verificar sua degradação pelas enzimas ativas.

A eletroforese das proteínas permite discriminar a pró-enzima e a enzima ativa, porque uma vez ativada a MMP sofre autoclivagem do polipeptídeo formando fragmentos, gerando no gel as bandas de menor peso molecular comparado com a banda de pró-enzima.

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que as células do pulmão dos animais infectados produziram significativamente mais gelatinases MMP-2 e MMP-9, principalmente na sua forma ativa, que as células dos animais não infectados (controle), o que foi observado tanto nos sobrenadantes de culturas das células extraídas do pulmão e cultivadas *ex vivo* (A), quanto no líquido de lavagem broncoalveolar (B). A produção da MMP-8 nos animais infectados medida no lavado broncoalveolar também foi maior (C). A

comparação das amostras obtidas dos animais infectados demonstrou que as células dos animais infectados pela cepa hipervirulenta M299 produziram mais MMP-9 (A e B) e MMP-8 (C), na sua forma ativa, que as células dos animais infectados com a cepa laboratorial H37Rv. A diferença na produção de MMP-2 não foi expressiva.

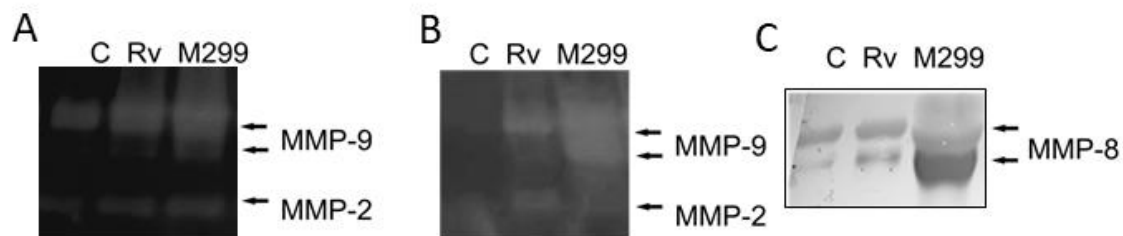
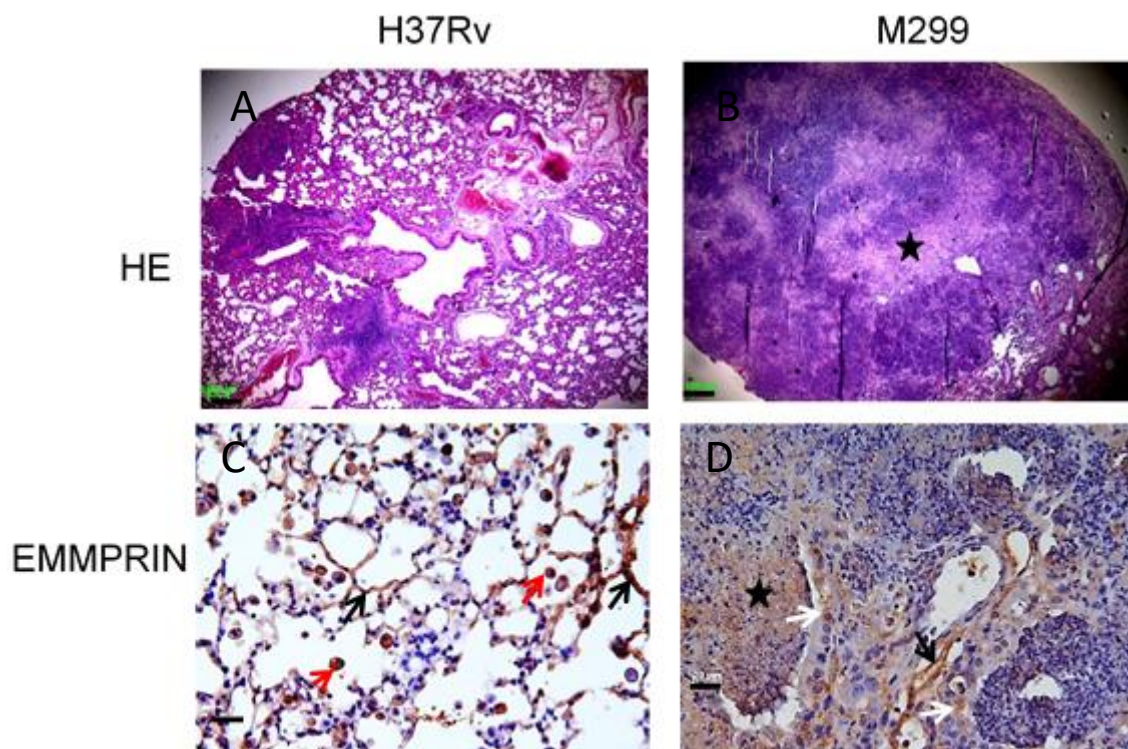


Figura 9. Produção de gelatinases MMP-9 e MMP-2 e da colagenase MMP-8 pelas células do pulmão dos camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas *Mtb* H37Rv (Rv) e M299 no dia 28 p.i. A produção das gelatinases pelas células do pulmão foi medida no sobrenadante de cultura celular cultivadas *ex vivo* por 48 h (A) ou no lavado broncoalveolar (B) utilizando ensaio de zimografia em gel com gelatina. A produção da MMP-8 foi quantificada no lavado broncoalveolar (C). Imagens obtidas em um experimento representativo (n=3): C- Controle (animais não infectados).

5.1.2- Teste Imunoistoquímico para avaliar expressão e imunolocalização de MMPs (EMMPRIN, MMP-8 e MMP-9) no pulmão de camundongos com grau de patologia severa (pneumonia tuberculosa necrotizante) ou amena (granulomas sólidos).

Para avaliar a expressão das MMPs pelas células do pulmão, que podem contribuir com a patologia observada, realizamos teste imunoquistoquímico (IHC) utilizando anticorpos específicos para gelatinases (MMP-2 e MMP-9), colagenase MMP-8, e seu indutor EMMPRIN. Quanto ao EMMPRIN (Fig. 10C e 10D) nota-se forte marcação de macrófagos alveolares (setas vermelhas), células da parede alveolar (setas pretas) e do epitélio bronquiolar (setas brancas). Nos animais infectados com a cepa hipervirulenta (Fig. 10D), as áreas de necrose foram mais marcadas em comparação com as áreas compostas por infiltrado celular, sugerindo a liberação da proteína pelas células mortas. O tratamento do tecido com anti-MMP-2 (Fig. 10E e 10F), demonstrou uma marcação similar a EMMPRIN, com forte expressão da MMP-2 pelas células da

parede alveolar, macrófagos alveolares e alguns macrófagos nos granulomas, as áreas de alveolite (Fig. 10F) não foram marcadas. A marcação anti-MMP-9 (Fig. 10G e 10H), revelou alta expressão dessa enzima por macrófagos alveolares, mas não por células da parede alveolar. Nas áreas de alveolite (Fig. 10H), somente algumas células do infiltrado celular foram marcadas, ao contrário das áreas de necrose, que foram fortemente marcadas. As células mais marcadas positivamente com o anticorpo anti-MMP-9 foram as células inflamatórias (especialmente macrófagos) células epiteliais e o exsudato granulomatoso. O tratamento com anticorpo anti-MMP-8 revelou a imunolocalização de neutrófilos que expressam essa colagenase. Nos animais infectados pela cepa H37Rv (Fig. 10I), poucas células MMP-8-positivas foram detectadas. Já nos animais infectados pela cepa hipervirulenta (Fig. 10J), uma forte marcação dos neutrófilos vivos foi observada (setas verdes). As áreas de necrose apresentaram uma marcação difusa para a MMP-8.



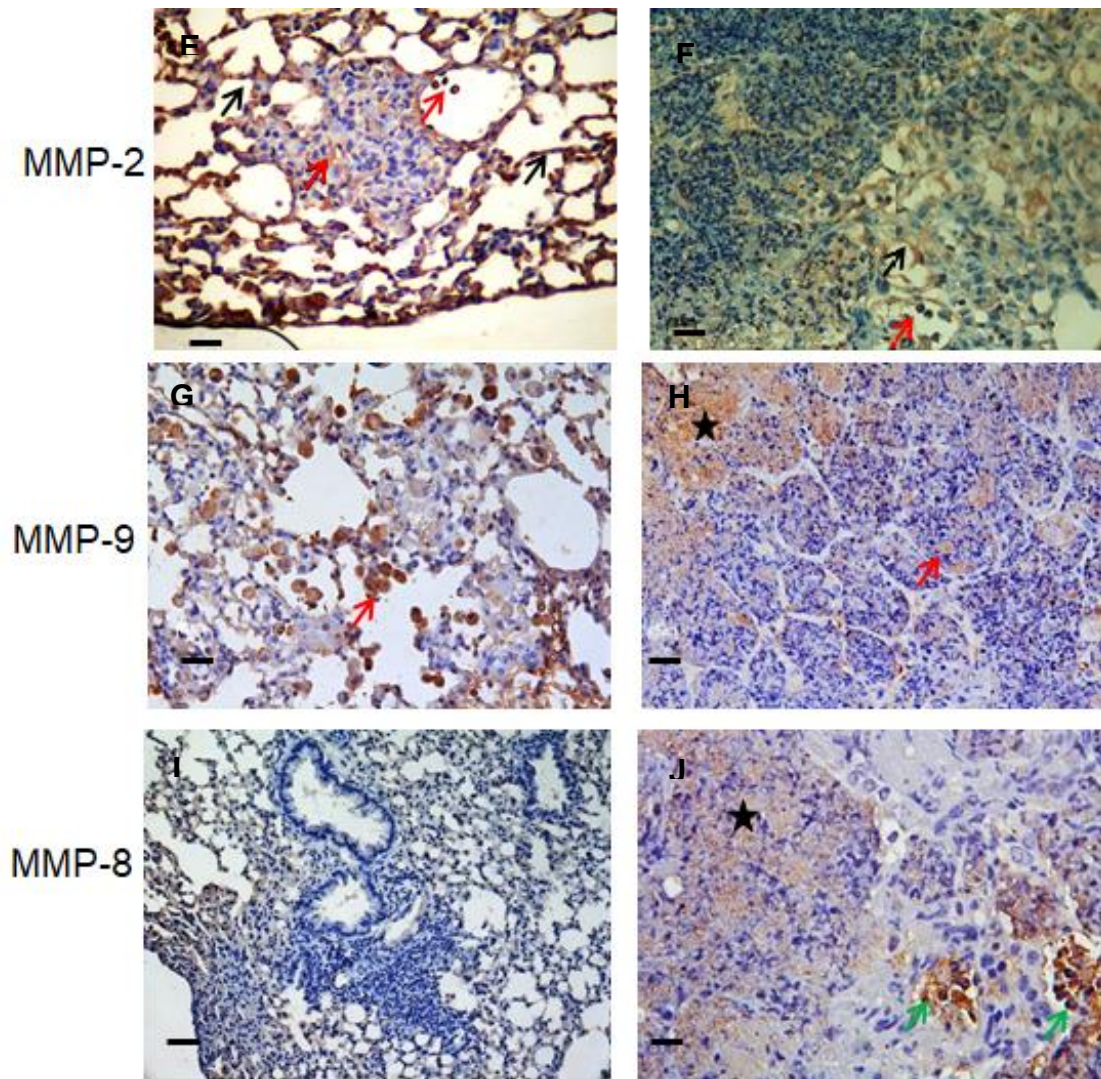


Figura 10. Análise histopatológica e imunoistoquímica dos pulmões de camundongos infectados por Mtb. Camundongos C57BL/6 foram infectados com 200 bacilos das cepas H37Rv e M299. Após 28 dias da infecção, os pulmões foram coletados e processados para testes histológicos. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina, HE (A e B) ou tratados com anticorpos anti- EMMPRIN (C e D), MMP-2 (E e F), MMP-9 (G e H) e MMP-8 (I e J). Animais infectados com a cepa H37Rv exibiram granulomas incipientes (A). Animais infectados com a cepa M299 apresentaram extensa lesão de pneumonia granulomatosa, com forte infiltração de neutrófilos, com ampla área de necrose marcada pela estrela ★ (B). Nos cortes tratados com anticorpos, as MMPs estão marcadas em cor marrom, as células da parede alveolar estão indicadas por setas pretas, as células bronquiolares – por setas brancas e os neutrófilos - por setas verdes. Aumento de 400X, as barras de escala correspondem à 100µm, exceto A e B (aumento de 100X, as barras de escala correspondem à 100µm) e I (aumento de 200X, barra de escala 50µm).

Os resultados demonstram que as lesões necróticas observadas nos camundongos infectados pela cepa M299 foram marcadas para todas metaloproteinases de matriz estudadas, sugerindo sua contribuição para a patogenia da necrose. Esta foi a nossa justificativa para a utilização de inibidores de MMPs para reduzir a patologia necrótica.

5.2. Avaliação dos efeitos terapêuticos de doxiciclina e 2'2-bipiridina (inibidores de MMPs) e da depleção de leucócitos mielóides pelo anticorpo anti-Gr-1 no modelo de infecção de camundongos pelas cepas Mtb de alta e baixa virulência

5.2.1- Esquema do tratamento dos animais infectados com os fármacos

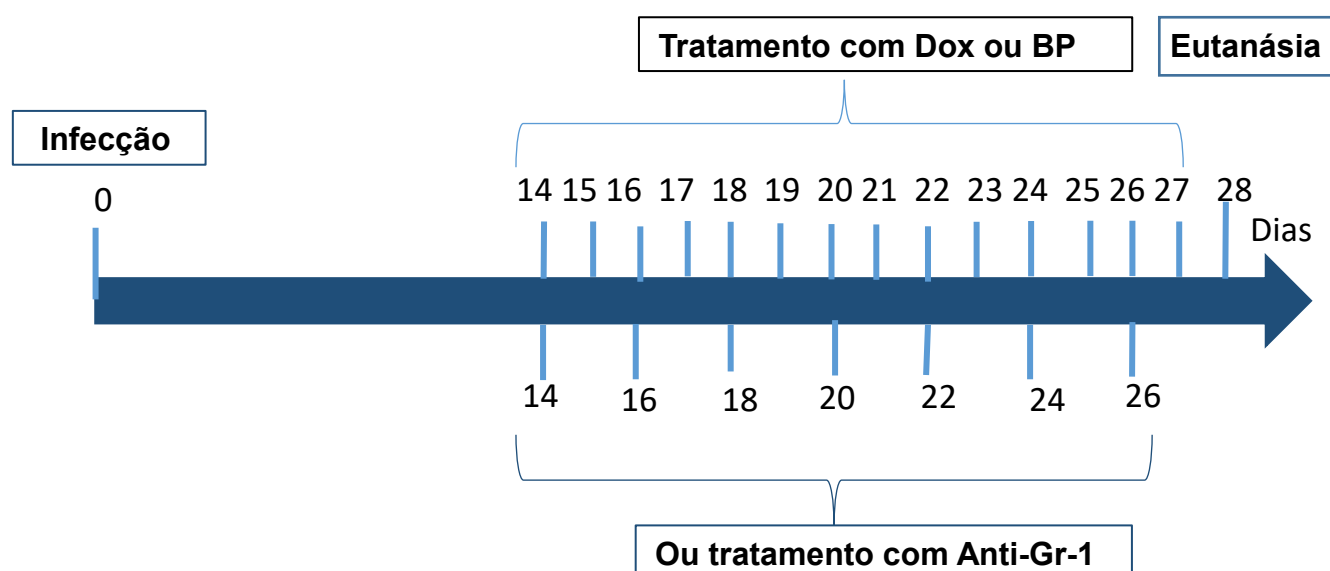


Figura 11: Delineamento experimental do tratamento de camundongos C57BL/6 com doxiciclina, 2'2-bipiridina ou com o anticorpo monoclonal anti-Gr-1.

Os tratamentos foram iniciados no dia 14, por via peritoneal. O dia 14 foi escolhido para início do tratamento de acordo com dados obtidos nos nossos trabalhos anteriores (Ribeiro *et al.*, 2014; Almeida *et al.*, 2017), que demonstram início da progressão de patologia granulomatosa a patologia necrótica neste dia, que foi associado ao aumento do recrutamento de neutrófilos ao pulmão. Os animais foram tratados com dose de 40mg/kg de doxiciclina (50 mg/mL) ou 2'2-bipiridina (50 mg/mL) diariamente. O anticorpo monoclonal anti-Gr-1 foi inoculado a 100 µg/dose (200 µg/mL) em dias alternados (no total 7 inoculações). Os animais foram eutanasiados no dia 28 pi.

5.2.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos na produção das gelatinases MMP-9 e MMP-2 e colagenase MMP-8 por células pulmonares de camundongos infectados

A produção de MMPs por células do pulmão foi avaliada no sobrenadante de cultura das células extraídas do pulmão no dia 28 pi e no líquido de lavagem broncoalveolar obtido no dia da eutanásia. A atividade das gelatinases MMP-9 e MMP-2 foi analisada por meio de zimografia em géis com 0,1% de gelatina, usada como substrato para atividade dessas metaloproteinases. As formas ativas das gelatinases foram visualizadas de acordo com sua capacidade de clivar a gelatina no gel com o aparecimento de bandas brancas. A produção de MMP-8 foi avaliada por meio de *Western blotting*, utilizando anticorpo específico anti-MMP-8.

Resultados apresentados na Figura 12A demonstram, que as células isoladas do pulmão, tanto dos animais infectados quanto do controle, foram capazes de produzir MMP-9. As células de animais infectados pela cepa hipervirulenta M299 produziram significativamente mais desta protease que as células infectadas pela cepa H37Rv. A atividade da MMP-2 foi baixa em todas as amostras submetidas a zimografia. No lavado broncoalveolar as formas ativas de MMP-9 e MMP-2 foram detectadas somente nas amostras obtidas de animais infectados pela cepa mais virulenta (Fig. 12B), demonstrando que nos animais infectados pela cepa H37Rv e de controle a atividade e/ou produção dessas enzimas foi baixa. Da mesma forma, a presença de MMP-8 na forma ativa no lavado broncoalveolar foi detectada somente nas amostras obtidas de animais infectados pela cepa M299 (Fig. 12C). A enzima MMP-8 ativa apresentou uma banda de menor peso molecular (proteína clivada) comparado com as bandas da pró-enzima.

O tratamento com Dox reduziu fortemente a produção de MMP-9 que foi maior do que a redução dessa protease pela Dox. Entretanto, diferentemente da Dox a BP não inibiu a MMP-8.

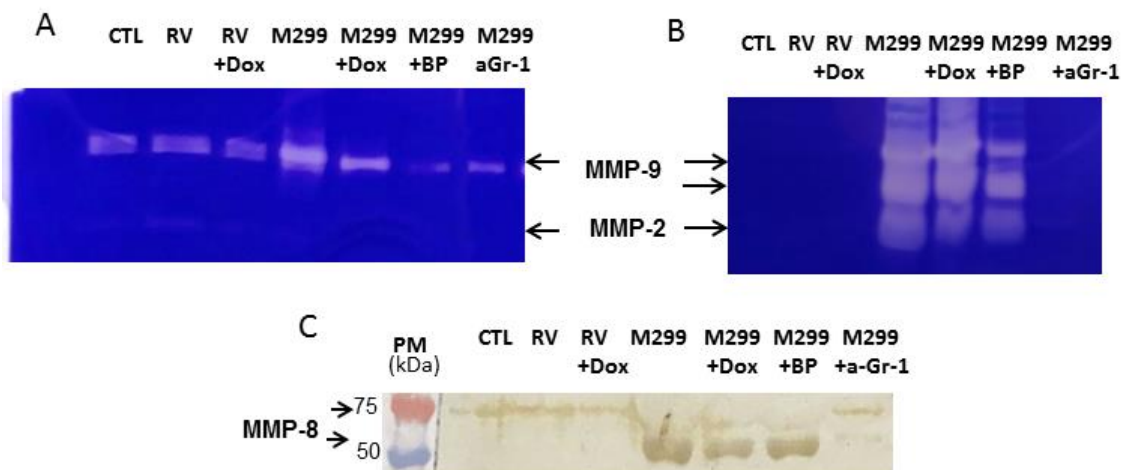


Figura 12. Produção de MMPs por células do pulmão dos camundongos infectados pelas cepas *Mtb* M299 e H37Rv (RV) e tratados com fármacos no dia 28 pi. As amostras dos sobrenadantes de culturas de células pulmonares coletados após 48h de cultivo *ex vivo* (A) e as amostras do líquido de lavado broncoalveolar (B) foram submetidas a zimografia em gel com gelatina para avaliar atividade das gelatinases MMP-9 e MMP-2. A produção de MMP-8 no pulmão foi avaliada através de análise da presença no lavado broncoalveolar por *Western blotting* (C). CTL: controle, animal não infectado. PM: peso molecular.

5.2.3. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos no crescimento de micobactéria nos camundongos infectados

Para avaliar os efeitos do tratamento com os fármacos no crescimento de micobactéria nos pulmões dos camundongos infectados e na sua capacidade de disseminação para o baço e fígado, os referidos órgãos foram retirados dos camundongos após 28 d.p.i., processados e homogenizados de tecidos obtidos foram semeados em meio sólido para a quantificação de colônias de micobactérias (teste de CFU).

Os resultados demonstram que nos animais tratados com a doxiciclina ocorreu redução significativa da carga bacteriana nos pulmões dos camundongos infectados e tratados com este medicamento, assim como houve redução no tratamento com a 2'2-bipiridina e com o anticorpo monoclonal anti-Gr-1 em comparação ao animal infectado com a cepa M299 que não recebeu tratamento (Figura 13). Os animais infectados com a cepa H37Rv obtiveram menor crescimento bacteriano do que os infectados com M299, mas também

houve redução da carga bacteriana quando eles foram tratados com a doxiciclina.

A carga bacteriana no baço e no fígado foi analisada para verificar a disseminação dos bacilos após a infecção pulmonar. Animais infectados com H37Rv não tiveram formação de colônias no baço nem no fígado. No baço de animais infectados com M299 que foram tratados com Dox tiveram redução do crescimento bacteriano comparado ao animal não tratado, mas o mesmo não se repetiu no tratamento com BP. O crescimento bacteriano no fígado foi semelhante nos grupos tratados e não tratados.

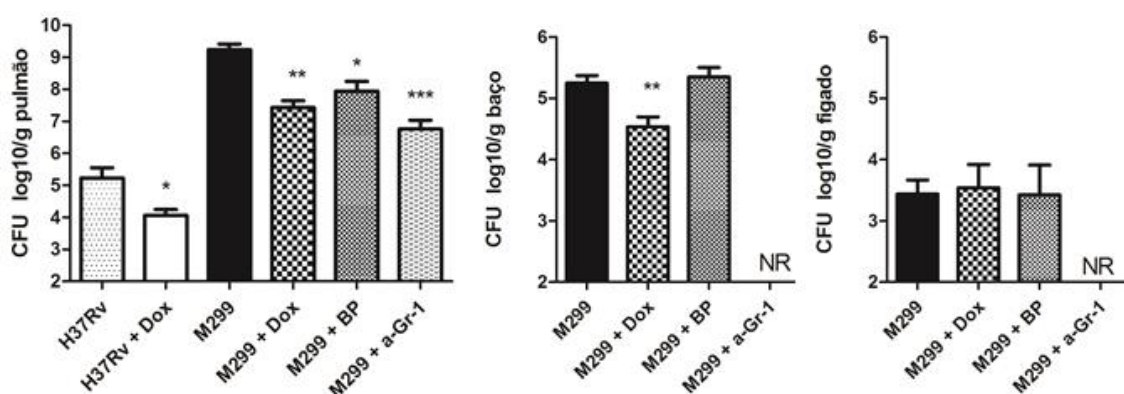


Figura 13. Carga bacteriana nos pulmões, baço e fígado de camundongos infectados com cepas Mtb e tratados com fármacos. Os camundongos C57BL/6 foram infectados com 200 *bacilli* das cepas Mtb H37Rv ou M299 e tratados com Dox, BP a-Gr-1. O número de CFU/g de tecido foi avaliado no lobo direito superior pulmonar, baço e fígado no dia 28 pi (média \pm desvio padrão, n=6 para pulmão e n=2 para baço e fígado, em triplicata). Diferenças significativas comparadas entre os grupos de animais infectados e tratados e o grupo dos animais apenas infectados pela respectiva cepa Mtb, foram indicados com *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001. Resultados representativos de pelo menos dois experimentos independentes. NR- não realizado.

5.2.4. Avaliação dos efeitos do tratamento com os fármacos na morbidade dos animais infectados

Para avaliar a morbidade foi monitorado o peso corporal dos animais e avaliada a patologia do pulmão no dia 28 p.i.

5.2.4.a- Quantificação do peso dos animais

A morbidade dos animais com micobactérias patogênicas está associada a significativas alterações sistêmicas, como a diminuição do índice de massa corporal, redução da capacidade física e deficiência respiratória que levam os animais a perda do apetite, letargia e estado moribundo na fase terminal da doença. É importante ressaltar que a redução do índice de massa corporal pode ser observada na fase avançada da TB humana também. Por isso se faz necessário o acompanhamento do peso corporal dos camundongos infectados e dos que foram tratados com os fármacos – inibidores de MMPs ou anticorpo anti-Gr-1.

O peso dos animais foi avaliado no dia 0 e semanalmente a partir do início do tratamento nos dias 14, 21 e 28 pi. A perda de peso corporal maior do que 25% foi a indicação para eutanásia para evitar o sofrimento dos animais.

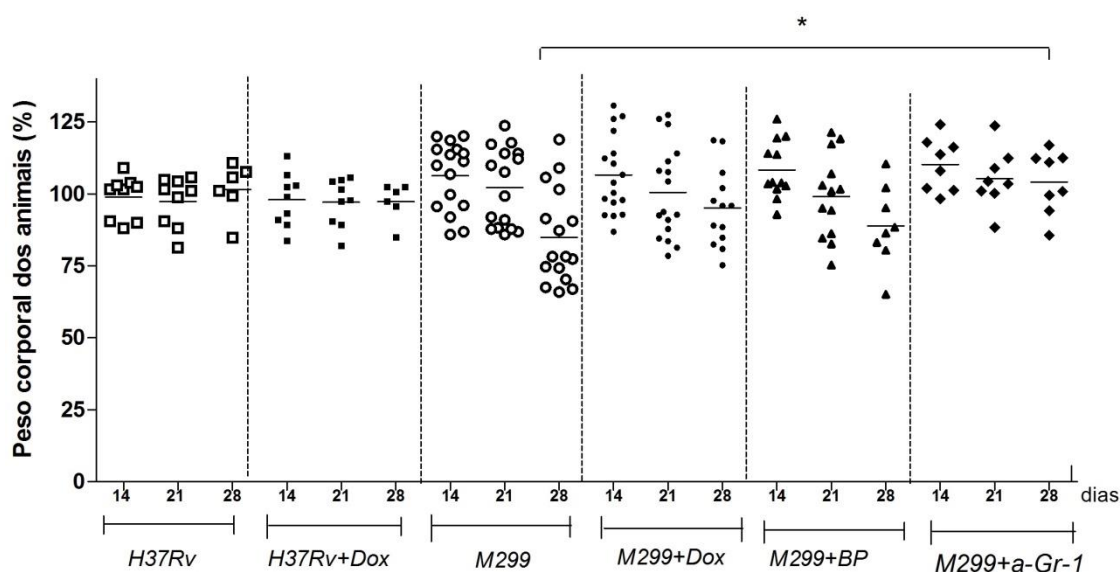


Figura 14. Monitoramento do peso corporal dos animais. Os camundongos C57BL/6 foram infectados com cepas Mtb H37Rv ou M299 e tratados com Dox, BP ou anti-Gr-1 (a-Gr-1). Os animais foram pesados no dia 0, 14, 21 e 28 pi. O peso obtido no dia 0 foi considerado como 100%. As médias dos valores estão representados por linhas horizontais. O símbolo * foi utilizado para indicar as diferenças significativas observadas para os grupos indicados (* $p < 0.05$). Resultados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Observamos perda do peso corporal nos animais infectados pela cepa hipervirulenta M299 no dia 28 comparado ao dia 0 ($p < 0.05$), enquanto que os

animais infectados pela cepa H37Rv não sofreram redução do peso durante do período de observação. Nos grupos dos animais tratados com Dox e BP foi observada uma tendência da diminuição de perda de peso corporal, mas essa diminuição não foi significativa. Já o tratamento com anticorpo anti-Gr-1 foi capaz de proteger animais contra perda de peso.

5.2.4.b- Macropatologia dos pulmões

A característica da patologia pulmonar de camundongos infectados com cepas de Mtb é a migração leucocitária para o local de infecção dando início a formação do granuloma, seguida pela migração linfocitária. O acúmulo do infiltrado celular e do exsudato líquido associados a pneumonia levam ao aumento do peso do pulmão. Sendo assim, podemos correlacionar o peso pulmonar a extensão da pneumonia. O peso do pulmão foi quantificado no dia 28 pi. Como foi esperado, os pulmões de animais infectados com a cepa M299 apresentaram maior aumento do peso em comparação aos animais infectados com a cepa menos virulenta H37Rv ($p < 0.01$). O tratamento com Dox ligeiramente diminuiu o peso do pulmão nos animais infectados com cepa H37Rv, entretanto, a diminuição foi não significativa (Figura 15). Já nos animais infectados com cepa M299 todos os tratamentos diminuíram o peso do pulmão. A inibição foi um pouco maior no grupo dos animais tratados com anticorpo anti-Gr-1, entretanto, as diferenças entre os grupos dos animais tratados com diferentes tratamentos não foram significativas.

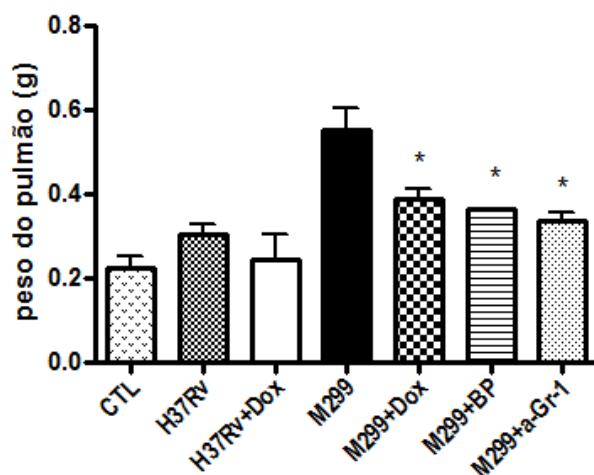


Figura 15. Análise de peso dos pulmões de animais infectados e tratados com fármacos.

Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com as cepas H37Rv ou M299 e posteriormente tratados com Dox, BP, anti-Gr-1 (a-Gr-1). Camundongos não infectados foram utilizados como controle. Os animais foram eutanasiados após 28 dias de infecção. Os pulmões foram extraídos e pesados. Resultados estão apresentados como média do peso do pulmão de cada grupo em gramas \pm desvio padrão. Os valores referentes aos grupos dos animais infectados e tratados, que foram significativamente diferentes em comparação com os valores do grupo dos animais somente infectados pela respectiva cepa Mtb, estão marcados pelo * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) e *** ($p < 0.0001$).

5.2.4.c- Análise histopatológica

A análise histopatológica foi feita em seções de tecidos de pulmão de camundongos infectados após 28 d pi. A cepa laboratorial H37Rv induziu formação de pequenos granulomas, apresentados na Fig. 16A. O tratamento destes animais com doxiciclina não alterou o caráter da patologia, todos os animais apresentaram pequenos granulomas incipientes nos pulmões (dados não apresentados). Nos cortes histológicos dos pulmões obtidos dos camundongos infectados com a cepa M299 (Fig.16A) foi observada grande infiltração de células inflamatórias, especialmente de neutrófilos e macrófagos, que causaram extensa pneumonia (delineada com linha vermelha traçada) e com área de necrose central (delineada com linha preta traçada), que foi marcada com asterisco. Deve-se notar, que as regiões do pulmão fora da área marcada, também não estavam aeradas, apresentando exsudato líquido nos alvéolos. A coloração com tricrômico de Masson (TM), utilizada para visualizar colágeno (corado pela essa técnica na cor azul), demonstrou baixa marcação (Fig. 16E), incluindo nas regiões peribronquiais e perivascularares, que nos pulmões de controle apresentaram marcação para colágeno (dados não apresentados). Áreas de alveolite, principalmente os alvéolos com infiltrado nas diferentes fases de morte e degradação celular, apresentaram numerosos BAAR corados pelo método Ziehl-Neelsen (ZN) em vermelho (Fig. 16I). Grandes números de BAAR extracelulares foram observados também na área de necrose (dados não apresentados).

Nos animais que receberam tratamento com doxiciclina (Dox) e 2'-bipiridina (BP) foi observada certa redução de lesões no pulmão quando

comparados aos animais infectados que não receberam tratamento (Fig. 16B e 16C). Foi observada a redução das áreas necróticas e quantidades de BAAR também, principalmente nos animais tratados com Dox. O maior efeito na redução da patologia pulmonar foi obtido nos animais tratados com anticorpo anti-Gr-1 (Fig. 16D). O tratamento com o anticorpo monoclonal anti-Gr-1 reduziu significativamente o número de lesões, a área necrótica e o número de micobactérias. Vale destacar que os animais tratados com o anticorpo e com BP foi observada maior intensidade de coloração para o colágeno. Diferentemente dos animais não tratados, estes grupos de animais apresentaram a formação de cápsula fibrótica em volta da área de necrose (Fig. 16G e 16H), o que sugere menor degradação do colágeno pelas MMPs nestes animais.

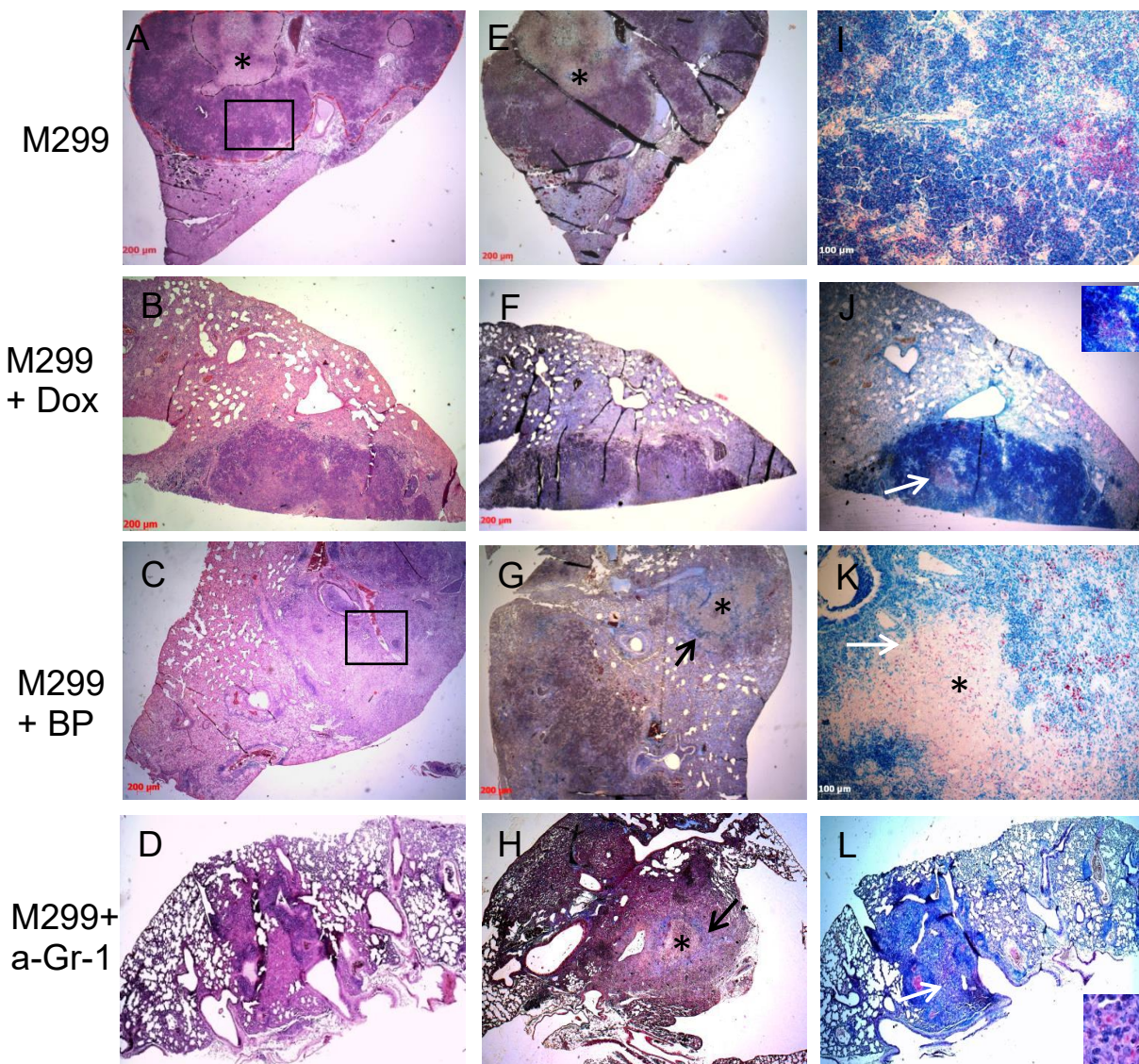


Figura 16. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 28 dias após a infecção e tratamento com doxiciclina, 2'2-bipiridina e anti-Gr-1. Camundongos C57BL/6 foram infectados com a cepa M299 e foram tratados com os fármacos. Após 28 dias da infecção 3 camundongos de cada grupo foram eutanasiados e os pulmões submetidos a análise histológica. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina, HE (**A - D**), tricrômico de Masson, TM (**E - H**) e Ziehl-Neelsen, ZN (**I - L**) e analisados através de microscopia de campo claro. Ampla região de pneumonia com área de necrose caseosa central marcada com asterisco (**A** e **E**). Setas pretas demonstram cápsula de colágeno (**G** e **H**). Setas brancas (**I - L**) demonstram áreas de aglomeração de micobactérias BAAR (ampliado nos insertos em **J** e **L**). As áreas marcadas pelos retângulos pretos (**A** e **C**) estão ampliadas em **I** e **K**, respectivamente (coloração ZN). Aumento de 25X, as barras de escala correspondem à 200 μ m, exceto **I** e **K** (aumento de 200X, as barras de escala correspondem à 100 μ m).

5.2.2.d- Morfometria da área de pneumonia e da área de necrose pulmonar

As imagens dos cortes histológicos do pulmão corados por hematoxilina-eosina (HE) foram utilizadas para morfometria da área de pneumonia (Figura 17) e delineamento e quantificação da área do foco necrótico (Figura 18).

A análise da gravidade do processo inflamatório no pulmão (pneumonia) foi baseada pela quantificação da área intra-alveolar aerada, livre de infiltrado celular ou exsudato líquido associados à pneumonia. A redução do espaço intra-alveolar aerado reflete melhor a gravidade da patologia que a quantificação da área de pneumonia composta pelo infiltrado de células inflamatórias que não inclui as áreas do exsudato líquido de difícil identificação nas imagens dos cortes histológicos. A redução do espaço intra-alveolar foi determinada como descrito no capítulo Materiais e Métodos, de acordo com protocolo dos Neres *et al.* para a quantificação do espaço intravascular na placenta (Neres *et al.*, 2008).

Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que a infecção dos animais com cepa H37Rv reduziu a área aerada do pulmão cerca de 20% comparado com animais de controle, enquanto que nos animais infectados com a cepa hipervirulenta M299 essa redução foi significativamente maior – de 86% ($p < 0,001$). Estes dados demonstram que a cepa M299 causou uma forte consolidação do tecido pulmonar, associada à infiltração leucocitária e ao acúmulo de exsudato líquido em algumas áreas. O tratamento dos animais com Dox diminuiu levemente a redução da área aerada, mas essa diminuição não foi significativa ($p > 0,05$). Do mesmo modo, o tratamento com BP não apresentou efeito neste parâmetro. Forte efeito positivo na preservação da área intra-

alveolar aerada foi observado nos animais tratados com anticorpo anti-Gr-1 usado para deplecionar neutrófilos e monócitos Gr-1 positivos.

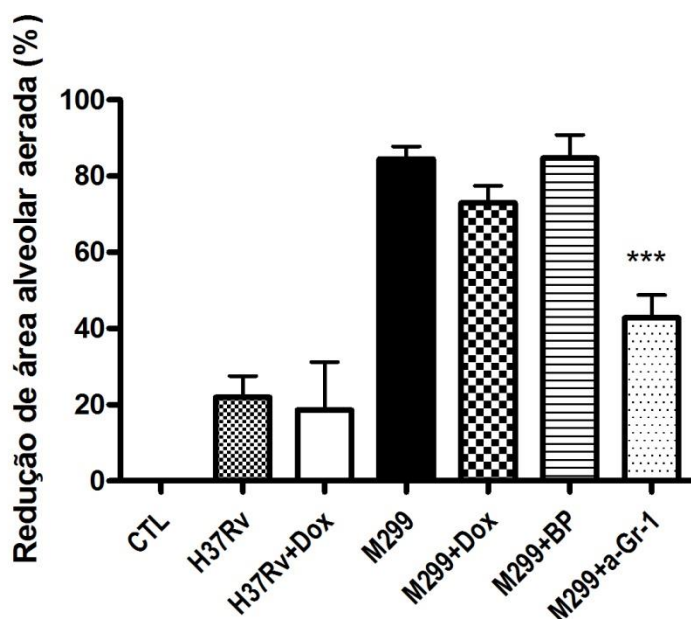


Figura 17. Morfometria da área intra-alveolar aerada. Os camundongos foram infectados com cepas Mtb e tratados com fármacos conforme descrito na legenda da Fig. 5. Os espaços intra-alveolares aerados foram analisados pelo programa Image J e a porcentagem de redução de área intra-alveolar nos grupos dos animais infectados e tratados relativo aos animais de controle foi quantificada. Os dados representam média \pm desvio padrão das amostras em cada grupo (n = 3-9). Diferenças significativas comparadas entre os grupos de animais infectados e tratados e o grupo dos animais apenas infectados pela respectiva cepa Mtb, foram indicados com *p < 0.05, ***p < 0.001. Resultados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

Para avaliar a área de necrose pulmonar observada nos animais infectados com a cepa M299, realizamos delineamento da área de lesão, associada a alveolite causada pela infiltração das células (contorno pela linha vermelha) e do núcleo necrótico formado na região central da lesão (linha preta), como demonstrado na Figura 18. As áreas de necrose e a área de alveolite foram medidas, utilizando programa ImageJ. A porcentagem de área de necrose relativa a área de alveolite foi quantificada, de acordo com as recomendações dos Seimon *et al.* para a quantificação da necrose nas lesões associadas a aterosclerose nos vasos (SEIMON *et al.*, 2009).

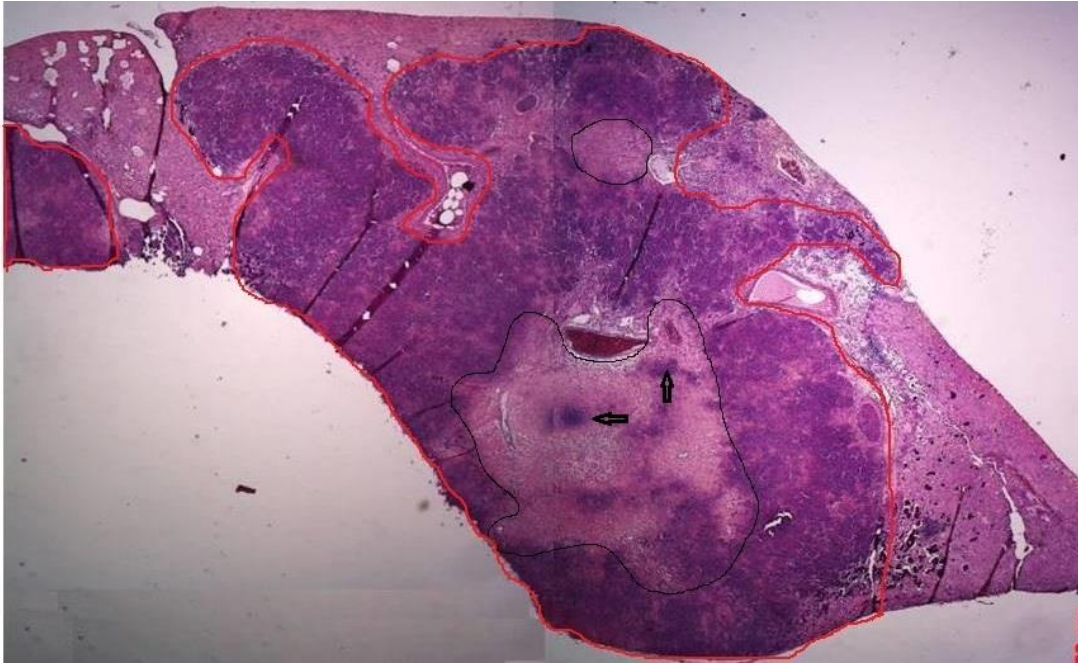


Figura 18. Delimitação de áreas de pneumonia e de necrose nos cortes histológicos. Uma imagem representativa da sessão pulmonar corada pela hematoxilina e eosina (aumento de 25 x), obtida do animal infectado pela cepa M299, 28 dias pi. (duas microfotografias da mesma sessão foram mescladas para visualizar a área total da lesão) A área de pneumonia, que inclui regiões de alveolite, com forte infiltração dos alvéolos e bronquíolos com leucócitos inflamatórios, principalmente neutrófilos e monócitos foi contornada manualmente pela linha vermelha. A área de necrose, caracterizada pela morte das células e destruição foi contornada pela linha preta. Áreas necróticas incluem as áreas de restos nuclear e citoplasmático (*karyorrhectic debris*), marcadas pelas setas, e áreas de necrose caseosa. Aumento de 25X.

A quantificação da área de alveolite nos animais infectados com a cepa M299 demonstrou que todos os tipos de tratamento realizados nos animais reduziram a lesão causada pela infiltração celular. Entretanto, a redução significativa da área de alveolite foi observada somente no grupo tratado com anticorpo anti-Gr-1 (Fig.19A). Apesar da área de alveolite selecionada não incluir regiões de edema (exsudato líquido), que foram incluídos na avaliação da área intra-alveolar aerada (Fig.19), os resultados de ambos os testes foram bem similares. Já a quantificação da área de necrose demonstrou redução significativa do desenvolvimento do núcleo necrótico nas lesões pulmonares dos dois grupos de camundongos, que foram tratados com Dox ($p < 0.05$) (Figura 16). As regiões de necrose, que no grupo dos animais infectados ocuparam 22% da área total de lesão associada à pneumonia, foram levemente reduzidas nos animais tratados com a Dox (14% da lesão total) e ainda menores no grupo dos

animais tratados com o anticorpo (5% da lesão total). Não foi observada a redução de extensão das áreas necróticas nos animais tratados com BP.

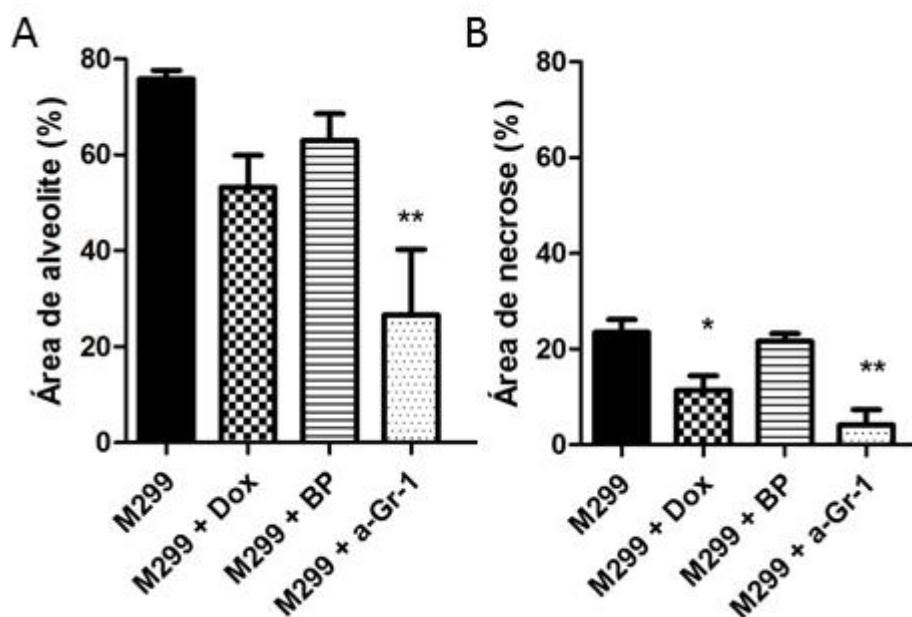


Figura 19. Morfometria das áreas de alveolite (A) e de necrose (B) nas lesões patológicas do pulmão. Os camundongos foram infectados com cepa M299 e tratados com fármacos como está descrito na legenda da Fig. 5. As áreas de necrose e áreas de alveolite (pneumonia) foram delimitadas e quantificadas pelo programa de análise de imagem Image J, como descrito em Materiais e Métodos. A porcentagem da área de alveolite em cada grupo experimental foi quantificada com relação a área ocupada pela pneumonia (infiltração celular) com o total da área da sessão pulmonar (A). A porcentagem de área de necrose em cada grupo experimental foi quantificada como relação de área de necrose a área de alveolite (B). Os dados representam média \pm desvio padrão em cada grupo (n= 6-9, 3 animais/grupo, 3 experimentos independentes). Diferenças significativas comparadas entre os grupos de animais infectados e tratados e o grupo dos animais apenas infectados foram indicados com * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.2.2.e- Quantificação de leucócitos mielóides recrutados no pulmão

Nos estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que a pneumonia primária causada pela cepa hipervirulenta M299 está associada ao recrutamento de um grande número de leucócitos mielóides ao pulmão, principalmente dos neutrófilos e monócitos (RIBEIRO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2017). Avaliamos efeito dos fármacos em estudo no total de células mielóides CD11b+ no pulmão.

Os resultados apresentados na Figura 20 demonstram que nos animais infectados pela cepa hipervirulenta M299 cerca de 60% das células isoladas do pulmão do dia 28 pi ($121,5 \pm 33,2 \times 10^5$) foram representadas por leucócitos mielóides ($71,3 \pm 13,4 \times 10^5$), enquanto que nos animais infectados pela cepa H37Rv a proporção dessas células no pulmão foi cerca de 27%. A maioria das células mielóides no infiltrado inflamatório pulmonar nos animais infectados pela cepa M299 foi composta por fagócitos polimorfonucleares (PMF), incluindo neutrófilos Ly6G+ ($45,3 \times 10^5$ células) e as subpopulações de monócitos (Mo) e células dendríticas (DC) (no total $12,8 \times 10^5$ células), demonstrando a prevalência de neutrófilos 3,5/1 (PMF/Mo+DC). A relação dos neutrófilos e fagócitos Mo+DC no grupo infectado pela cepa H37Rv foi inversa, com a prevalência de células mononucleares 1/ 3,4 (PMF/Mo+DC).

Nos animais tratados com Dox foi observada uma tendência a redução das células mielóides, mas a redução observada não foi significativa de acordo com a metodologia de análise estatística entre os grupos de valores escolhidos para este estudo (teste *One-way ANOVA* e *Tukey post hoc test*). Entretanto, a tendência a redução dos neutrófilos foi maior do que dos outros fagócitos mononucleares, diminuindo a relação entre neutrófilos e Mo+DC até 2,9/1, comparado com a relação 3,5/1 observada no respectivo grupo dos animais infectados e não tratados.

O tratamento com BP também reduziu levemente o número de células mielóides recrutadas ao pulmão, principalmente de monócitos inflamatórios ($p < 0.05$), levando a proporção entre neutrófilos e fagócitos mononucleares a 2,8/1.

Como era esperado, o maior efeito no número total de células mielóides no pulmão foi observado nos animais tratados com anticorpo anti-Gr-1, utilizado para deplecionar células Gr-1-positivas (principalmente neutrófilos e monócitos que expressam altos níveis de Gr-1 na membrana citoplasmática). Foi observada redução de aproximadamente 18 vezes de neutrófilos e 7 vezes de monócitos inflamatórios e de células dendríticas derivadas de monócitos ($p < 0,0001$), mas não de células dendríticas que não expressam Ly6C. A relação entre neutrófilos e fagócitos mononucleares recrutados ao pulmão nos animais deste grupo foi de 1/1,1 (PMF/Mo+DC).

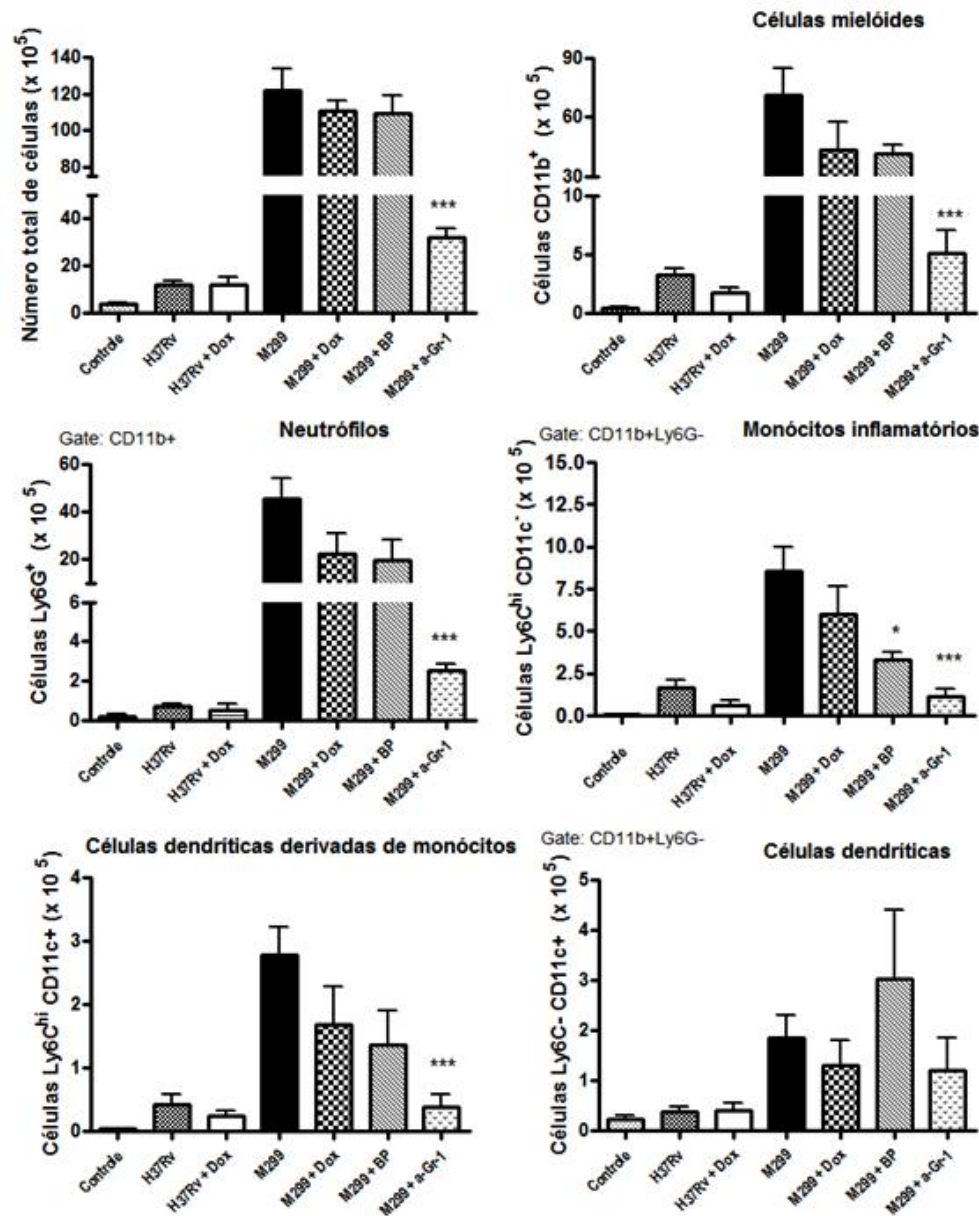


Figura 20. Número de células isoladas dos pulmões de camundongos infectados com cepas Mtb e tratados com fármacos aos 28 dias após a infecção. Camundongos não infectados foram utilizados como controles. As células dos pulmões foram extraídas e marcadas com anticorpos contra os marcadores de leucócitos mielóides. As populações de células mielóides foram identificadas por citometria de fluxo. O número de células isoladas do pulmão, células mielóides CD11b⁺ e suas subpopulações, incluindo neutrófilos (células Ly6G⁺), monócitos inflamatórios (células Ly6C^{hi}CD11c⁻Ly6G⁻), células dendríticas derivadas de monócitos (CD11c⁺Ly6C^{hi}Ly6G⁻) e células dendríticas (CD11c⁺Ly6C⁻Ly6G⁻) foram quantificados. Os valores apresentados representam as médias \pm desvio padrão, n= 6-8. Diferenças significativas comparadas entre os grupos de animais infectados e tratados e o grupo os animais apenas infectados pela respectiva cepa Mtb, foram indicados com *p < 0.05, **p < 0.01; ***p < 0.001. Resultados representativos de pelo menos três experimentos independentes.

6- DISCUSSÃO

A TB permanece sendo um grande problema de saúde pública com alta taxa de mortalidade entre os indivíduos infectados. O atual regime de tratamento da TB é incomodo porque são utilizados vários medicamentos (entre três e quatro) a serem tomados por 6-9 meses. Isto demanda um grande esforço de sistemas públicos de saúde, além de problemas de não adesão ao tratamento, gerando casos de cepas de Mtb resistentes ao tratamento. Devido a todos estes desafios, novas estratégias para melhorar o atual regime de tratamento anti-TB teria grande benefício em programas de controle em todo o mundo. Além disso, a resistência a múltiplos fármacos exerce forte pressão sobre o sistema de saúde, o que leva a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos não só para conter o bacilo como também para estimular a habilidade natural do hospedeiro a combater a infecção.

Neste trabalho foi investigado o uso de inibidores de metaloproteinases de matriz incluindo a doxiciclina, Dox (antibiótico de amplo espectro, único fármaco aprovado para utilização como inibidor de MMPs em clínica) e a bipyridina, BP (composto utilizado para desenvolvimento de inibidores de MMP), no tratamento da TB experimental severa para avaliar sua influência na patogenia pulmonar necrótica da tuberculose induzida nos camundongos por cepa hipervirulenta de Mtb visando propor uma nova abordagem de tratamento adjuvante para reduzir a patogenia em casos de TB severa. Nosso grupo de pesquisa já havia estabelecido anteriormente que o modelo de infecção intratraqueal de camundongos C57BL/6 com a cepa laboratorial H37Rv induz uma patologia pulmonar moderada, caracterizada pela formação de pequenos granulomas 28 dias pós-infecção (p.i.). Enquanto que a patologia induzida por cepas hipervirulentas, como a cepa M299, promove recrutamento excessivo de células inflamatórias com acúmulo de neutrófilos, além de reação granulomatosa, no foco da infecção (ALMEIDA *et al.*, 2017).

O tecido pulmonar consiste de vários tipos celulares que expressam MMPs, como células epiteliais bronquiolar e alveolar, fibroblastos, entre outras. Após a infecção com Mtb, tanto as células de estroma pulmonar como os leucócitos que migram para o pulmão, podem produzir altas concentrações de MMPs em resposta a bactéria. Em cultura celular, as células extraídas do pulmão

do animal infectado continuam a secretar as MMPs *ex vivo* que podem ser quantificadas no sobrenadante da cultura, utilizando ensaio de zimografia ou *Western blotting*. Da mesma forma, as MMPs secretadas por diferentes tipos celulares no pulmão podem ser detectadas e quantificadas no lavado broncoalveolar obtido dos animais infectados.

Na primeira etapa do nosso trabalho, comparamos a atividade e produção das MMPs no pulmão induzida pelas cepas de alta virulência (cepa M299) e baixa virulência (cepa H37Rv). Foram analisadas as MMPs que podem contribuir para a patologia necrótica pulmonar (colagenase MMP-8 e gelatinases MMP-9 e MMP-2).

Os resultados de zimografia e *western blotting* (Figura 9) demonstram que as células dos animais infectados pela cepa M299 (grupo M299) produziram mais MMP-9 e MMP-8, na sua forma ativa, que as células dos animais infectados com a cepa laboratorial H37Rv. A diferença na produção de MMP-2 foi menos expressiva. As maiores taxas da produção de MMP-9 e MMP-8 observadas nos animais do grupo M299 foram associadas a patologia pulmonar muito mais grave nestes animais (pneumonia necrotizante) em comparação com o grupo H37Rv (escassos granulomas sólidos).

A análise imunoistoquímica dos cortes histológicos de pulmão dos animais infectados revelou a imunolocalização das células que expressam MMPs (Figura 10). Os resultados demonstram que ambas as cepas foram capazes de aumentar a expressão de MMP-2 e do indutor EMMPRIN nas células do estroma pulmonar e macrófagos alveolares, enquanto que a expressão de MMP-9 foi observada principalmente nos macrófagos e monócitos recrutados ao pulmão. O acúmulo de monócitos/macrófagos no pulmão foi maior nos animais do grupo M299, aumentando a produção dessas proteases no local da infecção. As células positivas para MMP-8 (neutrófilos) foram observadas principalmente nos animais do grupo M299, localizadas em grandes quantidades nas áreas de alveolite. É importante notar que as áreas da necrose que foram observadas somente nas lesões dos animais M299, apresentaram a marcação difusa para todas as MMPs estudadas neste trabalho, confirmando a hipótese que a morte necrótica das células mielóides produtoras de MMPs, principalmente de neutrófilos, que carregam grandes quantidades de MMP-8, MMP-9 e outras

proteases nos grânulos citoplasmáticos, contribui para o desenvolvimento da patologia necrótica em várias doenças (RAY & STETLER-STEVENSON, 1994).

Em pacientes com TB pulmonar grave ou com meningite tuberculosa, o acúmulo dos neutrófilos e a alta expressão de collagenases MMP-1 e MMP-8, correlacionam com a gravidade da doença avaliada por meio dos marcadores radiológicos de destruição tecidual (GREEN *et al.*, 2009; ELKINGTON *et al.*, 2011, WALKER *et al.*, 2012). Ong *et al.* observou a partir de amostras de escarro de pacientes com TB que a destruição tissular causada por neutrófilos é dependente de MMP-8, provando que a infiltração excessiva dessas células provoca efeitos prejudiciais ao hospedeiro (ONG *et al.*, 2014). Foi sugerido que com a intervenção terapêutica através da inibição da atividade dos neutrófilos e das MMPs *in vivo* seja possível reduzir a patologia necrótica, reduzir a inflamação no pulmão, melhorando assim o prognóstico da doença.

A escolha da doxiciclina para a intervenção terapêutica neste estudo foi baseada em trabalhos anteriores que demonstram que a utilização deste antibiótico pode reduzir o recrutamento dos neutrófilos ao pulmão nos modelos de infecção aguda (MOON A. *et al.*, 2012), além das suas propriedades na inibição de MMPs (FUJITA M. *et al.*, 2007) e dos efeitos anti-micobacterianos (LOUGHEED *et al.*, 2009)

Além, disso, utilizamos neste trabalho a 2'2-bipiridina, devido as suas propriedades na inibição de MMPs e o anticorpo monoclonal anti-Gr-1 (clone RB6-8C5), largamente utilizado para deplecionar leucócitos que expressam Gr-1 na superfície celular, principalmente, os neutrófilos e monócitos inflamatórios (DALEY *et al.*, 2008)

O efeito terapêutico destes inibidores foi avaliado tanto no modelo de camundongos infectados com a cepa laboratorial, que reproduz a patologia granulomatosa amena no pulmão, como no modelo de infecção com a cepa M299, que reproduz a patologia necrótica. Analisamos em relação a produção de MMPs, a carga bacteriana, morbidade, histopatologia e os números de leucócitos mielóides no pulmão.

Os resultados obtidos demonstram que a Dox foi capaz de reduzir a produção da MMP-9 e MMP-8 pelas células do pulmão, o que foi observado tanto

nos sobrenadantes das culturas das células do pulmão quanto nos lavados broncoalveolares. Diferentemente da Dox, a BP fortemente inibiu atividade da MMP-9, mas não tinha efeito na MMP-8. O tratamento com anti-Gr-1 para deplecionar os neutrófilos e monócitos inflamatórios, principais células produtoras de MMP-9 e MMP-8, também foi eficaz na redução das MMPs produzidas no pulmão.

Interessante, que no ensaio de zimografia, que avalia a clivagem da gelatina pela forma ativa da gelatinase, nós observamos a formação de dupletes nas bandas de MMP-9, correspondentes a forma ativa (fragmento da enzima clivada de menor peso molecular) e a forma de zimogênio no qual o pró-domínio cobre a região catalítica impedindo a interação da proteína com o substrato. Porém, a interação tiol-Zinco pode ser rompida de forma não proteolítica devido do tratamento da amostra pelo detergente dodecil sulfato de sódio (SDS). Além disso, em tecidos e em células as MMPs podem se ancorar em outras macromoléculas levando ao rompimento alostérico da ligação tiol-zinco. (RA & PARKS, 2007). De toda forma, os tratamentos pelos fármacos utilizados neste trabalho, foram capazes de inibir tanto a forma ativa da MMP-9 quanto a produção da pro-enzima.

A quantificação da carga bacteriana demonstrou que todos os tratamentos testados foram capazes de inibir o crescimento de Mtb no pulmão, com a redução dos números de CFU por pulmão de 1 a 2 log. No caso dos tratamentos com a BP e com o anticorpo, a inibição foi provavelmente indireta, mediada pela redução do recrutamento das células mielóides permissíveis para replicação de micobactéria no pulmão, associada ou a depleção das células (anticorpo anti-Gr-1) ou a inibição de MMP-9 (BP) que contribui com a migração dos monócitos. No caso do tratamento com a Dox, a redução da carga bacteriana pode ser mediada tanto pelo efeito anti-micobacteriano direto, quanto pelo indireto. Nos animais infectados e tratados com Dox e BP foi avaliada também a carga bacteriana em fígado e baço. Os resultados demonstram que o tratamento com a Dox, mas não com a BP, reduziu a disseminação e o crescimento de Mtb no baço (redução de CFU cerca de 1 log). Não foi observado efeito na carga bacteriana no fígado. Apesar de a redução de CFU observada no pulmão e baço ter sido estatisticamente significativa, comparado com o grupo não tratado, diante a

relativamente pequena diferença no crescimento bacteriano entre os tratados e não tratados, a monoterapia com Dox ou BP não pode substituir a utilização dos fármacos anti-TB convencionais, de primeira linha. A possibilidade de combinar o tratamento com Dox ou BP com os fármacos anti-micobacterianos, como a rifampicina, ainda deve ser estudado, provavelmente tornaria mais eficaz a redução do crescimento micobacteriano, assim como a redução da patologia, pelo menos em casos da TB suscetível a drogas anti-TB da primeira linha.

A avaliação da perda de peso corporal dos animais infectados foi utilizada como um dos indicadores de morbidade. Neste trabalho, os camundongos foram infectados com a dose de infecção um pouco maior (200 bacilos) comparado com a dose comum (100 bacilos) para induzir a patologia necrótica em maioria dos animais infectados pela cepa hipervirulenta M299. Foi observada uma significativa perda do peso nos animais infectados por essa cepa no dia 28 comparado ao dia 0 ($p < 0.05$), sendo que metade dos animais perderam mais que 25% do peso inicial, que é considerado como a morbidade severa e há indicação a eutanásia para evitar o sofrimento do animal (o experimento foi finalizado neste dia). O tratamento dos animais com Dox e com BP reduziu levemente o peso corporal, mas essa diminuição não foi significativa. Entretanto, a depleção das células Gr-1-positivas, utilizando o anticorpo específico, foi capaz de proteger os animais contra a perda de peso, demonstrando que a hiperinflamação associada ao excessivo recrutamento de leucócitos, principalmente de neutrófilos e monócitos, contribuiu fortemente com a morbidade.

O peso do pulmão, que representa o principal foco da infecção e o recrutamento de leucócitos, levando ao desenvolvimento da pneumonia, também demonstra o grau da morbidade e da patologia. O aumento do peso do pulmão após a infecção com Mtb está relacionado não somente ao acúmulo do infiltrado celular, mas também ao edema associado a pneumonia. É importante destacar que todos os tipos de tratamentos utilizados reduziram o peso do pulmão, demonstrando efeito inibitório na patologia pulmonar.

Para estudar melhor o provável mecanismo do efeito terapêutico, foi realizado o estudo histopatológico com morfometria das lesões pulmonares. Os resultados demonstram que o tratamento com a Dox, diferentemente da BP, foi

capaz de reduzir o desenvolvimento do núcleo necrótico nas lesões, apesar da falta de efeito significativo na redução da pneumonia e preservação da área intra-alveolar aerada observada nos animais tratados com estes fármacos. Como já era esperado, o tratamento com anti-Gr-1 obteve maior eficácia, reduzindo todos os indicadores patológicos examinados. Apesar das áreas de pneumonia e de necrose não terem sido reduzidas nos animais tratados com a BP, os animais deste grupo, como os animais tratados com o anti-Gr-1, apresentaram a formação da cápsula fibrótica em torno do núcleo necrótico formado nas lesões pulmonares, que não foi observada em nenhum dos animais infectados e não tratados. A formação da capsula fibrótica é comum nos granulomas causados por Mtb ou micobactérias atípicas (KAARTEENAHO-WIIK *et al.*, 2006), e falta da formação de capsula pode servir como sinal da TB mal controlada, associada a expansão da pneumonia, por exemplo, durante a reativação da TB pós-primária (HUNTER, 2018). O desenvolvimento do colágeno em lesões pulmonares dos animais tratados nestes experimentos sugere o desenvolvimento mais lento da necrose pulmonar o que pode ser associado a inibição da produção de MMPs observada nos animais destes grupos.

A quantificação das subpopulações de células mielóides no pulmão em testes de citometria do fluxo demonstrou uma tendência a redução do número dessas células nos animais tratados com a Dox e com BP, que foi mais pronunciada em relação aos monócitos inflamatórios, e menor para os neutrófilos e células dendríticas. Entretanto, a significativa redução da produção de MMP-8 e MMP-9 nos animais tratados por estes fármacos, e principalmente pelo anticorpo de depleção anti-Gr-1, demonstra que até uma leve redução do número de neutrófilos e monócitos inflamatórios recrutados ao pulmão pode ter efeito benéfico na diminuição da patologia pulmonar.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a BP, que foi capaz de inibir a MMP-9, mas que diferentemente da Dox, não possui atividade antibacteriana própria, não apresentou efeito na redução da patologia. Neste sentido, o tratamento da TB com BP encontra as mesmas restrições que outros inibidores de MMPs.

O efeito do tratamento com a Dox no modelo murino da TB severa não foi estudado antes. Um estudo anterior da utilização de Dox no modelo da TB

experimental em porquinhos da Índia infectados pela cepa Mtb, que induziu a infecção pulmonar crônica com desenvolvimento da necrose intragranulomatosa após 8-10 semanas da infecção, não demonstrou o efeito da Dox na redução da patologia, apesar do efeito bacteriostático observado (WALKER *et al.*, 2012). A diferença do resultado obtido neste estudo (redução de desenvolvimento do núcleo necrótico na lesão) pode ser associada a diferença do modelo, sendo que nós utilizamos o modelo da TB agressiva, de desenvolvimento acelerado da patologia necrótica pulmonar associado com a hipervirulência da bactéria. Estes resultados sugerem que a utilização da Dox para o tratamento da TB pode beneficiar mais os pacientes com perfil hiperinflamatório, com patologia necrótica no pulmão associada ao acúmulo acelerado de neutrófilos e outras células inflamatórias. De acordo com essa hipótese, não foi observado algum efeito na morbidade dos animais infectados com a cepa laboratorial H37Rv de baixa virulência que causou desenvolvimento lento da patologia pulmonar escassa.

Nos trabalhos anteriores, o tratamento com Dox apresentou efeito terapêutico de redução da patologia em diferentes modelos da injúria do pulmão, incluindo os modelos da doença infecciosa, sendo que o efeito na patologia foi mediado pela inibição de MMPs e redução do acúmulo dos neutrófilos (FUJITA *et al.*, 2007; MOON *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2012)

Estes resultados e a observação que a Dox apresenta efeito bacteriostático na Mtb (WALKER *et al.*, 2012) incentivaram testes clínicos do tratamento adjunto da TB pulmonar pela Dox. Os primeiros resultados do ensaio clínico randomizado controlado de fase II realizado em Singapura foram publicados recentemente (ONG *et al.*, 2019-poster). Neste estudo foram incluídos os pacientes com diferentes manifestações radiológicas da TB pulmonar, de larga faixa etária entre 21 a 70 anos, sem co-morbidades. Os resultados demonstram que o tratamento dos pacientes (n=15) com Dox por 14 dias em combinação com a terapia convencional antibacteriana da TB inibiu significativamente as quantidades de MMP-1, -8, -9, -12 e MMP-13 no escarro com concomitante redução da degradação de elastina e de colágeno tipo I, o que correlacionou a redução posterior de MMP-8 e MMP-9 no plasma (no dia 56 a partir da data de início do tratamento), demonstrando o efeito sistêmico. Entretanto, não foram observadas alterações nos resultados do teste de raio X

nas eventuais cavidades presentes no pulmão ou na carga bacteriana do escarro. Apesar da falta do efeito de tratamento na patologia já estabelecida no pulmão, foi observada a redução da degradação de proteínas da matriz extracelular que pode contribuir com a prevenção ou inibição do desenvolvimento de novos focos da necrose no pulmão. De acordo com essa hipótese, foi observada a inibição do desenvolvimento do núcleo necrótico nas lesões pulmonares em nossos experimentos nos camundongos.

Os resultados obtidos nos modelos animais, que demonstram maior efeito da Dox na patologia pulmonar em casos da TB pulmonar agressiva, podem sugerir que a seleção mais rigorosa de pacientes para a terapia adjunta com a Dox, selecionando pacientes com o perfil hiperinflamatório (níveis elevados no sangue dos PMFs, MMPs, proteína C reativa) e a patologia necrótica ou destrutiva no pulmão (pneumonia tuberculosa, cavernas) pode aumentar o efeito terapêutico na redução da patologia pulmonar. O estabelecimento da combinação de biomarcadores que podem ser utilizados para a seleção de pacientes para o tratamento com a doxiciclina, ou com os fármacos anti-inflamatórios em geral, deve ser realizado ainda. Atualmente, o tratamento anti-inflamatório, utilizando corticosteroides, é indicado somente para a meningite tuberculosa e em casos de IRIS (síndrome inflamatório de reconstituição imune) em pacientes com TB e AIDS que recebem a terapia anti-retroviral. Não foi observada a melhoria clínica como resultado consistente nos pacientes com TB pulmonar que receberam o tratamento com corticosteroides (SCHUTZ *et al.*, 2018), provavelmente por causa da falta de critérios para a seleção de pacientes neste grupo que podem ser beneficiados pelo tratamento anti-inflamatório. Entretanto, em alguns casos específicos da TB pulmonar agressiva, como na pneumonia tuberculosa necrotizante primária no paciente adulto sem imunodeficiência (NGUYEN *et al.*, 2019) ou em casos de falência respiratória aguda associada a TB (YANG *et al.*, 2016), o tratamento adjunto dos pacientes com corticosteroides foi eficaz, aumentando significativamente a sobrevivência - A utilização da doxiciclina em casos de TB pulmonar grave, principalmente em casos da TB-MDR mais difíceis para o tratamento, ainda deve ser estudada. O sinergismo da Dox e alguns novos fármacos, indicados para tratamento da TB-

MDR, na inibição do crescimento de *Mtb in vitro* (BRUHN *et al.*, 2015), deve incentivar estes testes.

Em conclusão, os resultados obtidos neste trabalho demonstram o efeito moderado da Dox na redução das lesões patológicas no pulmão, que foi observado principalmente na redução da patologia necrótica. A utilização deste antibiótico em combinação com os fármacos anti-TB convencionais pode aumentar o efeito terapêutico, diminuindo o crescimento micobacteriano e reduzindo o desenvolvimento da patologia necrótica, que por sua vez, pode melhorar a eliminação de *Mtb* e reduzir o tempo de tratamento anti-TB, já que a necrose reduz a eficácia do tratamento medicamentoso. Planejamos realizar os testes da terapia adjunta da Dox, em combinação com diferentes fármacos anti-TB convencionais e novos em nossos trabalhos futuros.

7- CONCLUSÕES

1. As cepas de Mtb aumentam a produção de MMPs (gelatinases MMP-9 e MMP-2 e da colagenase MMP-8) no pulmão dos camundongos infectados, sendo que a cepa de maior virulência induz a produção significativamente maior comparado com a cepa laboratorial, de menor virulência;

2. A análise imunoistoquímica do pulmão no dia 28 pós-infecção demonstrou, que as gelatinases MMP-9 e MMP-2, como seu indutor EMMPRIN, foram expressas e produzidas principalmente pelas células do parênquima (epitélio alveolar e bronquiolar, paredes alveolares), macrófagos alveolares e monócitos recrutados ao pulmão, enquanto a MMP-8 foi expressa por neutrófilos;

3. Os focos de necrose caseosa, desenvolvidos na região central das áreas de alveolite associadas a infiltração intra-alveolar de células mielóides - produtoras de MMPs, foram marcados com MMP-9, MMP-2 e MMP-8 na imunoistoquímica, sugerindo que a morte dessas células e liberação de MMPs ativas contribuiu para o desenvolvimento da necrose;

4. O tratamento dos animais com Dox e com anticorpo monoclonal anti-Gr-1 reduziu a produção das MMP-9, MMP-2 e MMP-8 no pulmão, enquanto que o tratamento com BP inibiu seletivamente as gelatinases, sem efeito significativo na MMP-8;

5. O tratamento dos animais com Dox, BP e com o anticorpo anti-Gr-1 reduziu o recrutamento de monócitos inflamatórios e de neutrófilos ao pulmão, que foi particularmente menor nos animais tratados com anti-Gr-1;

6. A redução do recrutamento de monócitos e neutrófilos ao pulmão, que são células permissíveis para o crescimento de micobactérias fagocitadas, reduziu indiretamente a carga bacteriana no pulmão, o que não exclui o efeito direto da Dox na eliminação de micobactéria;

7. Os tratamentos dos animais com os fármacos utilizados neste trabalho reduziram o peso do pulmão que foi significativamente maior no grupo dos animais infectados pela cepa M299 e não tratados, sugerindo a redução da inflamação e da patologia nos animais tratados;

8. A maior taxa de redução da patologia pulmonar foi observada nos animais tratados com o anticorpo anti-Gr-1, que efetivamente deplecionou as células Gr-1, reduzindo a migração de neutrófilos e de monócitos inflamatórios ao pulmão;

9. O tratamento com Dox foi capaz de reduzir o desenvolvimento da necrose nas lesões, mas não diminuiu significativamente a área envolvida na pneumonia, demonstrando um efeito moderado na redução da patologia comparado com o efeito da depleção celular com anti-Gr-1.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, A.M., Gey van Pittius, N.C., Champion, P.A., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke-Grauls, C.M., Appelmelk, B.J., Bitter, W. (2007). Type VII secretion–mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*; 5:883-91; PMID:17922044

Adams, K.N., Takaki, K., Connolly, L.E., Wiedenhoft, H., Winglee, K., Humbert, O., Edelstein, P.H., Cosma, C.L., Ramakrishnan, L. (2011). Drug tolerance in replicating mycobacteria mediated by a macro-phage-induced efflux mechanism. *Cell*, 145:39–53

Agrawal, S.M., Williamson, J., Sharma, R., Kebir, H., Patel, K., Prat, A. & Yong, V.W. (2013) Extracellular matrix metalloproteinase inducer shows active perivascular cuffs in multiple sclerosis. *Brain* 136, 1760–1777.

Andersson, D.I. & Hughes, D. (2011) Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5); 901–911

Andrade, M.R., Amaral, E.P., Ribeiro, S.C., Almeida, F.M., Peres, T.V., Lanes, V., D'Império-Lima, M.R., Lasunskaja, E.B. (2012). Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiol.* 12:166.

Al-Saedi, M. & Al-Hajoj, S. (2017) Diversity and evolution of drug resistance mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Drug Resistance* 2017:10 333–342

Andersson, D.I., Hughes, D. (2010) Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.*;8(4):260–271

Axelrod, S., Oschkinat, H., Enders, J., Schlegel, B., Brinkmann, V., Kaufmann, S.H., Haas, A. & Schaible, U.E. (2008) Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. *Cell Microbiol*; 10: 1530-45; PMID:18363878

Bai, Y., Huang, W., Ma, L. T., Jiang, J. L., Chen, Z. N. (2014) Importance of N-glycosylation on CD147 for its biological functions. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 6356–6377.

Bañuls, A.L., Sanou, A., Anh, N.T. & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology* 64, 1261–1269

Behar, S.M., Carpentera, S.M., Bootya, M.G., Barberf, D.L., Jayaraman, P. (2014) Orchestration of pulmonary T cell immunity during *Mycobacterium tuberculosis* infection: Immunity interruptus. *Seminars in Immunology* 26:559–577

Bhattacharyya, P., Paul, R., Bhattacharjee, P., Ghosh, A., Dey, R., Ghosh, M., Sharma, M. (2010) Long-term use of doxycycline can improve chronic asthma and possibly remodeling: the result of a pilot observation. *J Asthma Allergy*;5:33–37

Biernacka, A., Dobaczewski, M., Frangogiannis, N.G. (2011). TGF- β signaling in fibrosis. *Growth Factors* 29, 196–202

Bomanji, J.B., Gupta, N., Gulati, P., Das, C.J. (2015) Imaging in tuberculosis. In: Kaufmann SHE, Rubin EJ, Zumla A, eds. *Tuberculosis*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2015:481–503.

Boehme, C.C., Nabeta, P., Hillemann, D., Nicol, M.P., Shenai, S., Krapp, F., Allen, J., Tech, B., Tahirli, R., Blakemore, R., Rustomjee, R., Milovic, A., Jones, M. & O'Brien, S.M., Persing, D.H., Ruesch-Gerdes, S., Gotuzzo, E., Rodrigues,

C., Alland, D., & Perkins, M.D. (2010). Rap' id molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363:1005–15

Bourboulia, D. & Stetler-Stevenson, W.G. (2010) Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*;20(3):161-8.

Brandli O. (1998). The clinical presentation of tuberculosis. *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 65:97–105

Brew, K. & Nagase, H. (2010) The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*;1803:55–71

Brites, D. & Gagneux, S. (2017). The Nature and Evolution of Genomic Diversity in the Mycobacterium tuberculosis Complex. Springer International Publishing. 1-26

Brites D. & Gagneux, S. (2015) Co-evolution of Mycobacterium tuberculosis and Homo sapiens. *Immunol Rev* 264(1):6–24.

Brooks, S.A., Lomax-Browne, H.J., Carter, T.M., Kinch, C.E., Hall, D.M. (2010). Molecular inter- actions in cancer cell metastasis. *Acta Histochem*;112:3–25

Broset, E., Martín, C., Gonzalo-Asensio, J. (2015). Evolutionary Landscape of the Mycobacterium tuberculosis Complex from the Viewpoint of PhoPR: Implications for Virulence Regulation and Application to Vaccine Development. *mBio* 6(5):e01289-15.

Brosch, R., Gordon, S. V., Marmiesse, M., Brodin, P., Buchrieser, C., Eiglmeier, K., Garnier, T., Gutierrez, C., Hewinson, G., Kremer, K Parsons, ., L. M., Pym, A. S., Samper, S., van Soolingen, D. & Cole, S. T. (2002). A new evolutionary scenario for the Mycobacterium tuberculosis complex. *PNAS* 99(6), 3684–3689

Brudey, K., Driscoll, J.R., Rigouts, L., Prodinger, W.M., Gori, A., Al-Hajoj, S. A., Allix, C., Aristimuño, L., Arora, J., Baumanis, V., Binder, L., Cafrune, P., Cataldi, A., Cheong, S., Diel, R., Ellermeier, C., Evans, J.T., Fauville-Dufaux, M., Ferdinand, S., Viedma, D.G., Garzelli, C., Gazzola, L., Gomes, H.M., Guttierrez, M.C., Hawkey, P.M., Helden, P.D., Kadival, G.V., Kreiswirth, B.N., Kremer, K., Kubin, M., Kulkarni, S.P., Liens, B., Lillebaek, T., Ly,H.M., Martin, C., Martin, C., Mokrousov, I., Narvskaja, O., Ngeow, Y.F., Naumann, L., Niemann, S., Parwati, I., Rahim, Z., Rasolofa-Razanamparany, V., Rasolonalona, T., Rossetti, M.L., Rüsç-Gerdes, S., Sajduda, A., Samper, S., Shemyakin, I.G., Singh, U.B., Somoskovi, A., Skuce, R.A., Soolingen, D., Streicher, E.M., Suffys, P.N., Tortoli, E., Tracevska, T., Vincent, V., Victor, T.C., Warren, R.M., Yap, S.F., Zaman, K., Portaels, F., Rastogi, N. & Sola, C. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the Fourth International Spoligotyping Database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol* 6, 23

Bruhn, D.F., Scherman, M.S., Liu, J., Scherbakov, D., Meibohm, B., Böttger, E.C., Lenaerts, A.J., Lee, R.E. (2015) *In vitro* and *in vivo* Evaluation of Synergism between Anti-Tubercular Spectinamides and Non-Classical Tuberculosis Antibiotics. *Sci Rep.*, 14;5:13985

Casanova, J. & Abel, L. (2002) Genetic dissection of immunity to mycobacteria: the human model. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 581–620

CCDC (2007). Center for Communicable Disease Control and Prevention. Reported Tuberculosis in the United States, 2007. Atlanta, GA: US Dep. Health Hum. Serv

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Trends in tuberculosis—United States, 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2008; 57(11):281–285

Clark, I.M., Swingler, T.E., Sampieri, C.L. & Edwards, D.R. (2008) The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 1362–1378

Chernov, A.V. & Strongin, A.Y. (2011) Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer. *Biomol. Concepts* 2, 135–147

Colombo, M.I., Gutierrez, M.G. & Romano, P.S. (2006). The two faces of autophagy: Coxiella and Mycobacterium. *Autophagy* 2:162–64

Cooper, A.M. (2009). Cell-Mediated Immune Responses in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27:393–422

Comas, I., Coscolla, M., Luo, T., Borrell, S., Holt, K.E., Kato-Maeda, M., Parkhill, J., Malla, B., Berg, S., Thwaites, G., Yeboah-Manu, D., Bothamley, G., Mei, J., Wei, L., Bentley, S., Harris, S.R., Niemann, S., Diel, R., Aseffa, A., Gao, Q., Young D. & Gagneux, S. (2013). Out-of-Africa migration and Neolithic co-expansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. *Nat Genet* 45(10): 1176–1182.

Comas, I., Chakravarti, J., Small, P.M., Galagan, J., Niemann, S., Kremer, K., Ernst, J.D. & Gagneux, S. (2010). Human T cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* are evolutionarily hyperconserved. *Nature Genetics* 42(6): 498-505.

Cruz, A., Fraga, A.G., Fountain, J.J., Rangel-Moreno, J., Torrado, E., Saraiva, M., Pereira, D.R., Randall, T.D., Pedrosa, J., Cooper, A.M., Castro, A.G. (2010) Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*;207:1609–16.

Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S. Albina, J.E. (2008) Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *Journal of leukocyte biology* Volume 83.

Daffé, M. & Etienne G. (1999) The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease* 79(3), 153–169

Dalvi, P.S., Singh, A., Trivedi, H.R., Ghanchi, F.D., Parmar, D.M., Mistry, S.D. (2011) Effect of doxycycline in patients of moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease with stable symptoms. *Ann Thorac Med*;6:221–226.

Darrah, P.A., Patel, D.T., De Luca, P.M., Lindsay, R.W., Davey, D.F., Flynn, B.J., Hoff, S.T., Andersen, P., Reed, S.G., Morris, S.L., Roederer, M., Seder, R.A. (2007) Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med.*;13(7):843-50.

Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J., Angel, P., Heath, J.K. (1987). Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. *EMBO J.* 6, 1899–1904

Escocard R, Kanashiro MM, Petretski JH, Azevedo-Silva J, Queiroz de Carvalho EC, Dias da Silva W, Kipnis TL. (2006) Neutrophils regulate the

expression of cytokines, chemokines and nitric oxide synthase/nitric oxide in mice injected with *Bothrops atrox* venom. *Immunobiology*. 211(1-2):37-46.

Eum, S.Y., Kong, J.H., Hong, M.S., Lee, Y.J., Kim, J.H., Hwang, S.H., Cho, S.N., Via, L.E., Barry, C.E. 3rd. (2010) Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. *Chest* 137: 122–128

Fabre, M., Hauck, Y., Soler, C., Koeck, J. L., van Ingen, J., van Soolingen, D., Vergnaud, G. & Pourcel, C. (2010). Molecular characteristics of *Mycobacterium canettii* the smooth *Mycobacterium tuberculosis* bacilli. *Infect Genet Evol* 10, 1165–1173

Forrellad, M.A., Klepp, L.I., Gioffré, A., García, J.S., Morbidoni, H.R., Santangelo, M.P., Cataldi, A.A. & Bigi, F. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 4:1, 3–66

Fox, W., Ellard, G.A. & Mitchison, D.A. (1999). Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by the British Medical Research Council Tuberculosis Units, 1946–1986, with relevant subsequent publications. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 3(Suppl.):S231–79

Fujita, M., Harada, E., Ikegame, S., Ye, Q., Ouchi, H., Inoshima, I., Nakanishi, Y. (2007) Doxycycline attenuated lung injury by its biological effect apart from its antimicrobial function. *Pulmonary Pharmacol. Therapeutics* 2007, 20, 669–675);

Gapski, R., Hasturk, H., Van Dyke, T.E., Oringer, R.J., Wang, S., Braun, T.M., Giannobile, W.V. (2009) Systemic MMP inhibition for periodontal wound repair: results of a multi-centre randomized-controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*;36:149–156.

Garib, F. Y. & Rizopulu, A.P. (2012). Interactions of pathogenic bacteria with the innate immune reactions of host. *Russian Journal of Infection Immunity*, 2(3)

Gagneux, S. (2012). Host–pathogen coevolution in human tuberculosis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 367, 850–859

Ghodbane, R., Mba Medie, F., Lepidi, H., Nappez, C. & Drancourt, M. (2014). Long-term survival of tuberculosis complex mycobacteria in soil. *Microbiology* 160, 496–501

Garamszegi, N., Garamszegi, S.P., Samavarchi-Tehrani, P., Walford, E., Schneiderbauer, M.M., Wrana, J.L., Scully, S.P. (2010) Extracellular matrix-induced transforming growth factor-beta receptor signaling dynamics. *Oncogene*, 29, 2368–2380

Goetzl, E.J., Banda, M.J., Leppert, D. (1996) Matrix metalloproteinases in immunity. *J. Immunol.* 156, 1–4

Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Wei-Jen Chua, W.J., Yik Y. L. Yu, Y.Y.L., Lantz, O., Cook, M.S., Null M.D., Jacoby, D.B., Harriff, M.J., Lewinsohn, D.A., Hansen, T.H., Lewinsohn, D.M.. (2010) Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol* 8: e1000407

Goldberg, M.F., Saini, N.K., Porcelli, S.A. (2014) *Microbiol Spectrum*; 2(5):MGM2-0005-2013.

Gonzalo-Asensio, J., Malaga, W., Pawlike, A., Astarie-Dequeker, C., Passemar, C., Moreau, F., Laval, F., Daffé, M., Martin, C., Brosche, R. & Guilhot, C. (2014). Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *PNAS*, 111(31), 11491–11496

Green, J.A., Elkington, P.T., Pennington, C.J., Roncaroli, F., Dholakia, S., Moores, R.C., Bullen, A., Porter, J.C., Agranoff, D., Edwards, D.R., Friedland, J.S. (2010) Mycobacterium tuberculosis upregulates microglial matrix metalloproteinase-1 and -3 expression and secretion via NF-kappaB and Activator Protein-1-dependent monocyte networks. *J Immunol*;184:6492–6503

Grosset, J. (2003) *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob Agents Chemother*, 47:833-836

Gu, Y., Walker, C., Ryan, M.E., Payne, J.B. & Golub, L.M. (2012) Non-antibacterial tetracycline formulations: clinical applications in dentistry and medicine. *J Oral Microbiol* 4:19227

Hahn, J.N., Kaushik, D.K. & Yong, V.W. (2015) The role of EMMPRIN in T cell biology and immunological diseases. *J Leukoc Biol*;98(1):33-48.

Harrington, L.E., Janowski, K.M., Oliver, J.R., Zajac, A.J., Weaver, C.T. (2008) Memory CD4 T cells emerge from effector T-cell progenitors. *Nature*; 452:356–60

Hernandez-Barrantes S., Toth, M., Bernardo, M.M., Yurkova, M., Gervasi, D.C., Raz, Y., Sang, Q.A., Fridman, R. (2000) Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem*. 21; 275(16):12080-9.

Hidalgo, M. & Eckhardt, S.G. (2001). Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93: 178-193

Hunter R.L. The Pathogenesis of Tuberculosis: The Early Infiltrate of Post-primary (Adult Pulmonary) (2018) Tuberculosis: A Distinct Disease Entity. *Front Immunol.*; 9:2108

Ihms, E.A., Urbanowski, M.E., Bishai, W.R. (2018). Diverse cavity types and evidence that mechanical action on the necrotic granuloma drives tuberculous cavitation. *The American Journal of Pathology*, 1-10.

Jaeger, S., Karargyris, A., Candemir, S., Folio, L., Siegelman, J., Callaghan, F., Xue, Z., Palaniappan, K., Singh, R.K., Antani, S., Thoma, G., Wang, Y.X., Lu, P.X. & McDonald C.J. (2014) Automatic tuberculosis screening using chest radiographs. *IEEE Trans Med Imaging*; 33:233–45

Jones, B.E., Young, S.M., Antoniskis, D., Davidson, P.T., Kramer, F. & Barnes, P.F. (1993) Relationship of the manifestations of tuberculosis to CD4 cell counts in patients with human immunodeficiency virus infection. *Am Rev Respir Dis.*; 148(5):1292–1297

Kadler, K.E., Hill, A. & Canty-Laird, E.G. (2008) Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol*;20:495–501

Kaarteenaho-Wiik, R., Sademies, O., Pääkkö, P., Risteli, J., Soini, Y. (2007) Extracellular matrix proteins and myofibroblasts in granulomas of sarcoidosis, atypical mycobacteriosis, and tuberculosis of the lung. *Hum Pathol*. Jan;38(1):147-53

Kaufmann, S.H., Evans, T.G. & Hanekom, W.A. (2015) Tuberculosis vaccines: time for a global strategy. *Sci Transl Med*; 7:276fs8

Kaech, S.M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. (2002) Molecular and Functional Profiling of Memory CD8 T Cell Differentiation. *Cell*, 111, 837-851

Khokha, R., Murthy, A., Weiss, A. (2013) Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*;13:649–665.

Lasunskiaia, E., Ribeiro, S.C., Manicheva, O., Gomes, L.L., Suffys, P.N., Mokrousov, I., Ferrazoli, L., Andrade, M.R., Kritski, A., Otten, T., Kipnis, T.L., da Silva, W.D., Vishnevsky, B., Oliveira, M.M., Gomes, H.M., Baptista, I.F. & Narvskaya, O. (2010) Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype virulence circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced. *J Clin Microbiol*;12:467e75

Lougheed, K.E., Taylor, D.L., Osborne, S.A., Bryans, J.S., Buxton, R.S. (2009) New Anti-tuberculosis Agents Amongst Known Drugs Tuberculosis (Edinb);89(5):364-70.

Levin, B. R. (1996). The evolution and maintenance of virulence in microparasites. *Emerg Infect Dis* 2, 93–102

Li, G., Zhang, J., Guo, Q., Jiang, Y., Wei, J., Zhao, L., Zhao, X., Lu, J. & Wan, K. (2015) Efflux pump gene expression in multidrugresistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *PLoS One*;10(2):e0119013

Li, Y., Wang, Y. & Liu, X. (2012) The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. *Clin Dev Immunol* 2012: 791392

McGrath, M., Gey, N. C., van Pittius, van Helden, P. D., Warren, R. M. & Warner, D. F. (2014) Mutation rate and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*; 69: 292 – 302

Mdluli, K., Spigelman M. (2006) Novel targets for tuberculosis drug discovery. *Curr Opin Pharmacol*; 6:459–467

Mitchison, D.A. (1993). Assessment of new sterilizing drugs for treating pulmonary tuberculosis by culture at 2 months. *Am. Rev. Respir. Dis.* 147: 1062–63

Moon, A., Gil, S., Gill, S.E., Chen, P., Matute-Bello, G.(2012) Doxycycline impairs neutrophil migration to the airspaces of the lung in mice exposed to intratracheal lipopolysaccharide. *J. Inflammation*, 9:31

Mougous J.D., Petzold, C.J., Senaratne, R.H., Lee, D.H., Akey, D.L., Lin, F.L., Munchel, S.E., Pratt, M.R., Riley, L.W., Leary, J.A., Berger, J.M. & Bertozzi, C.R. (2004) Identification, function and structure of the mycobacterial sulfotransferase that initiates sulfolipid-1 biosynthesis. *Nat Struct Mol Biol*; 11:721-9; PMID:15258569

Muramatsu, T., Miyauchi, T. (2003) Basigin (CD147): a multifunctional transmembrane protein involved in reproduction, neural function, inflammation and tumor invasion *Histol Histopathol*;18(3):981-7

Nagase, H., Visse, R. & Murphy, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*; 69:562–573.

Nguyen, H.L., Duong, Thanh, H., Le, T.V., Tran, Van, N. (2019) *Mycobacterium tuberculosis*-Associated Necrotizing Pneumonia With Adjunctive Corticosteroid Therapy. *Case Rep Infect Dis.*; 1;2019:9068516;

Negi, A.S., Kumar, J.K., Luqman, S., Saikia, D., & Khanuja, S.P.S. (2010). Antitubercular Potential of Plants: A Brief Account of Some Important Molecules. *Medicinal Research Reviews*, Vol. 30, No. 4, 603--645

Nelson, C.M. & Bissell, M.J. (2006) Of extracellular matrix, scaffolds, and signaling: tissue architecture regulates development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*;22:287–309

Ng, H.H., Narasaraju, T., Phoon, M.C., Sim, M.K., Seet, J.E., Chow, V.T. (2012) Doxycycline treatment attenuates acute lung injury in mice infected with virulent influenza H3N2 virus: involvement of matrix metalloproteinases. *Exp Mol Pathol.*;92(3):287-95

O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., Berry, M.P. (2013) The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol.*; 31:475-527

Ong, C.W.M., Elkington P.T. & Friedland, J.S. (2014) Tuberculosis, Pulmonary Cavitation, and Matrix Metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 190, Iss 1, pp 9–18

Ong, C., Miow, Q.H., Wang, Y., Teo, F., Wang, A., Loh, H.R., Jia Mei Hong, J.M., Ding, Y., Gan, S.H., She, H.W., Paton, N., Singhal, A., Tambyah, P., Chee, C., Wang, Y.T., Elkington, P., Jon S. Friedland, J.S. (2019). Matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor doxycycline suppresses systemic and respiratory MMPs in patients with pulmonary tuberculosis: results from a phase II randomised-controlled trial. Poster P1042. 29 European congress of clinical microbiology and infectious diseases ECCMID Congress Amsterdam

Ordóñez, A.A., Tasneen, R., Pokkali, S., Xu, Z., Converse, P.J., Klunk, M.H., Mollura, D.J., Nuernberger E.L. & Jain, S.K. (2016) Mouse model of pulmonary cavitory tuberculosis and expression of matrix metalloproteinase-9| *Disease Models & Mechanisms* 9, 779-788

Ordóñez, A.A., Pokkali, S., Sanchez-Bautista, J., Klunk, M.H., Urbanowski, M.E., Kübler, A., Bishai, W.R., Elkington, P.T. & Jain, S.K. (2018) Matrix Metalloproteinase Inhibition in a Murine Model of Cavitory Tuberculosis Paradoxically Worsens Pathology. *J Infect Dis.*

Organização Mundial da Saúde, 2018 - WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global tuberculosis control: WHO report 2019

Orme, I.M. (2014) A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. *Tuberculosis*; 94(1):8-14.

Orme, I.M., Robinson, R.T. & Cooper, A.M. (2015) The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nat Immunol.*;16(1):57-63.

Ohol, Y.M., Goetz, D.H., Chan, K., Shiloh, M.U., Craik, C.S., Cox, J.S. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe*; 7:210-20; PMID: 20227664

Parasa, V.R., Muvva, J.R., Rose, J.F., Braian, C., Brighenti, S. & Lerm, M. (2017) Inhibition of Tissue Matrix Metalloproteinases Interferes with *Mycobacterium tuberculosis*-Induced Granuloma Formation and Reduces Bacterial Load in a Human Lung Tissue Model. *Front. Microbiol.* 8:2370.

Peddireddy, V., Doddam, S.N. & Ahmed, N. (2017) *Mycobacterial* Dormancy Systems and Host Responses in Tuberculosis. *Frontiers in Immunology.* Volume 8 Article 84

Plano Nacional de Tuberculose, 2018 – Boletim Epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. Vol 49, nº 11.

Preshaw P. (2000). Host modulation therapy with anti-inflammatory agents. *Periodontology*; 76:131-149

Pym, A.S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K.E., Marchal, G., Leclerc, C., Cole, S.T. (2003) Recombinant BCG

exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat Med*; 9:533-9; PMID:12692540;

Radisky, E.S., Raeeszadeh-Sarmazdeh, M. & Radisky, D.C. (2017) Therapeutic Potential of Matrix Metalloproteinase Inhibition in Breast Cancer. *J Cell Biochem*;118(11):3531-3548

Rand, L., Green, J.A., Saraiva, L., Friedland, J.S., Elkington, P.T. (2009) Matrix metalloproteinase-1 is regulated in tuberculosis by a p38 MAPK-dependent, p-aminosalicylic acid-sensitive signaling cascade. *J Immunol*;182:5865–5872.

Simmons, C.P., Thwaites, G.E., Quyen, N.T., Chau, T.T., Mai, P.P., Dung, N.T., Stepniewska, K., White, N.J., Hien, T.T., Farrar, J. (2005) The clinical benefit of adjunctive dexamethasone in tuberculous meningitis is not associated with measurable attenuation of peripheral or local immune responses. *J Immunol*;175:579–590.

Ra, H.J. & Parks, W.C. (2007) Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biology*; 26: 587–596

Ray, J.M. & Stetler-Stevenson, W.G. (1994) The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7:2062–2072

Roberts, C.A., Pfister, L.A. & Mays, S. (2009). Letter to the editor: was tuberculosis present in *Homo erectus* in Turkey? *Am J Phys Anthropol* 139, 442–444

Reichman, L.B. (1979). Tuberculin skin testing. The state of the art. *Chest* 76:764–70

Richeldi, L. (2006). An update on the diagnosis of tuberculosis infection. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:736–42

Ribeiro, S.C.M., Gomes, L.L., Amaral, E.P., Andrade, M.R.M., Fabricio M. Almeida, F.M., Rezende, A.L., Lanes, V.R., Carvalho, E.C.Q., Philip N. Suffys, P.N., Mokrousov, I., Lasunskaja, E.B. (2014). *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*; 52(7), 2615–2624

Romagnoli, A., Etna, M.P., Giacomini, E., Pardini, M., Remoli, M.E., Corazzari, M., et al. (2012) ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy* 8: 1357–1370

Russell, D. (2005) *Mycobacterium tuberculosis*: the indigestible microbe. In *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*. Cole, S.T., Eisenach, K.D., McMurray, D.N., Jacobs, W.R., Jr (eds). Washington, DC: American Society for Microbiology Press, pp. 427–436

Saunders, B.M. & Britton, W.J. (2007) Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*;85:103–11

Schoch, O.D., Rieder, P., Tueller, C., Altpeter, E., Zellweger, J.P., Rieder, H.L., Krause, M. & Thurnheer, R. (2007). Diagnostic yield of sputum, induced sputum, and bronchoscopy after radiologic tuberculosis screening. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 175:80–86

Schutz, C., Davis, A.G., Sossen, B., Lai, R.P., Ntsekhe, M., Harley, Y.X., Wilkinson, R.J. (2018) Corticosteroids as an adjunct to tuberculosis therapy. *Expert Rev Respir Med*;12(10):881-891.

Sia, J.K., Georgieva, M. & Rengarajan, J. (2015) Innate Immune Defenses in Human Tuberculosis: An Overview of the Interactions between *Mycobacterium*

tuberculosis and Innate Immune Cells. Journal of Immunology Research; Volume 2015, Article ID 747543

Singhal A, Jie L, Kumar P, Hong GS, Leow MK-S, Paleja, B., Tsenova, L., Kurepina, N., Chen, J., Zolezzi, F., Kreiswirth, B., Poidinger, M., Chee, C., Kaplan, G., Wang, Y.T., De Libero, G. (2014) Metformin as adjunct antituberculosis therapy. *Sci Transl Med*, 6:263ra159

Soslau, G., Mason, C., Lynch, S., Benjamin, J., Ashak, D., Prakash, J.M., Moore, A., Bagsiyao, P., Albert, T., Mathew, L.M., Jost, M. (2014) Intracellular matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates human platelet activation via hydrolysis of talin. *Thromb Haemost*; 111: 140–153.

Storla, D.G., Yimer, S. & Bjune, G.A. (2008). A systematic review of delay in the diagnosis and treatment of tuberculosis. *BMC Public Health* 8:15

Stanley, S.A., Barczak, A.K., Silvis, M.R., Luo, S.S., Sogi, K., Vokes, M., Bray, M.A., Carpenter, A.E., Moore, C.B., Siddiqi, N., Rubin, E.J., Hung, D. (2014) Identification of host-targeted small molecules that restrict intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth. *PLoS Pathog* 10:e1003946

Steingart, K.R., Henry, M., Ng, V., Hopewell, P.C., Ramsay, A., Cunningham, J., Urbanczik, R., Perkins, M., Aziz, M.A. & Pai, M. (2006). Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 6:570–81

Steingart, K.R., Flores, L.L., Dendukuri, N., Schiller, I., Laal, S., Ramsay, A., Hopewell, P.C., Pai, M. (2011) Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extrapulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*; 8:e1001062.

Sunnetcioglu, A., Sunnetcioglu, M., Binici, I., Baran, A.I., Karahocagil, M.K. & Saydan, M.R. (2015) Comparative analysis of pulmonary and extrapulmonary tuberculosis of 411 cases. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14:34

Thwaites, G.E., Nguyen, D.B., Nguyen, H.D., Hoang, T.Q., Do, T.T., Nguyen, T.C., Nguyen, Q.H., Nguyen, T.T., Nguyen, N.H., Nguyen, T.N., Nguyen H.D., Tuan, V.N., Hiep, C.H., Chau, T.T.H., Mai, P.P., Dung, N.T., Stepniewska, K., White, N.J., Hien, T.T., Jeremy, J. & Farrar, J.J. (2004) Dexamethasone for the treatment of tuberculous meningitis in adolescents and adults. *N Engl J Med* 2004;351:1741–1751

Tischler, A. D., and McKinney, J. D. (2011). *The Immune Response to Infection* (Kaufmann, S. H. E., Rouse, B. T., and Sachs, D. L., eds.) ASM Press, Washington, DC, pp. 425-440

Torrado, E., Robinson, R.T., Cooper, A.M. (2011) Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol.*;32(2):66-72.

Tortora, G.J. *Microbiologia [recurso eletrônico]*. 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

Urbanowski, M.E., Ihms, E.A., Bigelow, K., Kübler, A., Elkington, P.T., Bishai, W.R. (2018) Repetitive Aerosol Exposure Promotes Cavitory Tuberculosis and Enables Screening for Targeted Inhibitors of Extensive Lung Destruction. *J Infect Dis*;218(1):53-63.

Van Rhijn, I., Nguyen, T.K., Michel, A., Cooper, D., Govaerts, M., Cheng, T.Y., van Eden, W., Moody, D.B., Coetzer, J.A., Rutten, V., Koets, A.P. (2009). Low cross-reactivity of T-cell responses against lipids from *Mycobacterium bovis* and *M. avium* paratuberculosis during natural infection. *Eur. J. Immunol.* 39:3031–41

Volkman, H.E., Pozos, T.C., Zheng, J., Davis, J.M., Rawls, J.F. & Ramakrishnan, L. (2010). Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. *Science* 327, 466–469

Yang, D. & Kong, Y. (2015) The bacterial and host factors associated with extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* *Biol (Beijing)*; 10(3): 252–261

Yang, J. Y., Han, M., Koh, Y., Kim, W.S., Song, J.W., Oh, Y.M., Lee, S.D., Lee, S.W., Lee, J.S., Lim, C.M., Choi, C.M., Huh, J.W., Hong, S.B., Shim, T.S., Jo, K.W. (2016) Effects of corticosteroids on critically ill pulmonary tuberculosis patients with acute respiratory failure: a propensity analysis of mortality; *Clinical Infectious Diseases*, vol. 63, no. 11, pp. 1449–1455

Yang, Z., Kong, Y., Wilson, F., Foxman, B., Fowler, A.H., Marrs, C.F., Cave, M.D., Bates, J.H. (2004) Identification of risk factors for extrapulmonary tuberculosis. *Clin Infect Dis*; 38(2):199–205

Yurchenko, V., Constant, S., Eisenmesser, E., Bukrinsky, M. (2010) Cyclophilin-CD147 interactions: a new target for anti-inflammatory therapeutics. *Clin. Exp. Immunol.* 160, 305–317.

Xu, Y., Wang, L., Zimmerman, M.D., Chen, K-Y., Huang, L., Fu, D-J, Kaya, F., Rakhilin, N., Nazarova, E.V., Bu, P., Dartois, V., Russell, D.G., Shen, X. (2018) Matrix metalloproteinase inhibitors enhance the efficacy of frontline drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 14(4): e1006974

van der Wel, N., Hava, D., Houben, D., Fluitsma, D., van Zon, M., Pierson, J., Brenner, M., Peters, P.J. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*; 129:1287-98; PMID: 17604718

Walker, N.F., Clark, S.O., Oni, T., Andreu, N., Tezera, L., Singh, S., Saraiva, L., Pedersen, B., Kelly, D.L., Tree, J.A., D'Armiento, J.M., Meintjes, G., Mauri, F.A., Williams, A., Wilkinson, R.J., Friedland, J.S. & Elkington, P.T. (2012) Doxycycline and HIV infection suppress tuberculosis-induced matrix metalloproteinases. *Am J Respir Crit Care Med*;185:989–997

Wong, K.-W. & Jacobs, W.R., Jr (2011) Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 13: 1371–1384

Zakeri, B. & Wright, G.D. (2008). Chemical biology of tetracycline antibiotics. *Biochem. Cell Biol.* 86: 124-136

Zhang, M., Liu, M., Luther, J. & Kao, J. Y. (2010). *Helicobacter pylori* directs tolerogenic programming of dendritic cells, *Gut Microbes*, 1, 325-329