

CARACTERIZAÇÃO DE VIRULÊNCIA E CARÁTER DA RESPOSTA  
IMUNE INDUZIDA POR CEPAS DE *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* DA FAMÍLIA GENÉTICA *BEIJING*: SUBLINHAGENS  
ANCESTRAL E MODERNA

**SIMONE CRESPO MORAIS RIBEIRO**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF

Campos dos Goytacazes - RJ  
Fevereiro - 2015

CARACTERIZAÇÃO DE VIRULÊNCIA E CARÁTER DA RESPOSTA  
IMUNE INDUZIDA POR CEPAS DE *MYCOBACTERIUM*  
*TUBERCULOSIS* DA FAMÍLIA GENÉTICA *BEIJING*: SUBLINHAGENS  
ANCESTRAL E MODERNA

**SIMONE CRESPO MORAIS RIBEIRO**

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

Campos dos Goytacazes - RJ  
Fevereiro - 2015

*“Pois eu bem sei os planos que estou projetando para vós,  
diz o Senhor; planos de paz, e não de mal,  
para vos dar um futuro e uma esperança.  
Então me invocareis, e ireis e orareis a mim,  
e eu vos ouvirei. Buscar-me-eis, e me achareis,  
quando me buscardes de todo o vosso coração.”*

*Jeremias 29: 11-13 (Bíblia Sagrada)*

## AGRADECIMENTOS

---

❖ Primeiramente a Deus, autor e consumidor da minha fé. Quero agradecer por tudo que faz em minha vida, por cada momento de alegria e tristeza, sofrimento e bonança. Pela Sua misericórdia a cada dia, e mesmo sem merecer, tens feito coisas maravilhosas em minha vida. Obrigada porque a Sua vontade é boa, perfeita e agradável.

❖ Ao meu esposo, Júnior, meu grande incentivador, companheiro, amigo. Obrigada por ter me dado os maiores presentes que eu podia receber, as minhas filhas, Manuela e Luisa. Elas são a razão do meu viver.

❖ Agradeço aos meus pais, minha irmã, tios, primos, à família que ganhei: minha sogra, meu sogro, minhas cunhadas e cunhados, a todos que, mesmo de longe, sei que torcem por mim. Esta tese é um prêmio para a minha mãe, que bem antes de terminar o doutorado já me chama de doutora. Esse Dr. vai para ela.

❖ À minha querida orientadora Elena, que hoje já é um pouco mãe, que cuida com zelo e carinho de cada “filho” (aluno), inclusive com puxões de orelha quando preciso. Você é um espelho pra mim. Quero poder ser pelo menos 10% da pesquisadora que é. Perdoe-me se nos últimos tempos não fui tão dedicada quanto sei que gostaria que eu fosse. Quero poder continuar ao seu lado na pesquisa por muitos anos ainda. Graças a você sou apaixonada pelo o que faço. Obrigada!

❖ À minha querida companheira de trabalho, minha amiga-mãe Verônica. Nossa amizade, mesmo que fiquemos longe, é algo que nunca vai acabar. Muito obrigada por tudo. Amo você para sempre.

❖ Não poderia esquecer o meu querido amigo Eduardo, meu “filho” de criação. Você aprendeu comigo e eu aprendi muito mais com você. Um menino de ouro. Quero te agradecer, por toda sua ajuda, porque todos os experimentos realizados neste trabalho foram feitos a quatro mãos e sem as suas mãos eu não teria obtido os resultados aqui apresentados. Não tenho como te agradecer. Espero um dia

poder retribuir toda a ajuda. Que Deus possa te honrar muito mais do que Ele já tem honrado e possa te levar a lugares cada vez mais altos.

❖ A todos meus amigos, companheiros de trabalho: Fabrício, Thatiana, Giliane, Eduardo, Marcelle, Mariana, Rita, Juliana, Fernando, Sanderson, Gislaine. Somos uma família. Obrigada pelo carinho de vocês, pelas risadas que damos juntos, pelo companheirismo e pela ajuda mútua.

❖ Aos meus amigos da Segunda Igreja Batista de Campos, que me apoiam, me incentivam, que cobrem a mim e a minha família com suas orações, seu carinho e amizade. Não tenho como citar nomes aqui, pois poderia esquecer alguém. Muito obrigado a todos.

❖ A todos do LBR, professores, alunos e técnicos, pois este trabalho só pôde ser realizado graças ao suporte dado por vocês.

❖ Aos professores Dr<sup>a</sup>. Alba Lucinia, Dr<sup>a</sup>. Ana Okorokova, Dr. Walter Oelemann por terem aceitado a participar da banca, e aos professores Dr. Milton Kanashiro e Dr<sup>a</sup>. Michelle Muzitano (suplentes).

❖ Ao apoio financeiro da FAPERJ e do CNPq para a realização deste projeto.

❖ E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS E TABELAS .....	iii
ABREVIATURAS .....	v
RESUMO .....	viii
ABSTRACT .....	ix
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1. A Tuberculose .....	10
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	13
1.3. Resposta imune contra a micobactéria .....	16
1.4. Polimorfismo genético de <i>Mtb</i> - Família genética <i>Beijing</i> .....	22
1.5. Virulência micobacteriana e modelos de infecção experimental.....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3. METODOLOGIA</b>	
3.1. Considerações metodológicas .....	29
3.2. Seleção das cepas de <i>Mtb</i> do genótipo <i>Beijing</i> para estudo .....	29
3.3. Cultivo dos isolados clínicos de <i>Mtb</i> .....	31
3.4. Animais.....	32
3.5. Infecção experimental dos camundongos e avaliação de sobrevivência dos animais .....	32
3.6. Extração dos bacilos e obtenção de células do pulmão.....	33
3.7. Histopatologia.....	33
3.7.1. Método de Coloração com Hematoxilina-eosina .....	33
3.7.2. Método de Ziehl-Neelsen.....	34
3.8. Cultura de células .....	35
3.8.1. Infecção dos macrófagos <i>in vitro</i> .....	35
3.8.2. Quantificação do crescimento intracelular das micobactérias.....	36

3.8.3. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados .....	36
3.9. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios .....	36
3.10. Análises Estatísticas.....	37
3.11. Delineamento Experimental.....	37
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1. Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados.....	39
4.2. Avaliação do crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos infectados .....	41
4.3. Avaliação da macropatologia dos pulmões .....	43
4.4. Avaliação histopatológica dos pulmões .....	45
4.5. Avaliação da indução de resposta imune pelas cepas <i>Beijing</i> através da quantificação das citocinas produzidas pelas células do pulmão <i>ex vivo</i> .....	50
4.6. Avaliação de virulência das cepas <i>Mtb Beijing</i> no modelo de infecção de macrófagos <i>in vitro</i> .....	53
5. DISCUSSÃO .....	55
6. CONCLUSÕES .....	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
<b>ANEXOS</b>	
I. Artigos publicados	

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

Figura 1 – Representação esquemática da parede celular do <i>Mtb</i> .....	15
Figura 2 – Reconhecimento da <i>Mtb</i> pelos receptores de reconhecimento padrão.....	17
Figura 3 – Patogênese da Tuberculose.....	21
Figura 4 – Árvore filogenética da linhagem genética <i>Beijing</i> de <i>Mtb</i> .....	25
Figura 5 – Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas <i>Mtb Beijing</i> em baixa dose de infecção.....	40
Figura 6 – Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas <i>Mtb Beijing</i> em alta dose de infecção.....	41
Figura 7 – Crescimento bacteriano no pulmão após 28 dias de infecção.....	42
Figura 8 – Curva de crescimento bacteriano no pulmão em 120 dias de infecção.....	43
Figura 9 – Análise macropatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com cepas <i>Beijing</i> de <i>Mtb</i> .....	44
Figura 10 – Peso dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção.....	44
Figura 11 – Número de células obtido dos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados aos 28 dias de infecção.....	45
Figura 12 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de <i>Mtb</i> do padrão I de virulência.....	46
Figura 13 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de <i>Mtb</i> do padrão II de virulência .....	47
Figura 14 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de <i>Mtb</i> do padrão III de virulência .....	48
Figura 15 – Análise morfométrica da área inflamatória no pulmão de	



<b>camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas <i>Mtb Beijing</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 16 – Produção de citocinas e quimiocinas pelas células do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas <i>Mtb Beijing</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>Figura 17 – Produção de NO pelas células do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas <i>Mtb Beijing</i>.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 18 – Avaliação de virulência em modelo de infecção de macrófagos <i>in vitro</i> com cepas <i>Beijing</i> de <i>Mtb</i>.....</b>	<b>54</b>
<b>Tabela 1 – Cepas de <i>Mtb</i> utilizadas neste trabalho.....</b>	<b>30</b>

## ABREVIATURAS

---

- ❖ ADC – Suplemento de albumina, dextrose, catalase
- ❖ AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- ❖ BAAR - Bacilo álcool-ácido-resistente
- ❖ BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*
- ❖ *Beijing* - Família de *Mtb* definida pelo método de Spoligotipagem como *Beijing*
- ❖ CFP-10 – *10 kDa Culture filtrate antigen* – Antígeno de filtrado de cultura de 10 kDa
- ❖ CFU – *Colony-forming unit* - Unidades formadoras de colônia
- ❖ CLR – Receptores de Lectina do Tipo C
- ❖ DC-SIGN – *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-intergrin* – Receptor de Lectina do tipo C
- ❖ DIM - Dimicoceratos de tiocérol
- ❖ DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ❖ DO – Densidade ótica
- ❖ DR – *Direct repeats* - Locus com repetição direta estabelecido por spoligotipagem
- ❖ EAI – Família de *Mtb* definida pelo método de Spoligotipagem como *East African-Indian*
- ❖ ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* – Reação Imunoenzimática
- ❖ ESAT-6 – *6 kDa Early secretory antigenic target* – Antígeno secretor precoce de 6 kDa
- ❖ ESX-1 – *Secretion system 1* – Sistema secretório 1
- ❖ HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- ❖ IFN- $\gamma$  – Interferon  $\gamma$
- ❖ IL – Interleucina
- ❖ KC/CXCL1- Quimiocina (C-X-C *motif*) ligante 1
- ❖ KO genes – “*knock-out*”, genes *desabilitados*
- ❖ LAM – Lipoarabinomanana
- ❖ LAM – Família de *Mtb* definida pelo método do Spoligotipagem como *Latin American-and Mediterranean*
- ❖ LDH – Deidrogenase Láctica
- ❖ LJ - Lowenstein Jensen

- ❖ LSP- *Large sequences polymorphism* - Polimorfismo em grandes sequências.
- ❖ Man-LAM – Lipoarabinomanana ligada à manose
- ❖ MCP -1 – Proteína de quimiotaxia de monócitos-1, quimiocina (C-C motif) ligante 2 (CCL2)
- ❖ MDM – Macrófagos derivados de medula óssea
- ❖ MDP – Muramyl dipeptídeo
- ❖ MDR-TB – Tuberculose resistente a drogas múltiplas
- ❖ MDR - *Multidrug resistant strain* – cepas multidrogas-resistentes
- ❖ MIP-2- Proteína inflamatória de macrófagos-2 alpha, quimiocina (C-X-C motif) ligante 2 (CXCL2)
- ❖ MIRU/VNTR - Unidades Repetitivas Interespaçadas de Micobactéria/Repetições em Série de Número Variável nas regiões intergênicas no genoma de *Mtb*
- ❖ MOI – *Multiplicity of infection* – número médio de bactérias por célula
- ❖ *Mtb* – *Mycobacterium tuberculosis*
- ❖ MTC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- ❖ *mutT* – *Mutator gene*
- ❖ NLRP-3 - *NLR family, pyrin domain containing 3*
- ❖ NK – Célula *natural killer*
- ❖ NO – Óxido nítrico
- ❖ NOD2 – *Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2*
- ❖ NTF – *Non-transmitted factor* – Região cromossômica do genoma de *Mtb*
- ❖ NOS2 – Óxido nítrico sintase induzível 2
- ❖ OADC – Suplemento de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase
- ❖ OMS – Organização Mundial de Saúde
- ❖ PBS – Salina fosfatada tamponada
- ❖ PRR – *Pattern recognition receptor* – Receptor de Reconhecimento de Padrão
- ❖ PCR – *Polymerase Chain Reaction* – Reação em cadeia de polimerase
- ❖ PGL – Glicolípido fenólico
- ❖ RD - Região de Diferenciação
- ❖ RFLP - *Restriction fragment length polymorphism* - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição
- ❖ RHZ – Rifampicina(R), Isoniazida(H) e Pirazinamida(Z)
- ❖ RNI – Intermediário reativo do nitrogênio
- ❖ ROI – Intermediário reativo do oxigênio

- ❖ SFB – Soro Fetal Bovino
- ❖ SNP – *Single nucleotide polymorphisms* - Polimorfismo em um único nucleotídeo
- ❖ TB - Tuberculose
- ❖ TDM - Trealose dimicolato
- ❖ TGF- $\beta$  – *Transforming growth factor-beta* - fator de transformação de crescimento  $\beta$
- ❖ TH – Célula T *helper*
- ❖ THP-1- Linhagem celular monocítica humana (de leucemia monocítica aguda)
- ❖ TLR – *Toll-like receptors* - Receptor Toll-similar
- ❖ TNF- $\alpha$  – *Tumor necrosis factor alfa* - fator de necrose tumoral  $\alpha$
- ❖ XDR – *Extensively drug resistant strain* - cepas extensivamente resistentes.

## RESUMO

---

A recente disseminação mundial das cepas de *Mtb* da família genética *Beijing* tem causado grande preocupação devida sua forte associação à resistência a drogas, alta virulência e transmissibilidade. Dados recentes revelaram certa heterogeneidade genética da linhagem *Beijing*, associada à acumulação, durante a evolução, de inserções e deleções em certas regiões do DNA bacteriano ou polimorfismos de nucleotídeos, levando à formação de sublinhagens. O impacto dessas diferenças na virulência micobacteriana ainda não foi estudado. Desta forma, o objetivo deste estudo foi caracterizar a virulência das cepas *Mtb Beijing*, das sublinhagens ancestral e moderna, isoladas em regiões geográficas com alta incidência da Tuberculose, Brasil e Moçambique. A virulência das cepas *Beijing* foi determinada através da sobrevivência dos camundongos infectados, pela quantificação do crescimento de bacilos no pulmão, e avaliação do caráter de patologia e resposta imune contra bactéria. Foram avaliadas três cepas *Beijing* da sublinhagem ancestral e três da sublinhagem moderna, em comparação com uma cepa *Beijing* moderna hipervirulenta da Rússia, e a cepa *Mtb* laboratorial H37Rv, de baixa virulência. As cepas da sublinhagem moderna, diferentemente das ancestrais, induziram uma sobrevivência menor nos camundongos infectados, além de apresentarem um crescimento maior nos pulmões e uma patologia severa, causando pneumonia granulomatosa com intenso infiltrado mononuclear e polimorfonuclear, caracterizada pelo forte recrutamento atípico de neutrófilos, com áreas de necrose tecidual e presença de um grande número de bacilos. Isto também foi relacionado a uma maior indução de mediadores pró-inflamatórias, do tipo TH1, importantes para controle do crescimento micobacteriano. Os resultados obtidos demonstram que as cepas *Beijing* da sublinhagem moderna apresentam maior virulência em comparação com cepas da sublinhagem ancestral, o que sugere que a microevolução da linhagem *Beijing* favorece a hipervirulência. Além disso, a utilização de cepas hipervirulentas para infecção dos camundongos C57BL/6, no lugar das cepas laboratoriais, induz nos animais a doença mais severa, com desenvolvimento de lesões necróticas no pulmão, reproduzindo melhor a patologia humana. O modelo modificado pode ser utilizado para testes de novas drogas, vacinas e novos métodos terapêuticos.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, virulência, genótipo *Beijing*, sublinhagens.

## ABSTRACT

---

The recent global dissemination of *Mtb* strains of genetic family Beijing has caused great concern due its strong association with drug resistance, virulence and transmissibility. Recent data have shown certain genetic heterogeneity of the Beijing strain, associated with accumulation, during evolution, insertions and deletions in certain regions of bacterial DNA or nucleotide polymorphisms, leading to the formation of sublineages. The impact of these differences in mycobacterial virulence has not been studied. Thus, the aim of this study was to characterize the virulence of *Mtb* strains Beijing, the ancient and modern sublineages, isolated in geographic regions with a high incidence of TB, Brazil and Mozambique. The virulence of Beijing strains was determined by survival of infected mice by quantifying the growth of bacilli in the lung, and evaluation of the pathology character and immune response against bacteria. Beijing three ancestral strains and three of modern sublineage were evaluated in comparison with modern Beijing strain hypervirulent Russia and laboratory *Mtb* H37Rv strain of low virulence. The strains of modern sublineage, unlike ancestors, induced a lower survival in infected mice, in addition to having a greater growth in the lungs and a severe pathology, causing granulomatous pneumonia with intense mononuclear and polymorphonuclear infiltrate, characterized by strong atypical recruitment of neutrophils, areas of tissue necrosis and the presence of large numbers of bacilli. This was also associated with greater induction of Th1 proinflammatory mediators, important for mycobacterial growth control. The results demonstrate that the strains of the Beijing modern sublineage have increased virulence compared to the ancestral strain sublineage, suggesting that microevolution of Beijing lineage favors hypervirulent strains. Furthermore, the use of hypervirulent strains for infection of C57BL/6 mice, in place of laboratory strains in animals induces the most severe disease, with development of necrotic lesions in the lung, rather reproducing the human pathology. The modified model can be used to test new drugs, vaccines and novel therapeutic methods.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, virulence, Beijing genotype, sublineages.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. A tuberculose

A história da tuberculose (TB) está interligada à história da humanidade, sendo uma das doenças infecciosas mais antigas do mundo. A descoberta da TB óssea como causa de morte em esqueletos antigos, da Europa e do Oriente Médio, datados de 4.000 anos atrás, mostra que essa doença já era um grave problema de saúde na época. Hipócrates, nos seus registros, escreve sobre pacientes com emagrecimento, com presença de dor no peito e tosse, muitas vezes associada com o aparecimento de sangue no escarro. Estes sintomas permitiram Hipócrates a diagnosticar a TB, e a frequência destes diagnósticos naquela época mostra que esta doença já estava enraizada (JORDAO E VIEIRA, 2011)

Ainda nos dias de hoje, a TB continua sendo um grave problema de saúde pública, afetando grande parte da população mundial. É uma doença infecto-contagiosa causada, principalmente, pelo agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Segundo a Organização mundial de saúde, em 2013, cerca de 9 milhões de pessoas desenvolveram tuberculose e 1,5 milhões morreram da doença. Apesar do número de mortes ainda ser muito grande, a taxa de mortalidade vem reduzindo ao longo dos anos, uma redução de 45% desde 1990 (WHO, 2014).

Outro dado importante é que se estima que 13% das 9 milhões de pessoas que desenvolveram TB em 2013 eram HIV-positivas, sendo que 80% destes casos estão na região africana. Além disso, 480 mil pessoas desenvolveram TB *multi-droga-resistente* ou resistente a drogas múltiplas (MDR-TB) em 2013 (WHO, 2014). O aumento da prevalência de MDR-TB nas várias regiões do mundo é um fator muito preocupante.

No Brasil, foram notificados 70.047 casos novos em 2012, com incidência de 36,1 casos a cada 100 mil habitantes. Quando comparado aos outros países, de acordo com a OMS, o Brasil ocupa a 17ª posição em relação ao número de casos, num ranking de 22 países. O Estado do Rio de Janeiro apresenta uma das mais altas taxas de incidência de TB em todo Brasil, com incidência acima da média nacional, com cerca de 60 (54,6-68,3) casos a cada 100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2013).

A TB é uma doença de caráter prioritário no Brasil, que atinge principalmente os indivíduos economicamente ativos, na faixa etária de 15 a 54 anos, e do sexo masculino. A doença é prevalente em áreas de grande concentração populacional e com condições socioeconômicas e sanitárias precárias. Estão mais sujeitos à TB os indivíduos que convivem com doentes bacilíferos (contactantes), pessoas que apresentam imunodeficiência, incluindo infectados com HIV ou tratados com corticóides e outros imunossupressores, além dos portadores de algumas comorbidades, como silicose ou diabetes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Em adultos, a forma pulmonar da doença é a mais comum, observada em cerca de 70% dos casos. Mas a doença também pode atingir outros órgãos também, como rins, ossos, meninges, dentre outras, causando a TB extrapulmonar. Entre formas mais severas da TB, estão a TB miliar, caracterizada pela disseminação da bactéria no pulmão inteiro, as formas destrutivas, como TB fibrocavernosa (necrosante), e formas disseminadas, como meningite tuberculosa (O’GARRA et al, 2013).

A TB é normalmente transmitida através da tosse ou espirro de uma pessoa com a doença pulmonar ativa. A maioria dos indivíduos infectados, cerca de 90%, é capaz de desenvolver a resposta imune protetora e conter de forma eficiente a infecção, mas não é capaz de eliminar completamente a bactéria, desenvolvendo uma infecção latente, sendo assintomáticos e não contagiantes durante a vida inteira. Os outros 5-10% dos indivíduos infectados, num momento da sua vida podem ter uma reativação da infecção, apresentando a doença ativa. Desta forma, as bilhões de pessoas infectadas com a forma latente da TB (um terço da população mundial) constituem um grande reservatório potencial da doença (FLYNN, 2011). Em alguns casos da infecção (cerca de 5%), principalmente em crianças e indivíduos imunodeficientes, a doença ativa pode desenvolver-se logo após a exposição à micobactéria ou no primeiro ano, chamando-se TB primária. A TB primária, na maioria dos pacientes, é caracterizada por uma infecção descontrolada, que leva às formas mais severas e disseminadas da TB, como a TB miliar, pneumonia ou meningite tuberculosa. Isso pode ocorrer devido diferentes fatores relacionados à susceptibilidade do indivíduo infectado, que não foi capaz de desenvolver uma resposta imune adequada, à alta agressividade da micobactéria, que pode apresentar um alto grau de virulência ou à exposição prolongada ou repetida de altas doses do bacilo (O’GARRA et al, 2013).



Os pacientes com TB apresentam um comprometimento geral da saúde apresentando febre baixa vespertina, sudorese noturna, falta de apetite e emagrecimento. Quando a doença atinge os pulmões a principal manifestação da doença é a tosse, inicialmente seca, podendo depois ser acompanhada ou não de escarros com presença de sangue, e pode ocorrer também dor torácica, (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

O diagnóstico da TB é feito principalmente através da baciloscopia, que é a pesquisa do bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR) no escarro. Esta técnica é utilizada não apenas para o diagnóstico, como também para controlar a eficácia do tratamento, e tem uma eficiência de 34% a 80% de detecção. A cultura micobacteriana é considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico da TB, e quando associada a testes de sensibilidade a antimicrobianos, também permite o diagnóstico de casos de TB resistente a drogas, mas o diagnóstico pode levar semanas. Recentemente foi desenvolvida uma nova técnica diagnóstica baseada na amplificação do DNA de *Mtb* (GeneXpert MTB/RIF), que além de ser usado para diagnosticar a TB também pode ser usado para a detecção de resistência à rifampicina, que é um dos principais medicamentos usados no tratamento da TB, e que serve como marcador para resistência. Como o processamento da amostra é automatizado, o resultado pode sair em duas horas, além de apresentar uma excelente sensibilidade. Uma das desvantagens desta técnica é que ela só é capaz de diagnosticar a doença ativa, não podendo detectar casos de TB latente (BOEHME et al, 2010; WALZL et al 2011). Esta nova ferramenta já está sendo implantada na rede pública de saúde, no Brasil, a fim de aumentar a rapidez no diagnóstico da doença.

O tratamento da TB deve ser supervisionado pelo sistema de saúde mais próximo à residência do doente, sendo necessário orientá-lo, antes do início da quimioterapia, quanto às características da doença, o esquema de tratamento, as eventuais consequências da não continuidade e abandono do tratamento, além dos possíveis efeitos adversos dos medicamentos. O uso de múltiplas drogas no tratamento da doença ativa é necessário para evitar a seleção de bactérias resistentes aos medicamentos dentro da população bacteriana. O tratamento é prolongado, com um mínimo de 6 meses, que pode ser dividido em duas fases. A primeira fase mais intensiva, onde o medicamento ataca os bacilos que estão ativamente em replicação, seguido de uma fase de continuação, que tem como alvo

os bacilos persistentes. As drogas utilizadas, no Brasil, nos esquemas padronizados são a Isoniazida (H), Rifampicina (R), Pirazinamida (Z) e Etambutol (E). Este último foi incluído no esquema de tratamento de primeira linha para adultos e adolescentes maiores de 10 anos de idade em 2009. O esquema de tratamento pode ser variado de acordo com a idade do paciente, o tipo de caso (casos novos, retratamento) e presença de infecções associadas, como por exemplo, o HIV. A falta de acompanhamento eficaz no tratamento ou o mau uso dos medicamentos pode levar ao desenvolvimento e disseminação de cepas multidroga-resistentes (MDR) ou extensivamente resistentes (XDR) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; O’GARRA et al, 2013).

Cepas MDR podem ser definidas como micobactérias resistentes pelo menos à rifampicina e isoniazida, dois dos medicamentos de primeira linha anti-TB. As cepas XDR são micobactérias com uma resistência adicional às fluoroquinolonas e, pelo menos, a uma das drogas de segunda linha anti-TB. Estas cepas, MDR e XDR, tem sido consideradas um grave problema a se enfrentar, a fim de erradicarmos a TB (JORDAO E VIEIRA, 2011).

A vacina BCG é a atualmente utilizada na prevenção da TB. É uma vacina viva, obtida de uma cepa de *Mycobacterium bovis*, onde foi necessário cerca de 13 anos e mais de 200 passagens na cultura para se obter a versão atenuada da cepa virulenta original, sendo utilizada pela primeira vez como vacina em 1921, em crianças. Estima-se que o uso da vacina BCG, desenvolvida por Calmette e Guérin, salve milhares de vidas a cada ano, mas o seu benefício parece estar relacionado a formas graves da doença desenvolvidas em crianças, como a TB extrapulmonar e a meningite tuberculosa. Por isso, a vacina BCG é recomendada e incluída no calendário de vacinação infantil determinado pela OMS, nos países de alta incidência da TB (MONTAÑÉS e GICQUEL, 2011). A geração de uma nova vacina, que pode proteger a população adulta contra a TB é uma importante tarefa na pesquisa dessa doença.

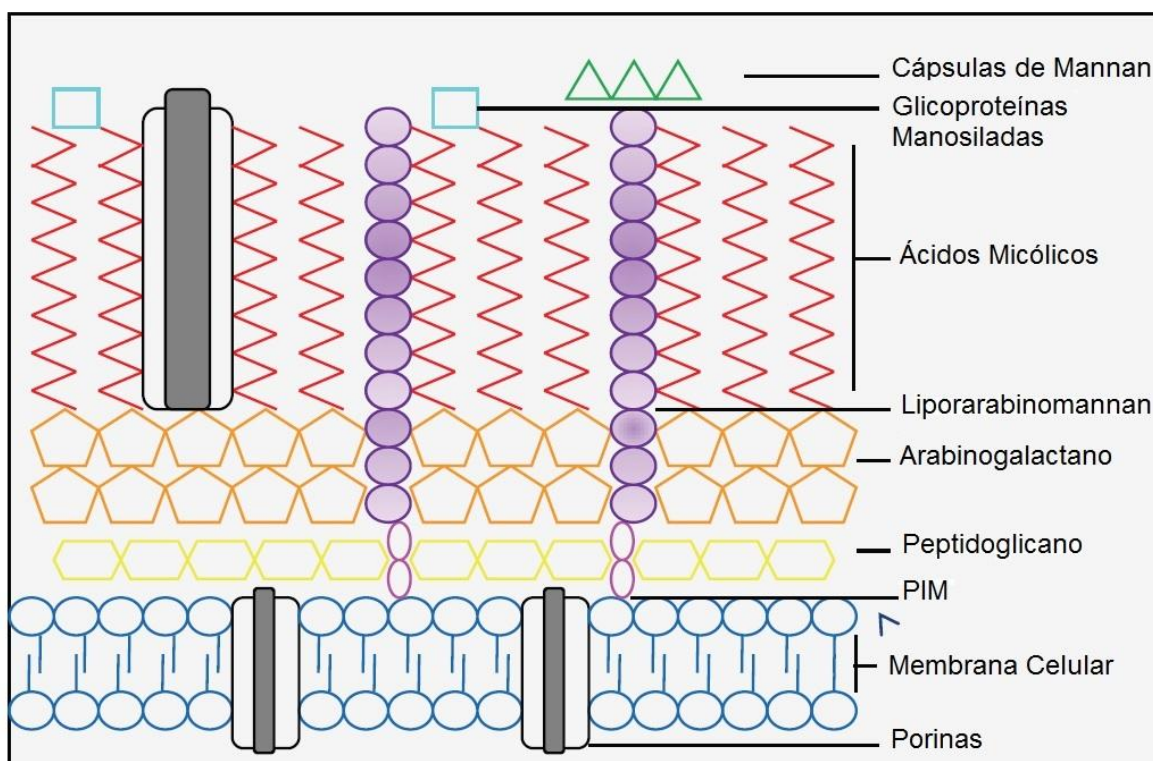
## **1.2. *Mycobacterium tuberculosis***

Os membros do gênero *Mycobacterium* são caracterizados, principalmente, por possuírem uma complexa parede celular, que é responsável por duas marcas específicas dos membros deste gênero: a baixa permeabilidade celular e a

coloração diferencial destas células, que se coram somente com métodos específicos, como o método Zhiel-Neelsen, devido sua álcool-ácido resistência. Este gênero é comumente dividido em dois grupos principais, tendo como base a taxa de crescimento bacteriano. O primeiro grupo inclui espécies de crescimento lento, como as bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii* e *M. Africanum*, entre outras) e *Mycobacterium leprae*, agentes causadores de doenças como a TB humana, TB bovina e hanseníase. O outro grupo inclui espécies de crescimento rápido, como as bactéria patogênicas não-tuberculosas, representadas pelas bactérias do complexo de *Mycobacterium avium* (*M. avium*, *M. intracellulare*) e grande variedade das micobactérias não patogênicas ou oportunistas, ambientais, como *Mycobacterium smegmatis* (FORRELLAD et al, 2013).

O complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) refere-se a um grupo de espécies, com alta semelhança genética (99,9% a nível de DNA), que inclui as espécies *M. tuberculosis* (*Mtb*), *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. Bovis* BCG, *M. caprae* e *M. Pinnipedii*. Deste grupo, a *Mtb* é espécie mais bem descrita, sendo responsável por infectar mais de 1/3 da população mundial, mas também pode infectar animais que estejam em contato com humanos. Estudos demonstram que os membros do complexo *Mtb* evoluíram de um ancestral comum, através de sucessivas deleções e inserções de DNA resultando nas diferenças entre espécies e na patogenicidade (FORRELLAD et al, 2013).

O envelope celular das micobactérias consiste de uma membrana plasmática, rodeada pelo esqueleto da parede celular, que é uma estrutura composta por três macromoléculas ligadas covalentemente, o peptídeoglicano, arabinogalactano e ácidos micólicos, sendo esta parede celular rodeada por uma camada externa (NEYROLLES E GUILHOT, 2011). Uma variedade de lipídeos, como lipoarabinomanan (LAM), trealose dimicolato (TDM) e dimicoceratos de tiocerol (DIM), estão ligados como âncora, não covalentemente, à membrana celular e parecem desempenhar um importante papel na virulência micobacteriana. Na figura 1 abaixo podemos observar uma representação esquemática dos principais componentes de parede celular micobacteriana e sua distribuição.



**Figura 1** – Representação esquemática da parede celular de *Mtb*. Figura modificada de KLEINNIJENHUIS et al, 2011.

A capacidade de uma determinada bactéria patogênica em causar uma doença num hospedeiro susceptível pode ser determinada por vários fatores de virulência, que podem agir individualmente ou em conjunto nos diferentes estágios da infecção. O uso de bibliotecas gênicas em combinação com diferentes métodos de estudo *in vivo* permitiram a identificação de genes de virulência, e em consequência, a elucidação dos mecanismos usados pelas bactérias para sobreviver e persistir no hospedeiro. A maioria destes genes de virulência codificam vários lipídeos, proteínas de superfície celular, reguladores e proteínas de transdução de sinal, além do grupo de genes envolvido na sobrevivência de micobactérias no microambiente agressivo do interior de macrófagos do hospedeiro. Apesar disso, as micobactérias não possuem fatores de virulência clássicos, como as toxinas, muito usadas por outras bactérias patogênicas (FORRELLAD et al, 2013).

Lipídeos, glicolipídeos e lipoglicanos podem desempenhar importantes funções na manutenção do fagossoma e no tráfego intracelular de *Mtb*. Alguns lipídeos micobacterianos, como o Man-LAM e DIM, podem se intercalar à membrana celular da célula hospedeira impedindo a maturação do fagossoma, o que também é observado com o lipídeo TDM, mas neste caso, ele não precisa se intercalar à membrana celular (NEYROLLES E GUILHOT, 2011). Glicolipídeos de superfície,

como TDM, o *cord factor*, são tóxicos para as células de mamíferos, contribuem para a virulência e são imunogênicos (MEENA e RAJNI, 2010).

Além desses fatores de virulência lipídicos, *Mtb* utiliza um sistema de secreção de proteínas, o ESX-1, para exportar fatores de virulência capazes de que inibir a ação dos macrófagos hospedeiros. O sistema ESX-1, também denominado sistema secreção do tipo de VII, é crítico para a virulência, e transporta as proteínas do interior da bactéria pelo envelope celular. As principais proteínas secretadas por este sistema, o ESAT-6 e CFP-10, são potentes antígenos capazes de iniciar uma protecção contra a tuberculose em modelos animais, e são componentes importantes de vacinas (RAGHAVAN et al, 2008).

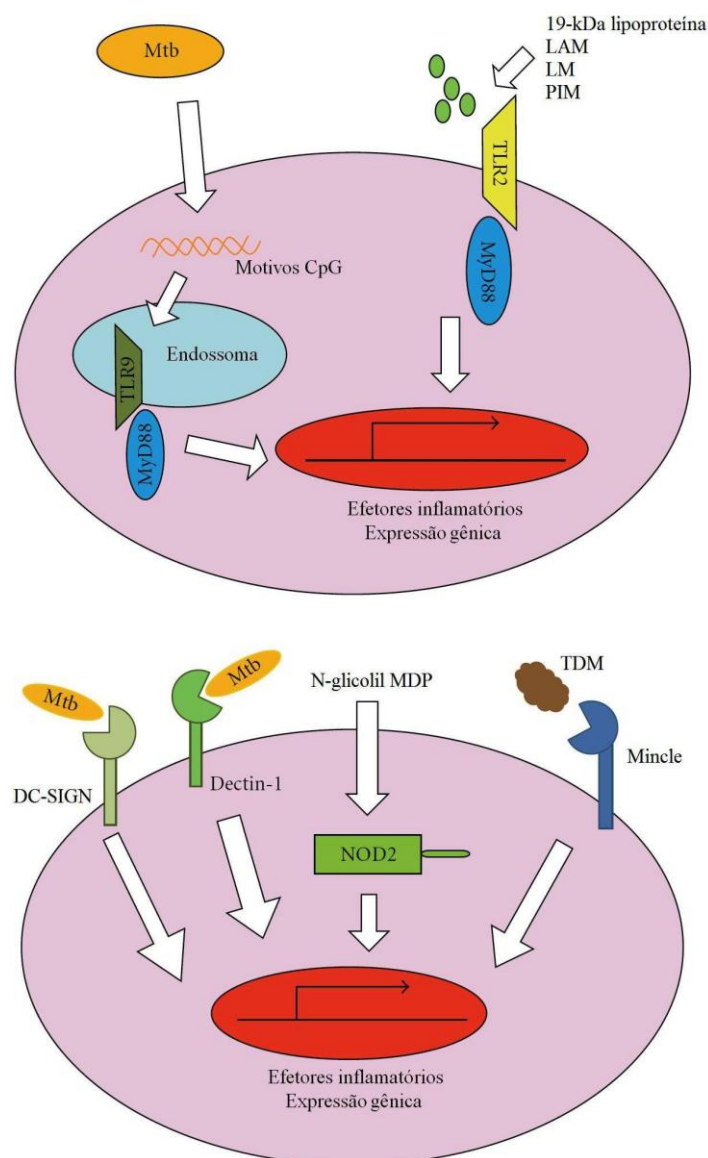
Estas duas proteínas, as quais formam um complexo heterodimérico 01:01, induzem uma forte resposta imune mediada por células T e estão aparentemente envolvidos na lise celular da membrana e/ou hospedeiro e representam importantes fatores de virulência. Também parecem ser essenciais para o crescimento *in vitro* de *Mtb*. Estudos também demonstraram que o sistema ESX-1 está deletado na cepa da vacina *M. bovis* BCG e em outros membros atenuados do complexo *Mtb*, como *M. microti*, sugerindo que a secreção de ESAT-6 está envolvida na virulência de *Mtb* (SIMEONE et al, 2009).

### **1.3. Resposta imune contra a micobactéria**

*Mtb* é transmitida pelo ar, através da tosse ou espirro de indivíduos infectados. Gotículas contendo bacilos de *Mtb* entram em indivíduos saudáveis através do sistema respiratório e chegam ao pulmão. Ao chegar ao alvéolo, os bacilos de *Mtb* são rapidamente fagocitados por células fagocíticas, principalmente macrófagos alveolares, células dendríticas locais, macrófagos intersticiais e, possivelmente, também por células epiteliais, quando os bacilos passam pelos brônquios (OTTENHOFF, 2012)

O início da resposta imune inata contra *Mtb* é caracterizada pelo reconhecimento de componentes micobacterianos por múltiplos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) das células hospedeiras. Dos receptores *Toll-like* (TLRs), o TLR2 tem o maior número de agonistas micobacterianos identificados, incluindo lipoproteínas, fosfatidilinositol mananas e lipomananas. Além disso, TLR9 é capaz de reconhecer DNA micobacteriano, contribuindo dessa forma para a

produção de citocinas por macrófagos e células dendríticas em camundongos infectados com *Mtb*. Outros receptores como os receptores da família das lectinas do tipo C (CLR), incluindo DC-SIGN, receptores de manose (CD206) e Mincle, também podem reconhecer *Mtb*. Dos receptores de reconhecimento citosólicos, os receptores NOD2 e NLRP3 reconhecem uma subunidade do peptídeo glicano (MDP – Muramyl dipeptide) e substratos secretados pelo sistema ESX1, como ESAT-6, respectivamente. Desta forma, a estimulação desses receptores induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e receptores de adesão celular, que contribuem para a mobilização e ativação das células do sistema imune, tanto local como sistemicamente, fornecendo a base para uma subsequente ativação da resposta imune celular adaptativa (ERNST, 2012).



**Figura 2** – Reconhecimento de *Mtb* pelos receptores de reconhecimento de padrões. Figura modificada de SAIGA et al, 2011.

Quando comparado a outros patógenos, *Mtb* tem uma capacidade única de atrasar o início da resposta imune adaptativa, e isso pode ser observado tanto em humanos quanto em camundongos. Isso pode ocorrer, provavelmente, ao fato de que as células dendríticas possam falhar ao migrar do foco da infecção no pulmão para os linfonodos drenantes, local onde as células T são apresentadas ao antígeno e iniciam sua maturação por um período de pelo menos duas semanas. Este atraso pode ajudar no estabelecimento de um número crítico de bacilos antes que a imunidade adaptativa possa se desenvolver o suficiente para controlar a infecção (OTTENHOFF, 2012)

*Mtb* induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . A IL-12 desempenha um papel importante na ativação de células T, em especial na resposta de células TH1. O TNF- $\alpha$  induz a produção de citocinas e quimiocinas em macrófagos, ativando-os para *killing* de *Mtb*, modulando a indução de apoptose em macrófagos. As citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , também podem ser produzidas por macrófagos infectados com *Mtb*, onde tem a função de regular negativamente as citocinas pró-inflamatórias e a ativação e proliferação de células T, fazendo um balanço entre a eliminação micobacteriana e a sobrevivência do hospedeiro (FLYNN, 2011).

A resposta imune celular, mediada por células T, é extremamente importante para o controle da infecção micobacteriana no hospedeiro. A capacidade das células T CD4<sup>+</sup>/TH1 em produzir IFN- $\gamma$ , que ativa os fagócitos para conter o patógeno intracelular e promover o reconhecimento micobacteriano pelas células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, são cruciais para a proteção contra a doença. A ativação das células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas efetoras leva a degranulação dessas células e liberação da granulicina contribuindo para a eliminação bacteriana (WALZL et al, 2011). O importante papel protetor das células T CD4<sup>+</sup> pode ser evidenciado em indivíduos infectados pelo vírus HIV, que possuem uma susceptibilidade elevada às infecções micobacterianas, associada à morte dessas células induzida por vírus.

Além das células TH1, a subpopulação TH17, que produz IL-17, também possui um papel importante, mas que pode ser positiva (protetora) ou negativa (contribuir a patologia). Nas etapas iniciais, após a infecção por *Mtb*, a IL-17 é capaz de mediar o recrutamento de células TH1 protetoras para o pulmão promovendo formação do granuloma. Entretanto, posteriormente, altas concentrações de IL-17 no

pulmão contribuem a inflamação exagerada causando danos teciduais (WALZL et al, 2011).

Vários estudos em animais têm demonstrado ao longo dos anos que os neutrófilos têm uma importante contribuição na defesa precoce contra as micobactérias. Os neutrófilos são recrutados para os locais de infecção, onde podem reconhecer as micobactérias diretamente ou por meio de opsonização, fagocitando-as. Além disso, após sua ativação, estas células liberam uma ampla variedade de produtos bactericidas e citotóxicos, como radicais livres de oxigênio, enzimas proteolíticas, mieloperoxidase, defensinas, etc. Foi sugerido que as citocinas IL-17 e IL-23 são mediadores chave no aumento da resposta de neutrófilos durante a infecção micobacteriana, e que células TH17 de memória podem ser a fonte destas citocinas (LOWE et al, 2012).

Outra subpopulação importante são as células T CD4<sup>+</sup> regulatórias, Treg, que durante a doença ativa podem regular negativamente o excesso de resposta de células TH1, ajudando a diminuir a lesão causada durante a resposta. Em conjunto, estas células são determinantes para que a resposta imune protetora, desenvolvida durante fase aguda de infecção, seja equilibrada e bem regulada. O papel das células Treg na fase crônica da infecção é contraditória, pois foi demonstrado que essas células e suas citocinas podem contribuir para a reativação da TB (WALZL et al, 2011).

A principal característica do desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro contra a micobactéria é a formação do granuloma. O granuloma pode ser definido como um infiltrado celular inflamatório, composto de macrófagos, linfócitos e alguns neutrófilos, que, é capaz de limitar o crescimento da micobactéria, mas ao mesmo tempo é capaz de proporcionar um ambiente apropriado para a sobrevivência de algumas bactérias e, a partir do qual ela pode disseminar posteriormente (EHLERS e SCHAIBLE, 2013). Em outras doenças infecciosas, o recrutamento de células fagocíticas restringe e elimina os patógenos invasores, enquanto que numa infecção micobacteriana, este recrutamento beneficia a bactéria durante as fases iniciais da infecção, pois fornece nichos celulares adicionais para a expansão da população micobacteriana (ERNST, 2012).

Na TB humana, o granuloma clássico é o granuloma caseoso, assim chamado devido ao centro deste granuloma sofrer necrose e apresentar um aspecto de “queijo”. Histologicamente, este granuloma consiste de macrófagos epitelióides

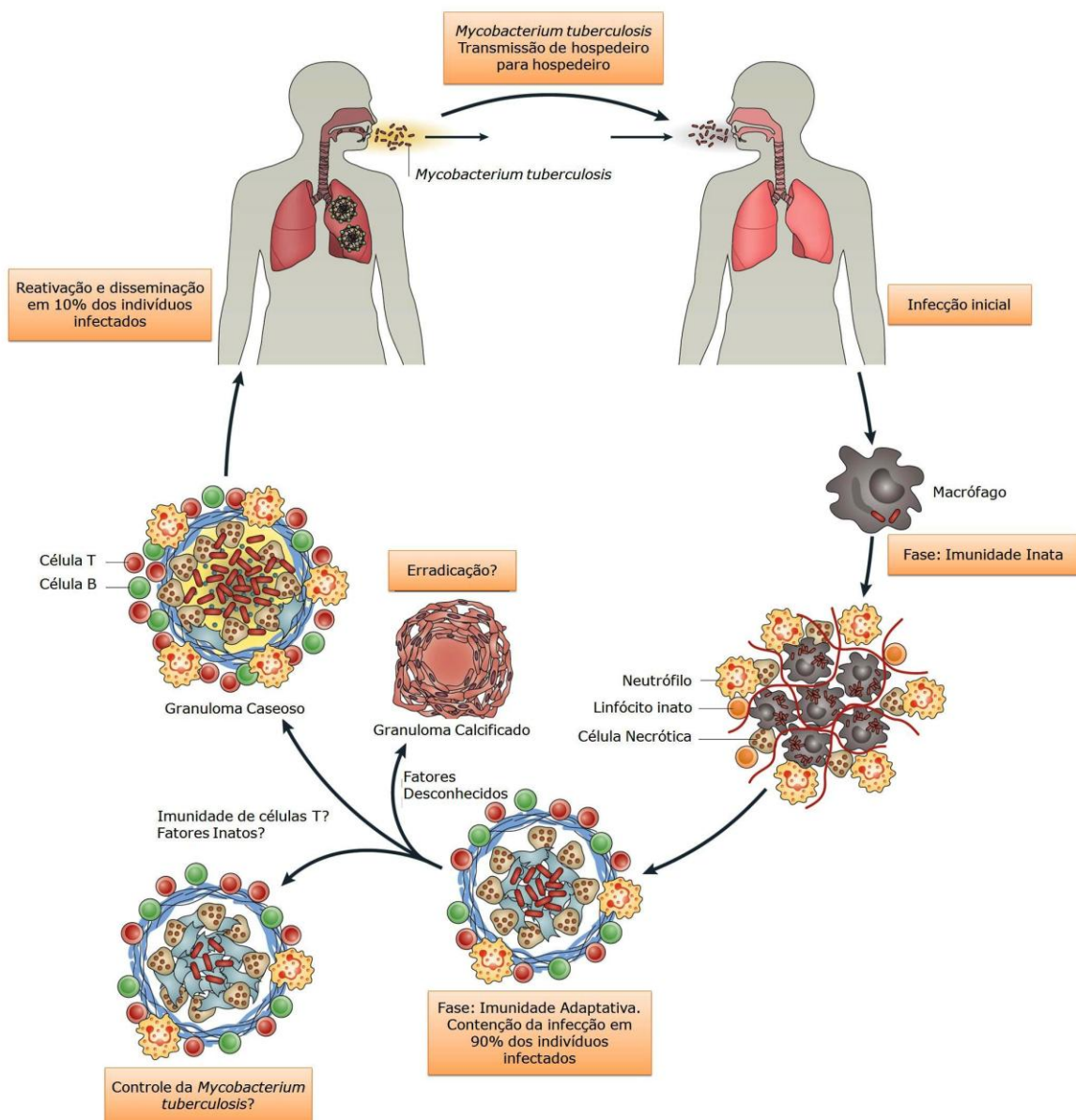


em torno de uma região necrótica, acelular, com uma cobertura linfocítica, que compreende células T e B. Neutrófilos também podem ser observados dentro de granulomas caseosos. Normalmente, no exterior do granuloma pode ser observada uma capa de colágeno produzido pelos fibroblastos. Na infecção crônica ou latente, este tipo de granuloma pode se tornar calcificado, com o processo de calcificação começando do centro caseoso. Um granuloma calcificado está relacionado a uma resposta imune bem sucedida, apresentando a eliminação de micobactérias e menos células inflamatórias do que outros granulomas. Entretanto, a patologia da TB é heterogênea e outros tipos de granulomas podem ser observadas em pacientes diferentes ou até no mesmo paciente, como por exemplo, granulomas não necrosantes, compostos principalmente por macrófagos com alguns linfócitos, granulomas neutrofílicos necróticos e granulomas completamente fibróticos. Com todos esses tipos de granulomas diferentes, podemos imaginar a presença de diferentes tipos de resposta imune em cada microambiente e uma relação diferente entre cada tipo de granuloma e *Mtb* (FLYNN, 2011).

*Mtb* também é capaz de manipular e persistir no ambiente hostil das células hospedeiras infectadas, em particular os fagócitos profissionais, onde ela é capaz de evadir dos principais meios de eliminação de patógenos: inibir a maturação dos fagossomas e sua fusão com lisossomas; inibir a autofagia, que tem uma forte atividade antimicrobiana em fagócitos profissionais; e inibir a morte dessas células pela apoptose, que também pode contribuir para a eliminação da bactéria. Além disso, a *Mtb* inibe nos macrófagos e células dendríticas o processamento e a apresentação de antígenos para células T, reduzindo o reconhecimento das células infectadas; inibe a sinalização mediada por receptores de INF- $\gamma$ , uma importante via que ativa mecanismos bactericidas nos macrófagos; inibe e elimina os intermediários do oxigênio e nitrogênio tóxicos para *Mtb*; e é capaz de sair do meio hostil do fagossoma e ir para o ambiente mais favorável do citoplasma. Todas essas estratégias ajudam na persistência e escape das defesas do hospedeiro (OTTENHOFF, 2012).

De certa forma, podemos resumir a patogênese da TB pulmonar de acordo com a figura abaixo. A infecção tem início através da inalação de gotículas de aerossol contendo micobactérias. Em seguida, a infecção induz uma resposta imune inata caracterizada pelo recrutamento de células inflamatórias para o pulmão. Com a disseminação micobacteriana para os linfonodos de drenagem, as células

dendríticas são capazes de apresentar antígenos levando a maturação e expansão de células T específicas para os antígenos, que são recrutadas para o pulmão. O recrutamento das células T, células B, macrófagos e outros leucócitos ativados levam à formação de granulomas, que podem conter a bactéria. A maioria dos indivíduos infectados com *Mtb* permanece num estado “latente”, onde não apresenta sintomas clínicos, mas tornam-se um reservatório em potencial da doença. Um terço da população mundial está nesta situação. Uma pequena porcentagem dessas pessoas, de 5 a 10%, podem progredir e desenvolver a doença ativa, através da liberação de *Mtb* dos granulomas, que vão para as vias aéreas, e através da tosse, podem ser transmitidas para outros indivíduos em gotículas infecciosas (NUNES-ALVES et al, 2014).



**Figura 3** – Patogênese da TB. Figura modificada de NUNES-ALVES et al, 2014.

#### **1.4 Polimorfismo genético de *Mtb* - Família genética *Beijing***

Na epidemiologia da TB, como em todas as doenças infecciosas, o ponto mais importante é definir a fonte de infecção e saber sua via de transmissão e disseminação pelo ambiente. Com o desenvolvimento da biologia molecular nos meados dos anos 80, com o uso de técnicas baseadas na avaliação do DNA, foi possível discriminar diferentes cepas de uma mesma espécie. Acreditava-se que o MTC era um grupo geneticamente conservado, com limitadas diferenças fenotípicas, que influenciavam na patogenia da TB, e com o uso de diferentes métodos de genotipagem micobacteriana foi possível a diferenciação das diferentes famílias genéticas de *Mtb* e a possibilidade de realização de estudos epidemiológicos (JAGIELSKI et al, 2014)

Os padrões de spoligotipagem, baseados na análise do locus DR (*the Direct Repeat locus*), que consiste na variedade de repetições de espaçadores idênticos DRs, permitem o agrupamento das diferentes cepas de *Mtb* em famílias epidemiologicamente importantes, como as famílias *Beijing*, *Haarlem*, *S*, *T*, *X*, *East African-Indian* (EAI) e a *Latin American-Mediterranean* (LAM) (GROENEN et al, 1993; Gori et al, 2005).

Desde 1999 foram construídas e lançadas bases de dados de diversidade genética do locus DR do complexo *Mtb* como uma tentativa de analisar a estrutura da população global de *Mtb*. Estudos de spoligotipagem de *Mtb* mostraram que a origem geográfica do hospedeiro é preditiva do spoligotipo do isolado clínico de *Mtb* uma vez que existe uma associação estável de populações micobacterianas com seus hospedeiros humanos em diversos ambientes, demonstrando um forte agrupamento filogeográfico de populações de *Mtb* (HIRSH et al, 2004).

As cepas do genótipo *Beijing* de *Mtb* foram identificadas pela primeira vez por Van Soolingen et al (1995), através de spoligotipagem de diferentes isolados clínicos de *Mtb* coletados de 1992 e 1994 de pacientes com TB residentes na República Popular da China e Mongólia. No genoma das cepas do genótipo *Beijing* de *Mtb* a maioria dos espaçadores de DR foram eliminados durante a evolução, talvez por um único evento de recombinação mediada por IS6110 (BEGGS et al., 2000). Assim, a estrutura característica do locus DR é um marcador que define o genótipo *Beijing* e o distingue de outras famílias dentro de *Mtb*. Uma comparação dos isolados clínicos de *Mtb* obtidos dos pacientes na região da Ásia Oriental e outras regiões geográficas

mostrou que cepas com genótipo *Beijing* foram mais frequentemente observadas no leste da Ásia, sugerindo que estas cepas podem ter se originado e espelhado a partir da área da cidade de *Beijing* (China) para outras regiões, assim dando nome a esta linhagem evolutiva de *Mtb*. Estudos posteriores mostraram que as cepas *Beijing* são endemicamente prevalentes no leste da Ásia, África do Sul (BIFANI et al, 2002) e no norte da Eurásia (MOKROUSOV et al, 2002).

Com o passar dos anos, cepas *Beijing* têm se espalhado por todas as partes do mundo, podendo ser encontradas em todas as regiões geográficas, mas em diferentes proporções, representando cerca de 13% de todas as cepas *Mtb* do mundo (WANG et al, 2010). Entre as várias famílias genéticas identificadas dentro do MTC (SOLA et al, 2001; BAKER et al, 2004), o genótipo *Beijing* é marcado por homogeneidade genética e onipresença geográfica (BIFANI et al, 2002; GLYNN et al, 2002). Tomados em conjunto, estes dados provavelmente refletem sua rápida propagação mundial durante o século passado e principalmente durante últimas décadas, sugerindo alta competitividade das cepas *Beijing* em comparação com outras cepas *Mtb* (PARWATI et al, 2010).

A emergência do genótipo *Beijing* pode ter sido relacionada às propriedades biológicas dessas bactérias que determinam sua maior resistência em frente à vacinação com BCG e o tratamento anti-TB. Estudos mostram que a vacinação com BCG pode ser menos protetora contra cepas do genótipo *Beijing* do que outros genótipos (ABEBE and BJUNE, 2006). Da mesma forma, o tratamento utilizado para a TB parece ser menos eficaz contra cepas de genótipo *Beijing*, estando estas cepas muitas vezes associadas com resistência a drogas (PARWATI et al, 2010). Tudo isso sugere que estas cepas tem uma vantagem intrínseca sobre outros genótipos, levando vantagem em termos de resistência a drogas, virulência, ou seja, na transmissibilidade, progressão de TB latente para ativa, e cronicidade da doença (PARWATI et al, 2010; MOKROUSOV, 2013).

Estudos clínicos das manifestações da TB causada pelas cepas da família *Beijing* sugeriram que essas cepas com maior frequência podem provocar TB com apresentações radiológicas mais severas (DROBNIEWSKI et al., 2005), formas disseminadas de TB (THWAITES et al., 2008), falência no tratamento e recidiva da doença (SUN et al., 2006). Além disto, a maior virulência das cepas da família *Beijing* em comparação com cepas *Mtb* de outros genótipos foi demonstrada em modelo de infecção dos animais (LOPEZ et al., 2003). Entretanto, a avaliação de

maior número dos isolados clínicos de *Mtb Beijing* obtidos nas diferentes regiões geográficas em testes de virulência em animais (BARCZAK et al, 2005; ABEBE and BJUNE, 2006; AGUILAR et al, 2010) e em modelos *in vitro* de infecção de macrófagos (ZHANG et al, 1999; LI et al, 2002;. THEUS et al, 2007) demonstrou ampla gama de fenótipos inflamatórios e de virulência dessas cepas.

As diferenças observadas na virulência das cepas *Beijing* de *Mtb* sugerem heterogeneidade genética da linhagem *Beijing*. Estudos filogenéticos usando genotipagem micobacteriana e sequenciamento do genoma demonstrou que a linhagem *Beijing* compartilha o mesmo perfil de spoligotipagem e deleções nas regiões de diferenciação (RD) 105 e RD207 em todas as cepas *Beijing* (BIFANI et al, 2002; GAGNEUX et al, 2006), e foi evoluindo em diferentes subgrupos que são definidos pela exclusão de outras regiões, como a RD181, RD150 e RD142 (TSOLAKI et al, 2005; GAGNEUX e SMALL , 2007). Outros estudos esclareceram a importância filogenética destas deleções, como demonstrado por Faksri, em 2011 (Fig. 4). Apenas a deleção na região RD181 originou um novo ramo filogenético (o subgrupo RD181), enquanto que as outras deleções eram encontradas em diferentes linhagens independentes.

A principal subdivisão da linhagem *Beijing* de *Mtb* está baseada na presença de inserções *IS6110* na região do locus NTF. Cepas *Beijing* da sublinhagem ancestral (atípica) caracterizam-se por não possuírem a inserção na região do locus NTF e, além disso, pode incluir cepas com o RD181 intacto (chamadas ancestrais “jovens”), bem como cepas com a deleção no RD181 (chamadas ancestrais “clássicas”). As cepas *Beijing* da sublinhagem moderna (típica) diferem das cepas ancestrais por possuírem a inserção de uma cópia (a maioria das cepas *Beijing*) ou duas cópias (sublinhagem W *Beijing*) de *IS6110* na região do locus NTF, além da deleção do RD181 (PLIKAYTIS et al, 1994; MOKROUSOV et al. , 2006). Além disso, uma discriminação entre as cepas *Beijing* ancestrais e modernas também pode ser feita através da detecção de alterações em genes mutantes putativos, *mutT2* e *mutT4*. As cepas mais ancestrais, que se assemelham com o precursor comum da linhagem *Beijing*, possuem genes *mutT* intactos. As cepas ancestrais posteriores possuem uma mutação no gene *mutT4*, enquanto as cepas modernas do subgrupo RD181, e todos os outros ramos descendentes, foram caracterizados por uma mutação adicional no gene *mutT2*, além da modificação na região do locus NTF (RAD et al, 2003; FAKSRI et al, 2011; RINDI, 2009). Um resumo destas

modificações genéticas que caracterizam as sublinhagens *Beijing* de *Mtb* está demonstrado na figura 4.

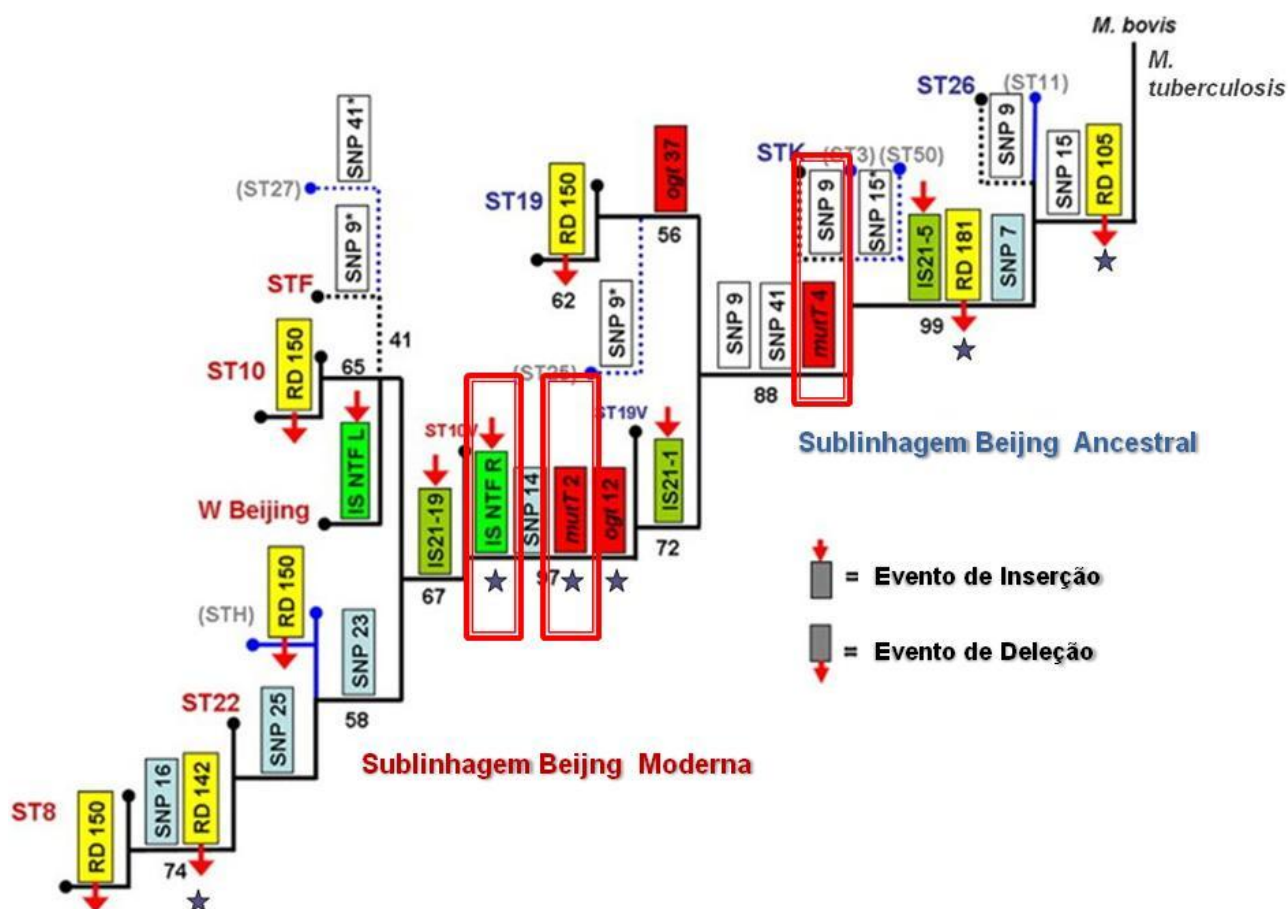


Figura 4. Árvore filogenética da linhagem genética *Beijing* de *Mtb*. Figura modificada de FAKSRI et al, 2011. Destacado em vermelho as principais alterações genéticas que discriminam as sublinhagens *Beijing*.

A virulência de cepas *Beijing* das sublinhagens moderna e ancestral, comparando com outros grupos filogenéticos da família *Beijing* de *Mtb*, só a pouco tempo começou a ser pesquisada.

### 1.5. Virulência micobacteriana e modelos de infecção experimental

Virulência pode ser definida como a capacidade de um microorganismo de infectar o organismo hospedeiro e induzir um processo patológico, a doença, escapando das defesas do sistema imune (SILVER et al, 1998).

Grande parte das informações existentes hoje na literatura sobre a variabilidade das diferentes cepas de *Mtb* vem de modelos animais experimentais, principalmente modelos murinos (camundongos isogênicos), que possuem uma

resposta imune uniforme, permitindo analisar a diversidade genética entre as cepas. Apesar destes estudos não poderem ser extrapolados para a infecção humana, eles nos permitem avaliar as diferenças existentes entre as diferentes cepas bacterianas, ajudando a conhecer melhor a patogênese da doença (HERNÁNDEZ-PANDO et al, 2012).

Nos modelos murinos usados para estudar a virulência de diversos isolados clínicos de *Mtb* os parâmetros mais importantes usados para avaliar a virulência são as taxas de sobrevivência dos animais infectados, a carga bacilar no pulmão e a extensão das lesões causadas no tecido (MANCA et al, 1999). A avaliação do crescimento das cepas de *Mtb* em macrófagos *in vitro* é outro método para a avaliação das propriedades biológicas de uma micobactéria associada à virulência, tais como taxa de crescimento intracelular e indução da morte das células hospedeiras (STOKES E DOXSEE, 1999; RIENDEAU e KORNFELD, 2003).

Embora o modelo murino seja o mais usado para o estudo da resposta imune desenvolvida por *Mtb*, as linhagens de camundongos comumente utilizadas, C57BL/6 e BALB/c, não são capazes de reproduzir a patologia da TB como na doença humana. Em camundongos, o início da resposta imune inata contra *Mtb* é caracterizado pela fagocitose de *Mtb* pelos macrófagos alveolares e acumulação progressiva de monócitos, macrófagos intersticiais inflamatórios, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos nos pulmões. Este acúmulo de células, no início observado em volta dos vasos e brônquios, se expande, estabelecendo os granulomas, que nos camundongos são difusos e menos organizados, em comparação com humanos. Podemos citar outras diferenças como, ausência de necrose intragranulomatosa, não há formação de cápsula fibrótica e fase de latência, apresentando uma progressão lenta da doença. As linhagens de camundongos suscetíveis apresentam necrose, mas normalmente ocorre uma rápida progressão da doença, que leva a morte precoce, o que dificulta utilização destes animais para estudo da patogenia (O’GARRA et al, 2013)

Apesar de algumas desvantagens do modelo murino, podemos citar importantes vantagens deste modelo, como o tamanho do animal, a disponibilidade, o custo, além da existência de uma variedade de reagentes imunológicos disponíveis (GUIRADO e SCHLESINGER, 2013)

Vários estudos vêm sendo realizados com a finalidade de avaliar o perfil de virulência e indução de resposta imune das cepas de *Mtb* do genótipo *Beijing*. Foi

demonstrado que diferentes cepas de *Mtb* com genótipo *Beijing* podem apresentar diferenças na virulência e indução de resposta imune. Lasunskaja et al (2010) mostrou diferenças no crescimento intracelular em macrófagos infectados *in vitro* de diferentes isolados clínicos com genótipo *Beijing* de duas regiões geográficas distintas, Rússia e Brasil, com alta e baixa prevalência deste genótipo na população das cepas de *Mtb* local. Além disso, as cepas também apresentaram diferenças na citotoxicidade e indução na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelas células hospedeiras.

Em outro estudo mais recente, Chen et al (2014) demonstrou que cepas das sublinhagem ancestral e moderna da família *Beijing* diferiam na indução de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos infectados, onde as cepas modernas (com RD150 e 142 intactos) produziam níveis muito baixos destas citocinas.

As cepas da sublinhagem moderna, diferentemente das cepas ancestrais, estão largamente disseminadas atualmente no mundo, apresentando um rápido aumento na sua prevalência em algumas regiões geográficas, o que sugere sua maior transmissibilidade e/ou patogenicidade. Entretanto, a virulência das cepas *Beijing* das duas sublinhagens em testes diretos (modelos *in vivo* e *in vitro*) ainda precisa ser melhor avaliada. Desta forma, novas investigações são necessárias a fim de esclarecer de que forma as diferenças genéticas podem estar relacionadas com a virulência da bactéria e a patogenicidade da doença, e se isso tem relevância epidemiológica.



## 2. OBJETIVOS

---

### Objetivo Geral:

Caracterizar as cepas de *Mtb*, da família genética *Beijing*, das duas principais sublinhagens, ancestral e moderna, com relação à virulência bacteriana e caráter da resposta imune induzida pela bactéria, utilizando modelos de infecção *in vivo* e *in vitro*.

### Objetivos específicos:

- ❖ Determinar o perfil de virulência micobacteriana e avaliar o caráter da resposta imune anti-micobacteriana num modelo de infecção intratraqueal *in vivo* em camundongos C57BL/6 através de:
  - Determinação da curva de sobrevivência dos animais;
  - Avaliação do crescimento da bactéria nos pulmões (ensaio CFU - *Colony-forming unit* - Unidades formadoras de colônia);
  - Análise macroscópica e histopatológica pulmonar;
  - Quantificação da produção de citocinas e quimiocinas (TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6, MCP-1, MIP-2, KC, IL-1 $\beta$ , IL-17 e IFN- $\gamma$  e NO) pelas células de pulmão *ex vivo*;
  
- ❖ Caracterizar os isolados clínicos de *Mtb* de genótipo *Beijing*, quanto à resposta dos macrófagos às micobactérias *in vitro*, avaliando os seguintes parâmetros:
  - Quantificação do crescimento das micobactérias em células infectadas *in vitro*;
  - Quantificação da citotoxicidade celular (morte celular) induzida pelas diferentes cepas de *Mtb*;
  
- ❖ Comparar a virulência e particularidades patogênicas das cepas de sublinhagens ancestral e moderna da família genética *Beijing*, associando características fenotípicas e genéticas das bactérias.

### 3. METODOLOGIA

---

#### 3.1. Considerações metodológicas

Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram executados adotando as medidas de biossegurança necessárias para manipulação adequada de agentes biológicos de classe de risco III, no qual *Mtb* está classificado (Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias, Ministério da Saúde, 2008). O trabalho experimental com micobactérias vivas foi executado em cabines de Biossegurança nível II-All nos Biotérios de BS reforçada (NB3) da UENF e na USP (Instituto de Ciências Farmacológicas, USP, SP), utilizando os equipamentos de proteção individual (jaleco de mangas compridas, jaleco descartável, luvas, máscara N-95, touca, sapatos fechados e pró-pés). Desinfetante hipoclorito de sódio a 2,5% foi utilizado para descontaminação do material líquido contaminado. Todo lixo e material contaminado produzido foram acondicionados em sacos de autoclave e descontaminados por 30 minutos a 121°C e 1atm antes do descarte.

#### 3.2. Seleção das cepas de *Mtb* do genótipo *Beijing* para estudo

A escolha das cepas utilizadas neste estudo foi baseada num *screening* prévio com 26 cepas de *Mtb* de genótipo *Beijing*, onde o perfil de virulência *in vitro* foi avaliado através de características como crescimento intracelular em macrófagos humanos, crescimento em meio de cultura micobacteriano (Middlebrook 7H9), citotoxicidade e produção de citocinas pelos macrófagos infectados (LASUNSKAIA et al, 2010; GOMES, 2011; GOMES et al, 2015). Foram avaliadas cepas *Beijing* de países com dispersão secundária da TB, como Brasil, Rússia e Moçambique.

Todas as cepas foram caracterizadas geneticamente através de spoligotipagem, 24 loci-MIRU-VNTR e IS6110 RFPL. Um estudo filogenético das cepas com objetivo de identificar as cepas das sublinhagens ancestral (atípica) e moderna (típica) da família genética *Beijing* foi realizado através da análise da orientação de IS6110 na Região do locus NTF, detecção de RDs, com deleções típicas para o genótipo *Beijing* (RD 105, RD142, RD 150 e RD 181) e sequenciamento dos SNPs nos genes *mutT2*, *mutT4* (GOMES, 2011).

A partir do *screening*, selecionamos seis cepas de *Mtb* de genótipo *Beijing* pelos seguintes critérios de seleção:

1- Cepas *Beijing* com genótipos mais próximos, que forem pertencentes ao subgrupo RD181 (deleção de RD181, RD207, RD105) e com diferença mínima em 24-MIRU-VNTRs (em 2-3 loci);

2- Cepas com diferenças em marcas genéticas que discriminem as sublinhagens ancestral e moderna, como mutações nos genes *mutT2* e *mutT4* e a inserção de *IS6110* na região do locus NTF.

Também usamos como referência uma cepa *Beijing* da Rússia, de alta virulência, pertencente ao clone epidêmico B0/W148 (LASUNSKAIA et al, 2010) e a cepa laboratorial H37Rv como referência de baixa virulência.

**Tabela 1 – Cepas de *Mtb* utilizadas neste trabalho.**

CEPAS	FAMILIA	ORIGEM GEOGRÁFICA	24 LOCI-MIRU-VNTR	Inserções de <i>IS6110</i> na região NTF	mutT2	mutT4	SUBLINHAGEM
H37RV		ATCC	-	-			-
M442	BEIJING	MOÇAMBIQUE	223325173543424354433427	Sem inserção	Livre de mutação	Livre de mutação	Ancestral
ZT272	BEIJING	BRASIL	223325173533424444433637	Sem inserção	Livre de mutação	Mutação codon 48	Ancestral
ZT264	BEIJING	BRASIL	223325173533424444433737	Sem inserção	Livre de mutação	Mutação codon 48	Ancestral
M467	BEIJING	MOÇAMBIQUE	223325173543424354433427	Uma inserção	Mutação codon 58	Mutação codon 48	Moderna
1471	BEIJING	RÚSSIA	223325173533424454443627	Uma inserção	Mutação codon 58	Mutação codon 48	Moderna
2172	BEIJING	BRASIL	223326173433425454433623	Uma inserção	Mutação codon 58	Mutação codon 48	Moderna
M299	BEIJING	MOÇAMBIQUE	223325173533424354433427	Uma inserção	NR	NR	Moderna

\* Sublinhado representa a diferença na repetição de cada loci.

NR – não realizado.

As cepas de *Mtb* do genótipo *Beijing* do Brasil foram isoladas em São Paulo e no Rio de Janeiro. Elas foram genotipadas e gentilmente cedidas pela Dr<sup>a</sup> Maria Alice Telles (Instituto Adolfo Lutz, SP) e pelo Dr. Afrânio Kritski e Dr. Philip Suffys (UFRJ e Fiocruz, RJ). As cepas de *Mtb* do genótipo *Beijing* isoladas em Moçambique foram disponibilizadas pela Dr<sup>a</sup> Alessandra Panunto (Unicamp, SP), e a cepa de *Mtb* do genótipo *Beijing* proveniente da Rússia foi isolada na cidade de São Petersburgo e genotipada pelo Dr. Igor Mokrousov (*St. Petersburg Research Institute of*

*Phthiopulmonology* - Rússia). A cultura da cepa padrão de *Mtb* H37Rv (ATCC) foi cedida pelo Dr. Philip Suffys (Fiocruz, RJ).

### **3.3. Cultivo dos isolados clínicos de *Mtb***

Para avaliar as propriedades biológicas das cepas *Beijings* selecionadas para este estudo, as culturas dos isolados clínicos foram cultivadas em meio de cultura sólido Lowenshtein-Jensen (LJ) (DIFCO), com suplemento a base de ovo de galinha, pelo período de 21 dias a 37°C, e estocados a 2-4°C. Estas culturas foram usadas para experimentos *in vitro* e em infecções com camundongos *in vivo*. Também foram utilizadas nos experimentos, a fim de comparação, a cepa *Mtb* H37Rv (cepa laboratorial, padrão de virulência).

Foram retiradas colônias do meio de cultura sólido LJ e suspensas em meio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson), acrescido de 0,05% Tween 80 e suplementado com 10% de meio de enriquecimento ADC (albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson) durante 7 dias com agitação diária, e congeladas em alíquotas de 1mL ( $10^7$  a  $10^8$  bactérias) em -70°C.

Para execução dos experimentos, as bactérias foram retiradas do -70°C, descongeladas e adicionadas em meio Middlebrook 7H9 acrescido de 0,05% Tween 80 e 10% de meio de enriquecimento ADC. A cultura em suspensão foi agitada no vórtex (BIOMATIC) e sonicada em banho de ultrassom (Ultrasonic Maxi cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto para dispersão dos grumos (FATTORINI et al., 2002). As culturas foram incubadas em estufa (Cellstar Equipament) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 7 dias. No sétimo dia as cepas estavam prontas para o uso nos experimentos.

Para avaliar a viabilidade micobacteriana foi usado o método bacteriológico de contagem de células em meio sólido, ensaio CFU. Para dosagem do número de bactérias a serem utilizadas, foi feita a leitura espectrofotométrica (Hitachi – model U-1100) com o comprimento de onda de 600nm, após passagem no ultrassom. Com a relação prévia da densidade óptica *versus* número de bacilos (DO 0,100 x  $10^7$  bacilos/mL), foram feitas diluições seriadas da cultura em PBS 1X, sendo então plaqueado uma alíquota de 50µL das diluições desejadas em placas de Petri contendo Ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase – Becton Dickinson), sendo estas incubadas por 24 dias em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.4. Animais**

Os camundongos C57BL/6 livres de germes, com idade entre 6 e 8 semanas, adquiridos do Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) e do Biotério Central Thereza Liberman Kipnis da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF - Campos/RJ), foram infectados e mantidos em microisoladores (estantes ventiladas) no biotério de Biossegurança reforçada do Biotério Central da UENF, de acordo com os procedimentos padronizados de nível BS3. Uma parte dos experimentos com animais infectados será realizada no Biotério BS3 no Departamento de Ciências Farmacêuticas da USP (São Paulo) sobre responsabilidade do Dr. Mario Hirata. O projeto de estudo de virulência das cepas de *Mtb* foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da UENF (CIBio-03/07, 2007), pela Comissão de Ética no Uso de Animais, CEUA, da UENF (protocolo nº 198, 2012) e pela CEUA do Instituto de Ciências Médicas da USP (protocolo nº 26, 2009).

### **3.5. Infecção experimental dos camundongos e avaliação de sobrevivência dos animais**

Os animais foram anestesiados com uma mistura de Anazedan - xilazina (15mg/kg – Vetbrands) e Dopalen - ketamina (110mg/kg - Vetbrands) sendo diluídos em solução salina estéril e aplicada, em temperatura ambiente, uma alíquota de 90-120µL via intraperitoneal. Em seguida, infectados através de instilação intratraqueal com bactérias vivas de *Mtb*, na dose de 100 bacilos (baixa dose) e 2.500 bacilos (alta dose), em volume de 60µL por animal. Os animais controles receberam 60 µL de PBS estéril.

Foram averiguados os seguintes parâmetros: mortalidade dos animais infectados, carga bacilar (CFUs) no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia), relacionando ao peso do pulmão e o número de células no pulmão, e produção de citocinas e quimiocinas *ex vivo*. Para as análises, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical no 28º ou 120º dia após a infecção.

### **3.6. Extração dos bacilos e obtenção de células do pulmão**

Para a obtenção de bacilos presentes no pulmão, foi coletado o lóbulo superior esquerdo do pulmão, pesado, e colocado em 2 mL de meio RPMI-incompleto (Gibco). Com o auxílio de pinças curvas, este órgão foi macerado e mantido no gelo. Logo, foi acrescido 3 mL de solução de digestão composta por 1µg/mL de Liberase Blendzyme 2 (Roche), 0,1µg/mL de DNase I de pâncreas bovino (Sigma) e incubado a 37°C e 0,5% CO<sub>2</sub>, por 40 minutos sob agitação. Os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10 mL, por 10 ciclos de homogeneização. A seguir, a amostra foi filtrada em *cell strainer* (Corning).

Do homogeinato foi retirada uma alíquota de 100µL, que foi destinada para dosagem bacteriana através do plaqueamento em meio 7H10. Foram feitas diluições seriadas e plaqueadas em meio Middlebrook 7H10, acrescido de 10% de meio de enriquecimento OADC (BD BBL). O homogeinato restante foi processado para obtenção de células, a fim de quantificar a produção de citocinas e mediadores inflamatórios.

As hemácias foram depletadas com tampão de lise (0,144 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,0169 M TRIS base, pH 7.4) a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 5 minutos. As células foram quantificadas e plaqueadas em placas de 96 poços (5.10<sup>5</sup> células/mL). As placas com a cultura celular foram lacradas e incubadas, por 48hs, em estufa bacteriológica a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio de cultura RPMI com 10% SFB e 5% de gentamicina (20µg/ml).

### **3.7. Histopatologia**

#### **3.7.1. Método de Coloração com Hematoxilina-eosina**

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

Após a fixação, um lóbulo direito do pulmão foi fotografado para a avaliação macroscópica das mudanças morfológicas do órgão. Em seguida, as seções foram

lavadas com água destilada por 30 minutos, logo passadas por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1h em cada concentração e, então, passadas por dois banhos contendo xilol por 1h cada, estando estes, preparados para a inclusão na parafina, por 30 minutos.

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

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

### **3.7.2. Método de Ziehl-Neelsen**

Os órgãos foram fixados, emblocados e cortados como descrito no item 3.7.1. A amostra devidamente lavada foi imersa em solução aquecida de Carboxi fuscina por 30 minutos. O material foi bem lavado com água corrente e então gotejado com álcool-ácido 1% até a amostra tornar-se rosa pálido. A amostra foi lavada novamente em água corrente por 8 minutos, com posterior imersão em azul de metileno (10mL da solução estoque [1,4g de azul de metileno + 100mL de álcool etílico 95%] + 90mL de água destilada). Os cortes então sofreram fixação permanente com Permount.

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

As lâminas foram examinadas com o uso do microscópio Axioplan 2 (Carl Zeiss, Inc.) e as imagens das seções dos pulmões foram capturadas pela câmera Coolpix P995 (Nikon) acoplada ao microscópio. As fotos, no aumento de 100X, foram analisadas com o uso do programa Image J (NIH, Bethesda, MD) para a determinação morfométrica da área de inflamação no pulmão (área de pneumonia) presente em cada imagem. As imagens coloridas foram transformadas em imagens pretas e brancas, e as cores foram designadas da seguinte forma: preto representa as áreas aeradas (alvéolos), e o branco representa o tecido pulmonar, incluindo

tecido não inflamado e inflamado. Após o estabelecimento das cores, o software identificou as áreas aeradas e não aeradas em cada foto. Para quantificar a porcentagem de área de tecido não aerado, nós determinamos a média das porcentagens de área de 10 fotos de seções de pulmão de camundongos não infectados (controle) e de cada um dos diferentes grupos de camundongos infectados. Para quantificar a porcentagem de área inflamada (área de pneumonia), a média do percentual da área de tecido do pulmão controle foi subtraída do percentual da área de tecido pulmonar de cada grupo infectado.

### **3.8. Cultura de células**

Células derivadas de medula óssea de camundongos C57BL/6 foram coletadas assepticamente de ambos os fêmures com auxílio de tesoura e pinça e colocadas em 5mL de meio DMEM-F12 acrescido de 10% SFB e 5% de gentamicina (20µg/ml). A cultura foi mantida *overnight* na estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, para depleção das células já diferenciadas (que ficaram aderidas). No dia seguinte foi coletado o sobrenadante, contendo os precursores mielóides da medula, e centrifugado a 1200 rpm por 5 min para sedimentar as células e retirar o meio contendo gentamicina. O *pellet* foi ressuspensão em 5mL de meio de cultura (DMEM-F12 suplementado com 10% SFB) acrescido de 20% de meio condicionado da cultura da linhagem de fibroblastos L929 como fonte de M-CSF, previamente coletado, centrifugado e armazenado a -20°C. A cultura, contendo o diferenciador, foi incubada na estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Após 3 dias de incubação foram acrescidos 5mL de meio de cultura suplementado com sobrenadante de L929 e novamente incubadas. No sétimo dia de diferenciação os macrófagos foram colocados em meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB para execução do experimento. Para os experimentos, os macrófagos foram plaqueados ( $5 \cdot 10^5$ /mL) em placas de 96 poços (Costar), 24 horas antes da infecção.

#### **3.8.1. *Infecção dos macrófagos in vitro***

Os macrófagos foram infectados em diferentes proporções: MOI = 1:1 (uma bactéria por macrófago), para análise do crescimento intracelular das micobactérias e MOI = 10:1 para avaliação da morte celular. Pelo menos 6 poços foram infectados



para cada tipo de avaliação. Após 3h de contato bactéria-macróforo, ocorrendo à fagocitose das bactérias, o sobrenadante foi removido para a retirada das bactérias extracelulares, e a monocamada das células foi lavada com PBS. Posteriormente foi adicionado meio DMEM-F12 completo (dia 0). As células infectadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 6 dias.

### **3.8.2. Quantificação do crescimento intracelular das micobactérias**

A quantificação das bactérias em macróforos infectados (MOI = 1:1) após 3h (dia 0) e 6 dias (dia 6) de infecção, foi feita por plaqueamento em meio sólido (ensaio de CFU). Os macróforos foram lisados com solução de saponina a 0,1% por 20 minutos. O lisado foi vigorosamente agitado, sonificado em ultrassom de banho, e diluído em PBS estéril na diluição de 10<sup>-1</sup> (dia 0) e 10<sup>-3</sup> (dia 6). Uma alíquota de 40µL da diluição foi semeada em ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com 10% de meio de enriquecimento OADC. As placas foram incubadas por 21 dias em estufa à 37°C, as colônias foram quantificadas (em CFU/mL) e os valores expressos em Log<sub>10</sub>. A capacidade de crescimento intracelular de cada cepa foi expressa através da média dos aumentos dos Logs de cada cepa nos dias 0 e 6 (Log<sub>10</sub>CFUdia6 – Log<sub>10</sub>CFUdia0).

### **3.8.3 Avaliação da morte celular dos macróforos infectados**

Os macróforos foram cultivados em placas de 96 poços e infectados com as micobactérias, como descrito anteriormente. Amostras de sobrenadante das culturas dos macróforos controle e infectados com MOI = 10:1 foram coletados no 4º dia de infecção e avaliados para indução de morte celular através da quantificação da Deidrogenase Láctica (*LDH Test*) usando kit de quantificação comercial.

### **3.9. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios**

As células do infiltrado pulmonar (5.10<sup>5</sup> células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas, por 48hs, em estufa bacteriológica a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em meio de cultura RPMI com 10% SFB e 5% de gentamicina (20µg/mL). O sobrenadante da cultura foi coletado, filtrado e armazenado a -80°C. O nível de citocinas e quimiocinas produzido por estas células do infiltrado foram quantificadas

através do sistema BioPlex (BioRad) empregando *multiplex bead array system* (*microplate platform*).

O NO produzido no sobrenadante das culturas também foi quantificado para a através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). O volume de 50  $\mu\text{L}$  de sobrenadante foi acrescentado a 50 $\mu\text{L}$  de uma mistura da solução A (2,5 ml de ácido fosfórico, 0,5g de sulfanilamida, 47,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  de milliQ) e solução B (0.05g de N-1-naphitiletlenodiamida, 50mL de  $\text{H}_2\text{O}$  de milliQ) de Griess (vol/vol) numa placa de 96 poços e incubado por 10 minutos na estufa a 37°C. A leitura foi feita em leitor de microplacas (leitor de ELISA (Dynatech MR5000)), no comprimento de onda de 570nm. A curva padrão foi feita utilizando diluições de  $\text{NaNO}_3$  de 200  $\mu\text{M}$  a 1.56  $\mu\text{M}$ .

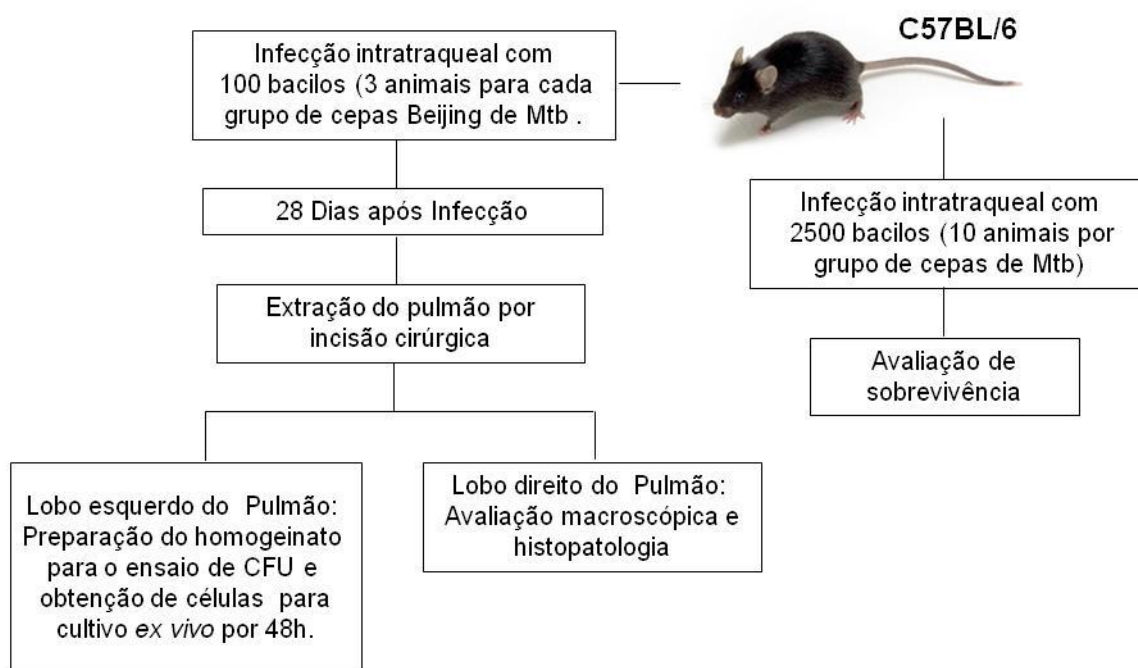
### **3.10. Análises Estatísticas**

As análises estatísticas foram feitas baseadas nos métodos “One-way ANOVA” e o Teste de Bonferroni como *post test*, sendo estes executados com auxílio do programa GraphPad Prism version 5.02 para o Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, <http://www.graphpad.com>. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste Log-rank (Mantel-Cox), com auxílio do programa citado acima.

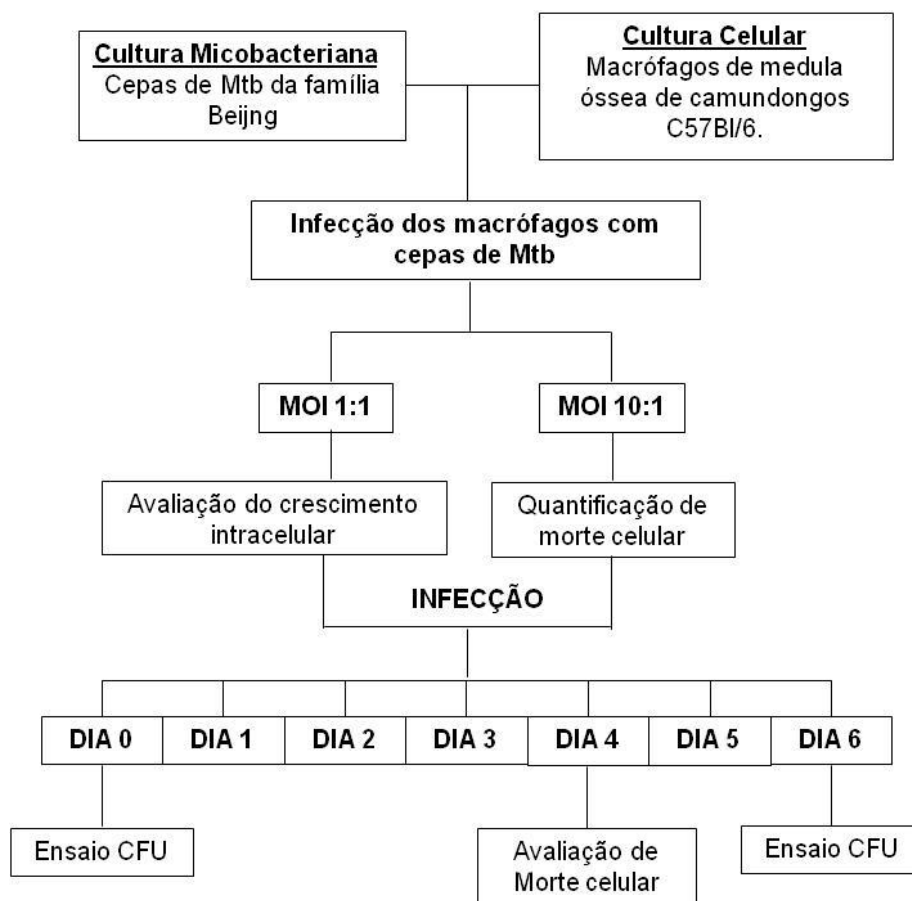
### **3.11. Delineamento Experimental**

Segue abaixo o delineamento dos experimentos realizados neste trabalho:

**MODELO IN VIVO**



**MODELO IN VITRO**



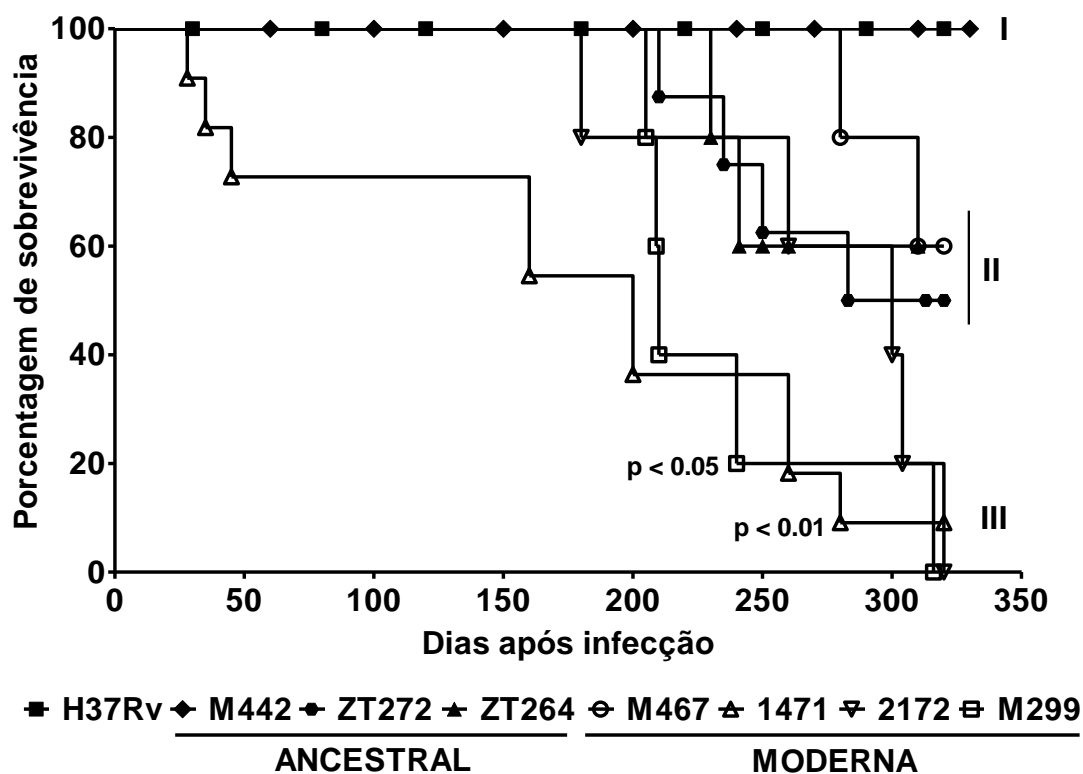
## 4. RESULTADOS

---

### 4.1. Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados

Primeiramente, para determinar a virulência relativa das cepas *Beijing* em estudo, comparadas com as cepas de referência (H37Rv – baixa virulência e cepa Beijing 1471 – alta virulência), avaliamos os tempos de sobrevivência dos camundongos infectados após a infecção pelas diferentes cepas *Beijing*, ancestrais e modernas. Os camundongos C57BL/6 foram inoculados i.t. com 100 bacilos (baixa dose – Fig. 5) ou 2.500 bacilos (alta dose – Fig. 6) para cada cepa, num grupo de 10 animais por cepa e foram monitorados quanto à viabilidade dos animais.

Na figura 5 observamos que do grupo de camundongos infectados com cepas da sublinhagem moderna (1471, 2172 e M299), 80% sucumbiram à morte no período de 260 dias. Os camundongos infectados com a cepa 1471 começaram a morrer antes dos infectados com outras cepas, no final da fase aguda de infecção com 27 dias p.i. Ao contrário, todos os camundongos infectados com a cepa H37Rv e a cepa M442 (sublinhagem ancestral) mantiveram sua viabilidade durante o período de 360 dias. Os animais infectados com as cepas ZT272 e ZT264, da sublinhagem ancestral, e a cepa M467, da sublinhagem moderna, sobreviveram até a fase crônica de infecção, começando a morrer a partir dos 200 dias p.i.. Os camundongos infectados com as cepas da sublinhagem moderna sucumbiram mais rapidamente que as cepas da sublinhagem ancestral, sendo estatisticamente significantes as cepas 1471 (\*\*,  $P < 0.01$ ) e M299 (\*,  $P < 0.05$ ), quando comparadas a cepa H37Rv.

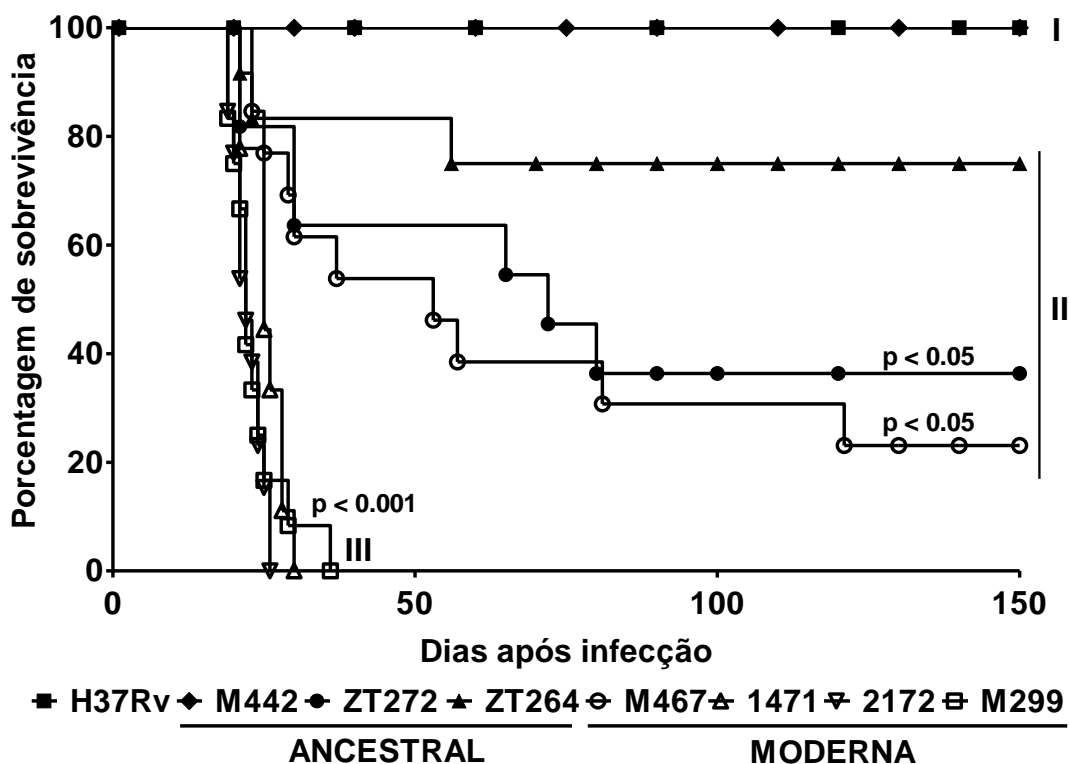


**Figura 5 – Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas *Mtb Beijing* em baixa dose de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com baixa dose (100 bacilos). Foram infectados 10 camundongos de cada grupo. Os camundongos foram observados pelo período 350 dias e a data da morte de cada camundongo foi contabilizada. Estes resultados foram obtidos de três experimentos independentes.

De acordo com estes resultados podemos distinguir três padrões distintos de virulência, o primeiro de relativa baixa virulência (padrão I), o segundo de virulência intermediária (padrão II), e o terceiro de alta virulência (padrão III). As cepas do padrão III, que apresentaram uma alta virulência, foram representadas por duas cepas da sublinhagem moderna, uma isolada no Brasil (2172) e a outra em Moçambique (M299), que tiveram um perfil de virulência comparado à cepa moderna da Rússia (1471), de alta virulência. O padrão II incluiu cepas de ambas sublinhagens, uma cepa moderna (M467) e duas cepas ancestrais (ZT272 e ZT264), enquanto que o padrão I incluiu uma cepa ancestral (M442) e a cepa de referência laboratorial H37Rv.

A diferença entre os três padrões foi melhor observada na infecção por alta dose (Fig. 6), onde os todos os animais infectados com as cepas do padrão III sucumbiram à infecção num período de 25 a 35 dias p.i., enquanto que alguns animais infectados com as cepas do padrão II começaram a morrer na fase aguda, mas a maioria deles persistiu até a fase crônica, sem que fosse observada a morte destes animais. Os animais infectados com as cepas do padrão I apresentaram

100% de sobrevivência. Quando comparados à cepa H37Rv, todas as cepas apresentaram diferenças estatisticamente significantes, com exceção das cepas M442 e ZT264.



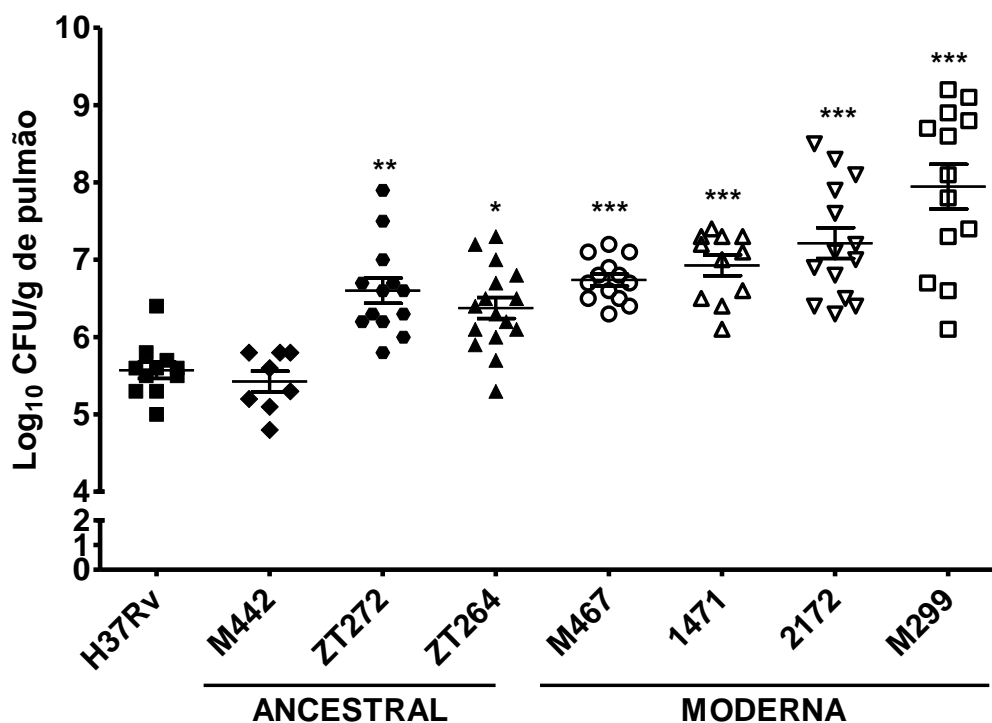
**Figura 6 – Avaliação de sobrevivência dos camundongos infectados com as diferentes cepas *Mtb Beijing* em alta dose de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com alta dose (2.500 bacilos). Foram infectados 10 camundongos de cada grupo. Os camundongos foram observados pelo período 150 dias e a data da morte de cada camundongo foi contabilizada. Estes resultados foram obtidos de três experimentos independentes.

#### **4.2. Avaliação do crescimento bacteriano nos pulmões de camundongos infectados**

No modelo *in vivo*, um dos parâmetros a ser averiguado para avaliar a virulência das cepas *Beijing* de *Mtb* é a capacidade de crescimento destas diferentes cepas no pulmão de camundongos infectados. Deste modo, os camundongos C57BL/6 foram infectados com baixa dose de infecção (100 bacilos), e após 28 dias de infecção (fase aguda de infecção) estes animais foram sacrificados a fim de determinar a quantidade de bacilos no pulmão destes camundongos.

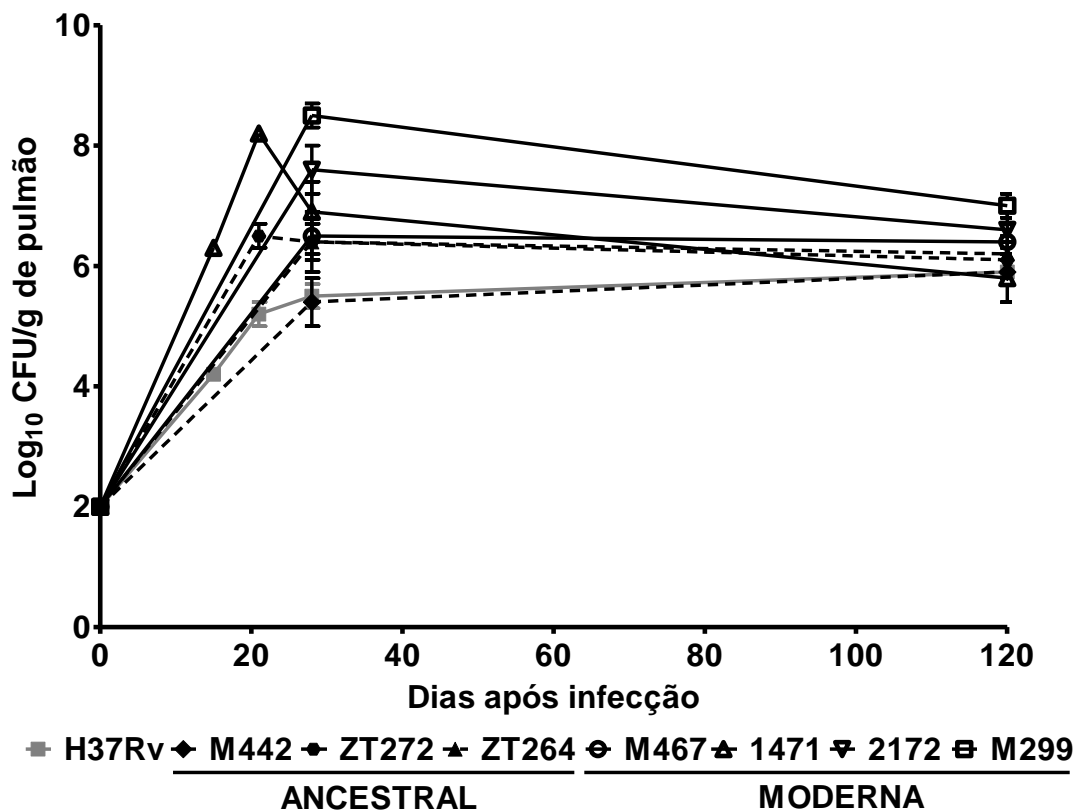
Todas as cepas avaliadas, com exceção da cepa M442, tiveram um crescimento significativamente maior no pulmão dos camundongos infectados do que a cepa H37Rv (Fig. 7). Cepas da sublinhagem ancestral tiveram um

crescimento variando entre Log 7.0 e 8.0, enquanto que a cepa H37Rv e a cepa ancestral M442 tiveram um crescimento menor que Log 6.0. O crescimento das cepas *Beijing* da sublinhagem moderna tiveram em média um crescimento maior que as cepas da sublinhagem ancestral, mas essa diferença não foi estatisticamente significativa.



**Figura 7 – Crescimento bacteriano no pulmão após 28 dias de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Foram infectados 3 camundongos de cada grupo de cepas. O crescimento das micobactérias no pulmão foi avaliado através do ensaio de CFU e este crescimento foi determinado através de Log<sub>10</sub> do número de CFUs/g de pulmão. Estes resultados são média de três experimentos independentes.  $\pm$  SD. \*, P < 0.05; \*\*, P < 0.01; and \*\*\*, P < 0.001, comparando o grupo infectado com a cepa H37Rv.

A curva de crescimento pulmonar das cepas *Beijing* estudadas foi avaliada até 120 dias p.i., com uma cinética mais detalhada para cepas H37Rv, 1471 e ZT272. Podemos observar que o pico de crescimento bacteriano ocorre entre o dia 20 e o dia 30, sendo que após esse período, seguindo para a fase crônica, podemos observar que ocorre uma estabilização do crescimento, onde todas as cepas não apresentam número de bacilos no pulmão significativamente diferentes.



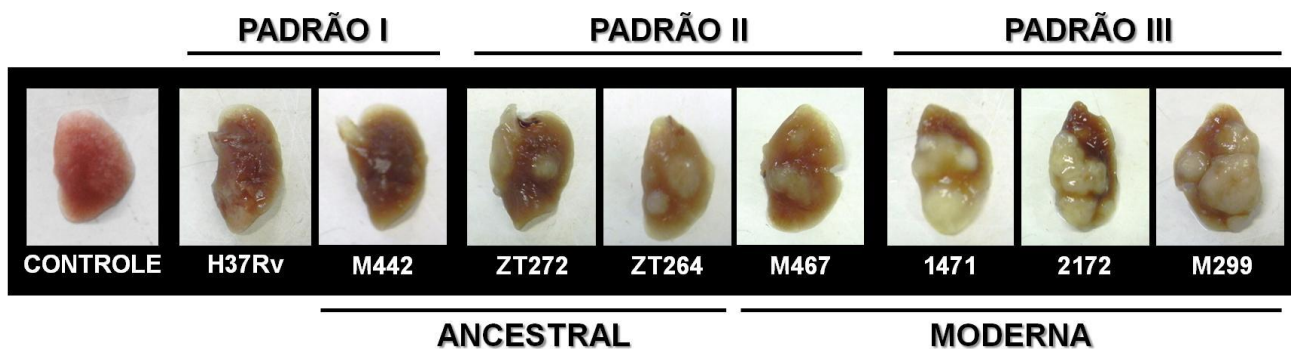
**Figura 8 – Curva de crescimento bacteriano no pulmão em 120 dias de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com 100 bacilos e sacrificados em diferentes períodos após a infecção. Foram infectados 3 camundongos de cada grupo de cepas. O crescimento das micobactérias no pulmão foi avaliado através do ensaio de CFU e este crescimento foi determinado através de Log10 do número de CFUs/g de pulmão. Estes resultados são média de três experimentos independentes.

#### 4.3 Avaliação da macropatologia dos pulmões

Outro importante parâmetro para definir a virulência das cepas *Beijing* estudadas é a habilidade das diferentes cepas em induzir patologia no pulmão dos camundongos infectados. Foram observados diferentes padrões macropatológicos nos pulmões dos animais infectados.

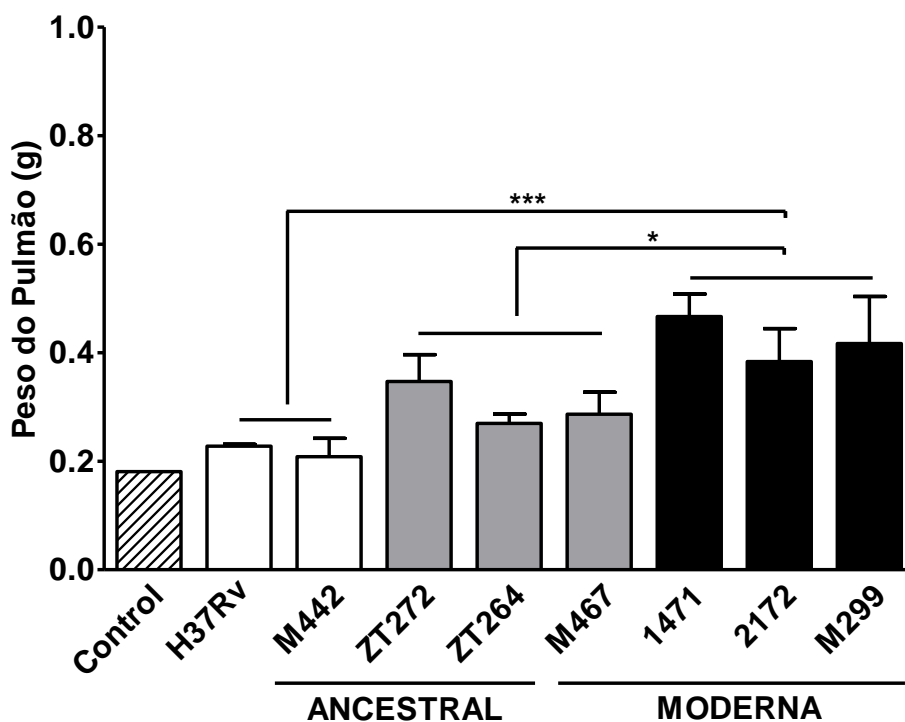
Na **Fig. 9** podemos novamente observar três padrões. Nos pulmões dos camundongos infectados com a cepas H37Rv e a cepa ancestral M442 podemos ver a presença de pequenas lesões multifocais (padrão I). Uma cepa *Beijing* moderna, M467, e duas ancestrais, ZT272 e ZT264, apresentaram menos lesões inflamatórias (padrão II), enquanto que as cepas *Beijing* da sublinhagem moderna 1471, 2172 e M299 apresentaram grandes lesões inflamatórias, onde podemos observar difusos nódulos brancos de diferentes tamanhos (padrão III).





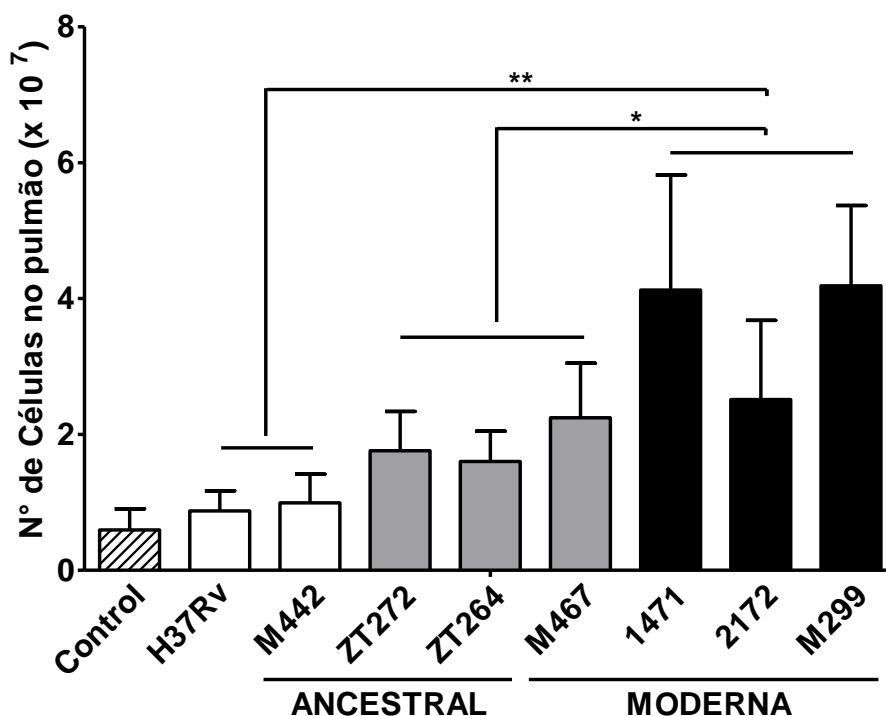
**Figura 9 – Análise macropatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados com cepas *Beijing* de *Mtb*.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos de cada cepa, e os pulmões foram examinados com 28 dias p.i. Foram infectados 3 camundongos de cada grupo de cepas. As imagens são representativas dos pulmões de camundongos infectados por cada cepa *Beijing*.

A presença destes nódulos reflete a intensidade da infiltração do pulmão pelas células inflamatórias o que leva ao aumento da massa do órgão. Com isso, quantificamos o peso do pulmão e os dados estão apresentados na **Fig. 10**, onde podemos observar que as cepas classificadas como padrão III tiveram um peso pulmonar 1,5-2,0 vezes maior que as cepas do padrão I ( $p < 0.001$ ) e 1,3 vezes maior quando comparadas às cepas do padrão II ( $p < 0.05$ ).



**Figura 10 – Peso dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Após a retirada, o pulmão foi pesado em balança de precisão. Este resultado representa a média de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas significativas foram determinadas entre os grupos do padrão I (colunas brancas), padrão II (colunas cinzas) e padrão III (colunas pretas). \*  $p < 0.05$  e \*\*\*  $p < 0.001$ .

O aumento da massa pulmonar também está associado ao aumento do número de células que infiltra nos pulmões dos camundongos infectados. Este aumento pode ser observado na **Fig. 11**, onde podemos observar que o aumento do peso pulmonar é compatível ao aumento do número de células no pulmão, apresentando diferenças significativas entre as cepas do padrão I e II em relação ao padrão III que apresentou um maior número de células no pulmão.

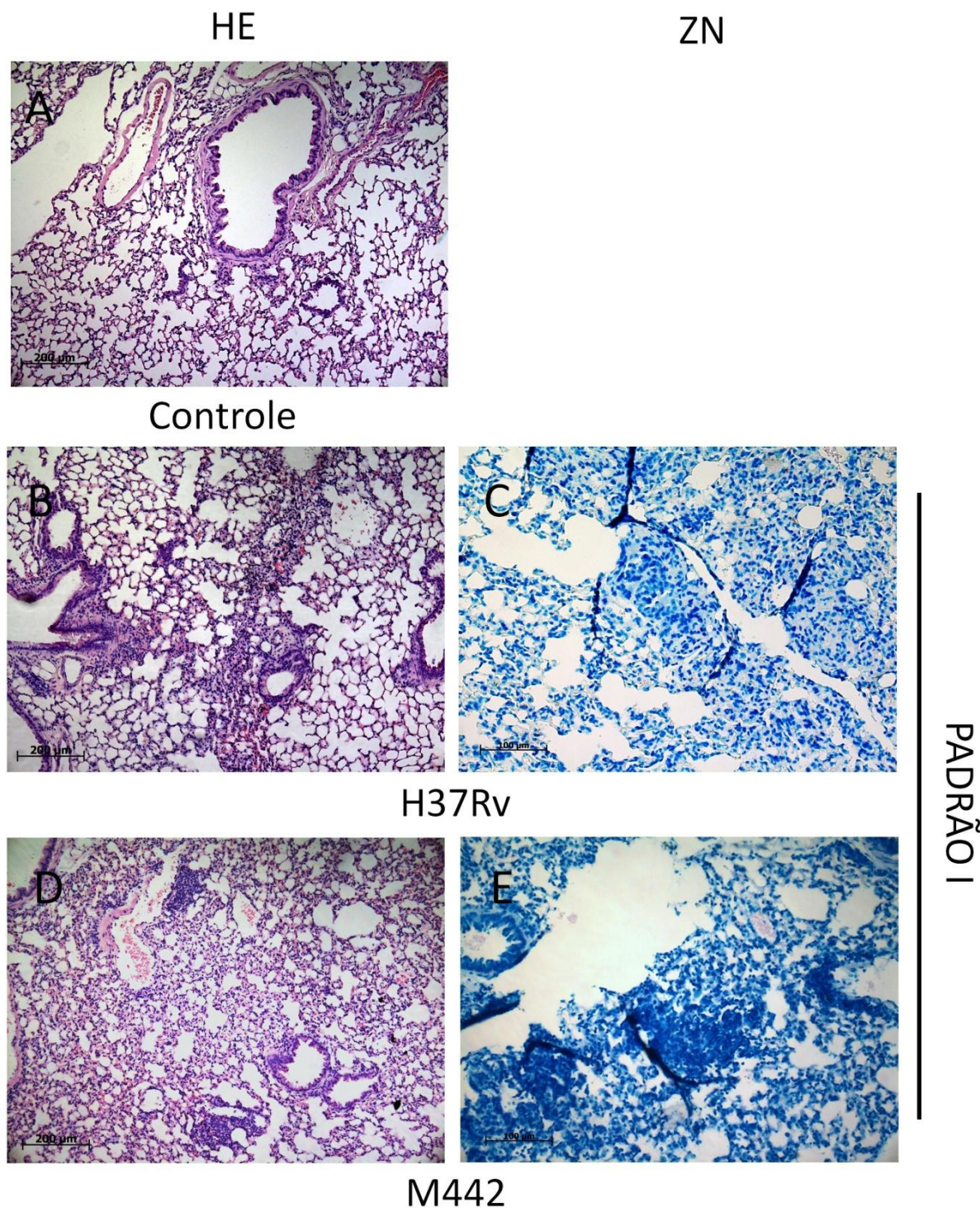


**Figura 11 – Número de células obtido dos pulmões de camundongos C57BL/6 infectados aos 28 dias de infecção.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Após processamento mecânico e enzimático dos tecidos, as células foram quantificadas e os resultados são a média de três experimentos independentes. Diferenças estatísticas significantes foram determinadas entre os grupos do padrão I (colunas brancas), padrão II (colunas cinzas) e padrão III (colunas pretas). \*  $p < 0.05$  e \*\* $p < 0.01$ .

#### **4.4 Avaliação histopatológica dos pulmões**

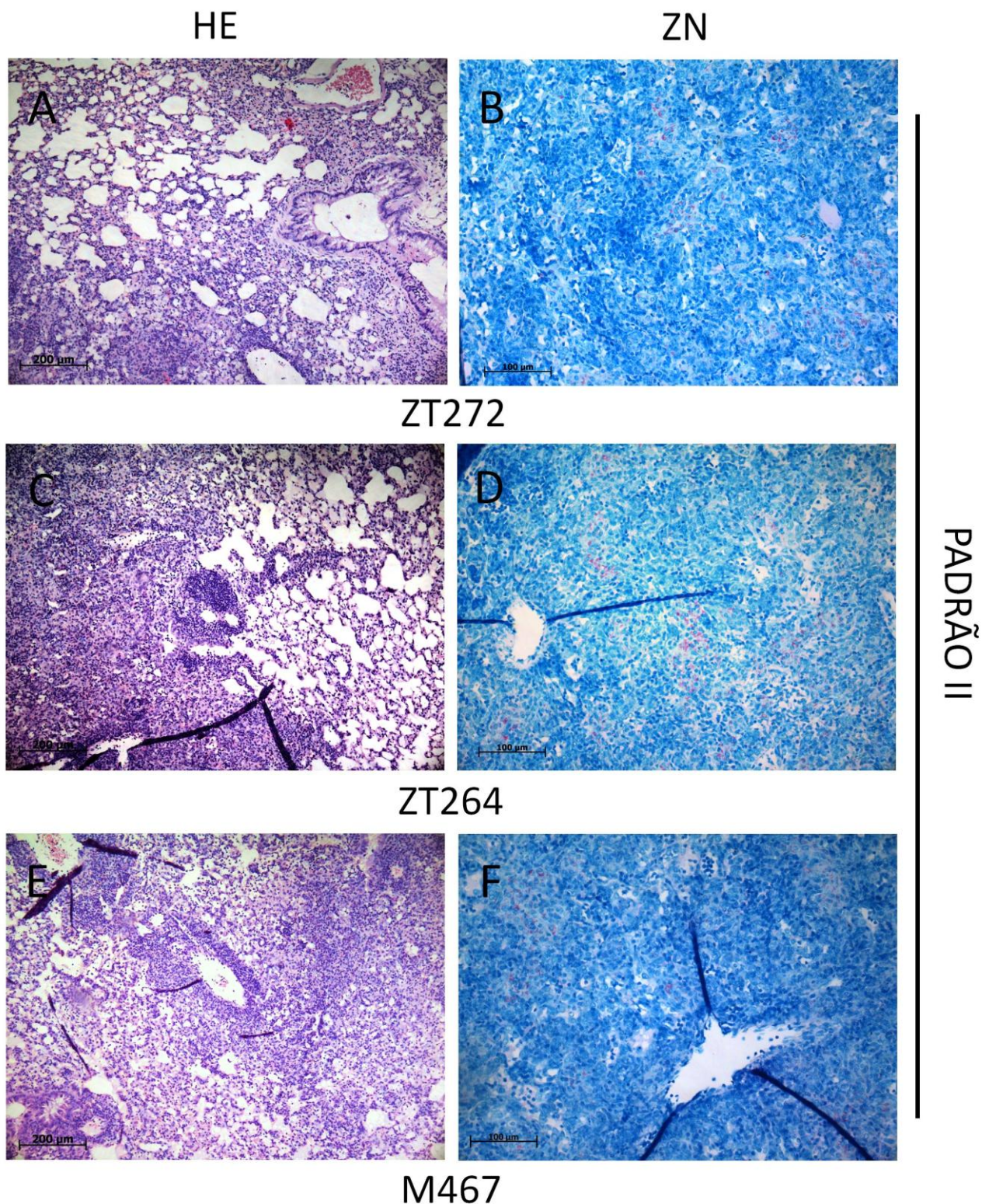
Nas análises microscópicas da histopatologia podemos observar mais uma vez três padrões diferentes, de acordo com a intensidade da lesão. Os camundongos infectados com as cepas H37Rv e M442 (padrão I) estão representados na **Fig. 12**. Elas apresentaram formação granulomatosa incipiente, com pequenos e médios granulomas peribronquial e perivascular, composto de macrófagos e linfócitos, sem presença aparente de bacilos, com morfologia semelhante ao controle. Em camundongos infectados com cepas do padrão II

(M467, ZT272 e ZT264), podemos observar uma patologia moderada, com pneumonia granulomatosa multifocal, com presença de poucos bacilos (**Fig. 13**).



**Figura 12 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de *Mtb* do padrão I de virulência.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol 10% tamponado e processados para a obtenção de lâminas. Estas lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina – HE (A, B e D) ou coloração de Ziehl-Neelsen - ZN (C e E) e observadas em Microscópio óptico com aumento de 100X (HE) e 200x (ZN).

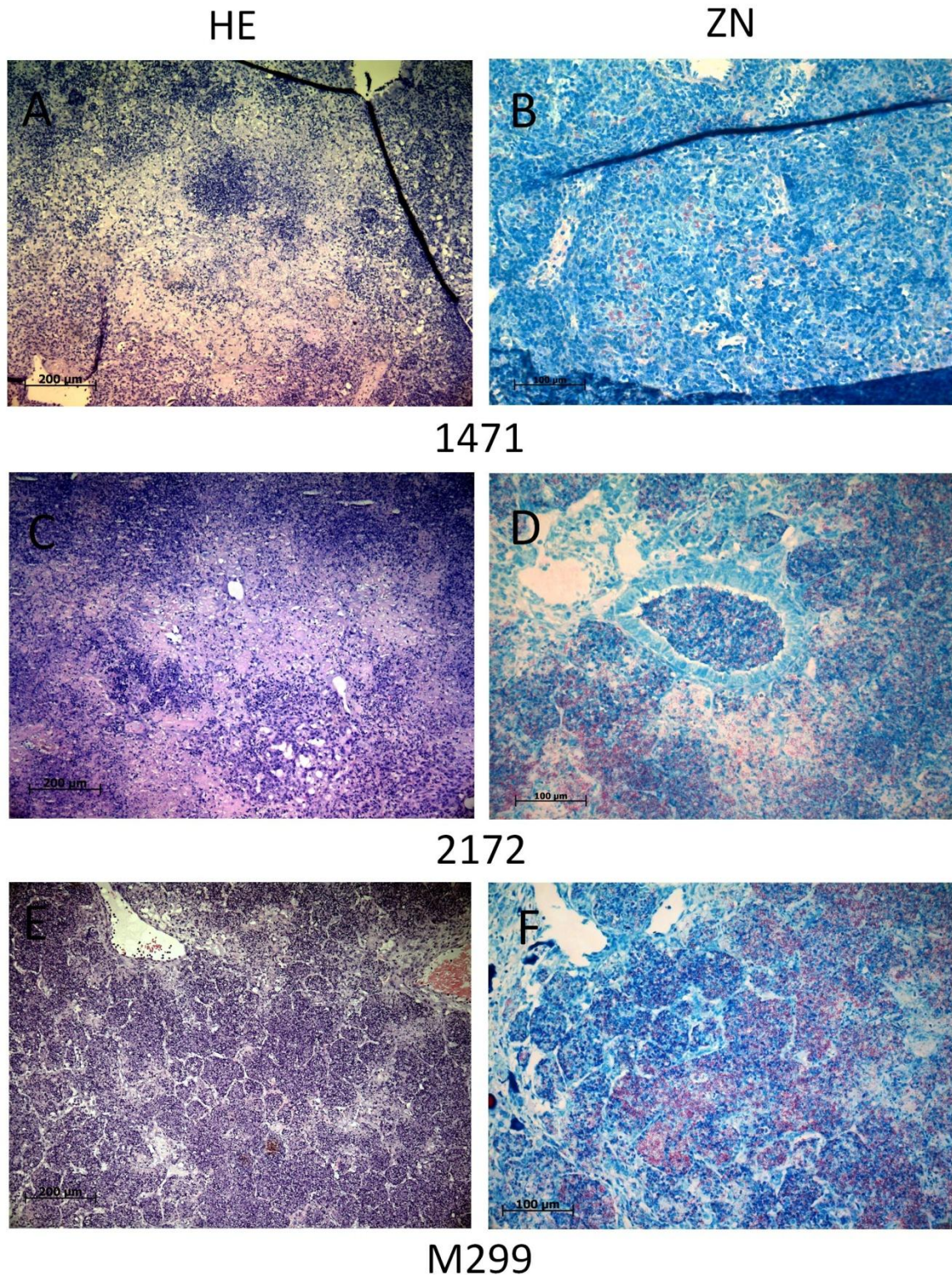




**Figura 13 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de *Mtb* do padrão II de virulência.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol 10% tamponado e processados para a obtenção de lâminas. Estas lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina – HE (A, C e E) ou coloração de Ziehl-Neelsen - ZN (B, D e F) e observadas em Microscópio óptico com aumento de 100X (HE) e 200x (ZN).



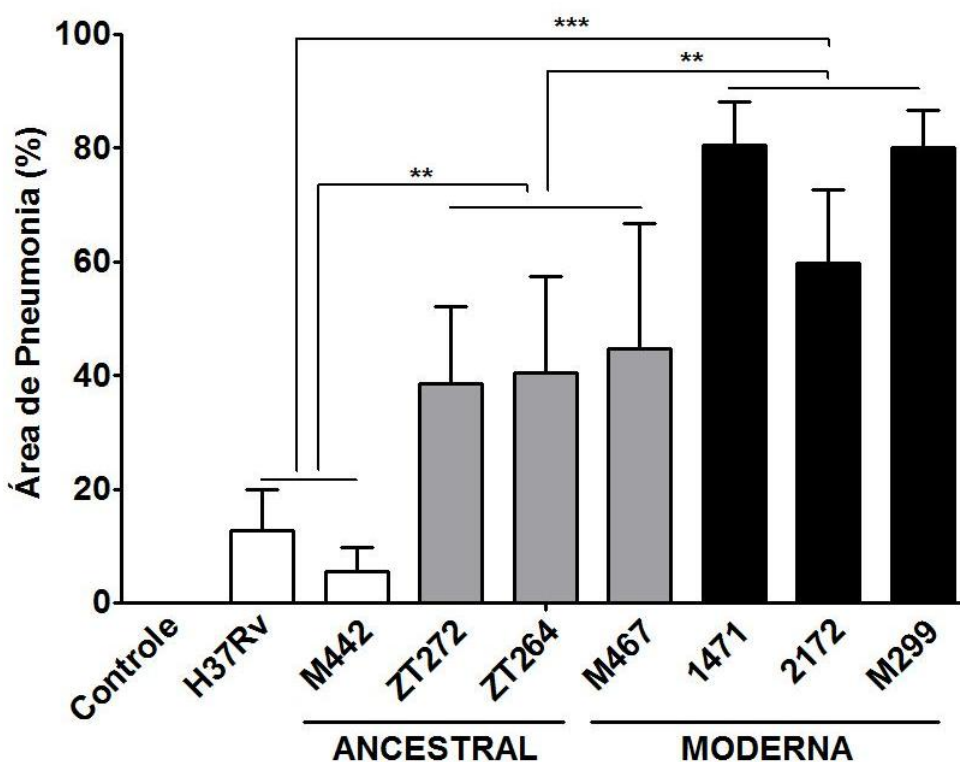
As diferenças na patologia dos animais infectados pelas cepas *Beijing* foi observada nos animais infectados com as cepas 1471, 2172 e M299 (padrão III), que apresentam uma extensa pneumonia granulomatosa, áreas de alveolite com o espessamento das paredes alveolares e alvéolos cheios de macrófagos histiocíticos, linfócitos e neutrófilos, além de múltiplos focos de necrose e com a presença de numerosos bacilos intra e extracelulares (**Fig. 14**).



PADRÃO III

**Figura 14 – Análise histopatológica dos pulmões de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas de *Mtb* do padrão III de virulência.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com ~100 bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. Os lóbulos inferior esquerdo, superior e médio direito do pulmão foram fixados em formol 10% tamponado e processados para a obtenção de lâminas. Estas lâminas foram coradas com Hematoxilina-eosina – HE (A, C e E) ou coloração de Ziehl-Neelsen - ZN (B, D e F) e observadas em Microscópio óptico com aumento de 100X (HE) e 200x (ZN).

Outro dado importante é a quantificação da área de pneumonia desenvolvida por cada cepa *Beijing* (Fig. 15). Podemos observar que cepas do padrão I apresentaram uma área de apenas 10 a 15% de infiltrado, enquanto que cepas do padrão II apresentaram, em média, 40% de infiltrado celular no pulmão. Já as cepas do padrão III, que apresentaram grandes áreas de infiltrado celular, com cerca de 70-80% de área pulmonar com infiltrado inflamatório. Essa diferença entre os padrões foi estatisticamente significativa.



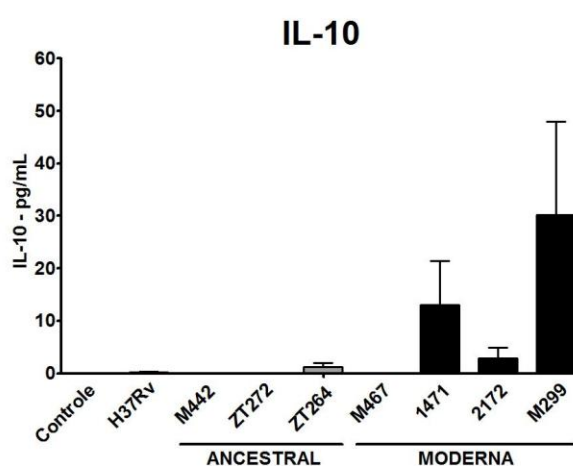
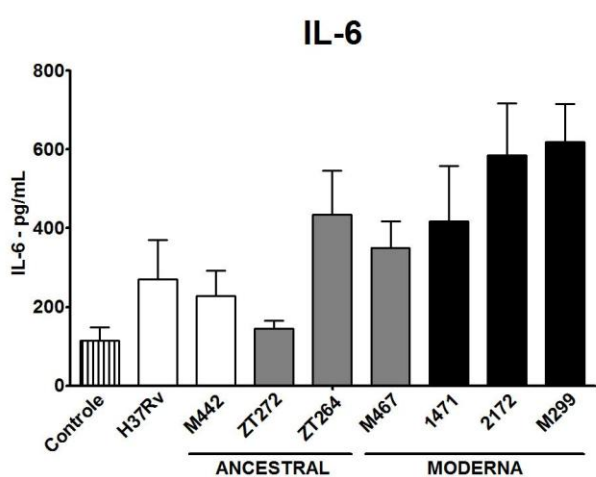
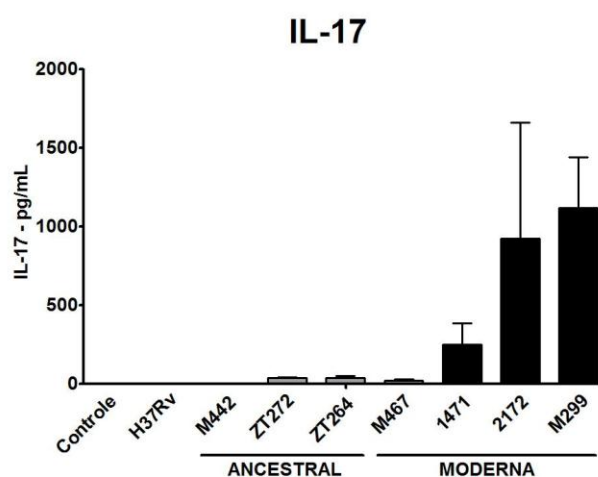
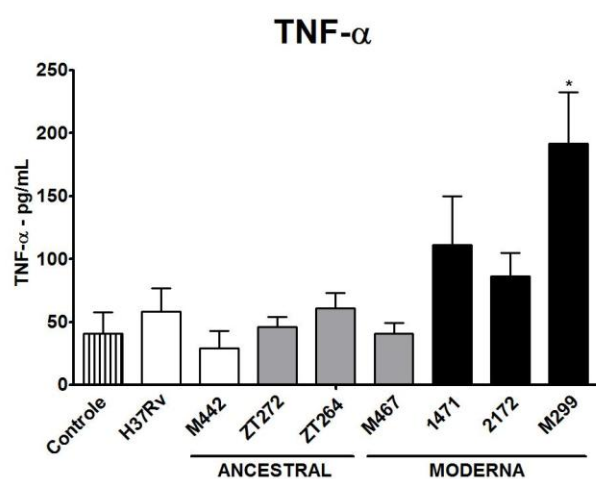
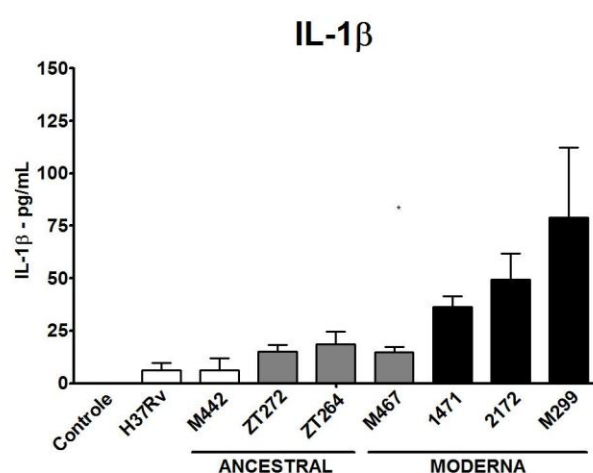
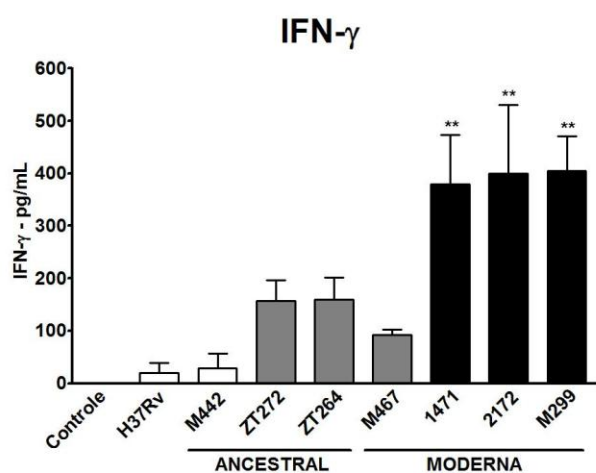
**Figura 15 – Análise morfométrica da área inflamatória no pulmão de camundongos C57BL/6 aos 28 dias de infecção com cepas *Mtb* Beijing.** Imagens das seções dos pulmões foram capturadas pela câmera Coolpix P995, no aumento de 100X e foram analisadas com o uso do programa Image J para a determinação morfométrica da área de inflamação no pulmão (área de pneumonia). Os resultados representam a média de dois experimentos independentes (três camundongos para cada experimento). Diferenças estatísticas significativas foram determinadas entre os grupos do padrão III (colunas pretas), padrão II (colunas cinzas) e padrão I (colunas brancas). \*\* $p < 0.01$ ; and \*\*\* $p < 0.001$ .



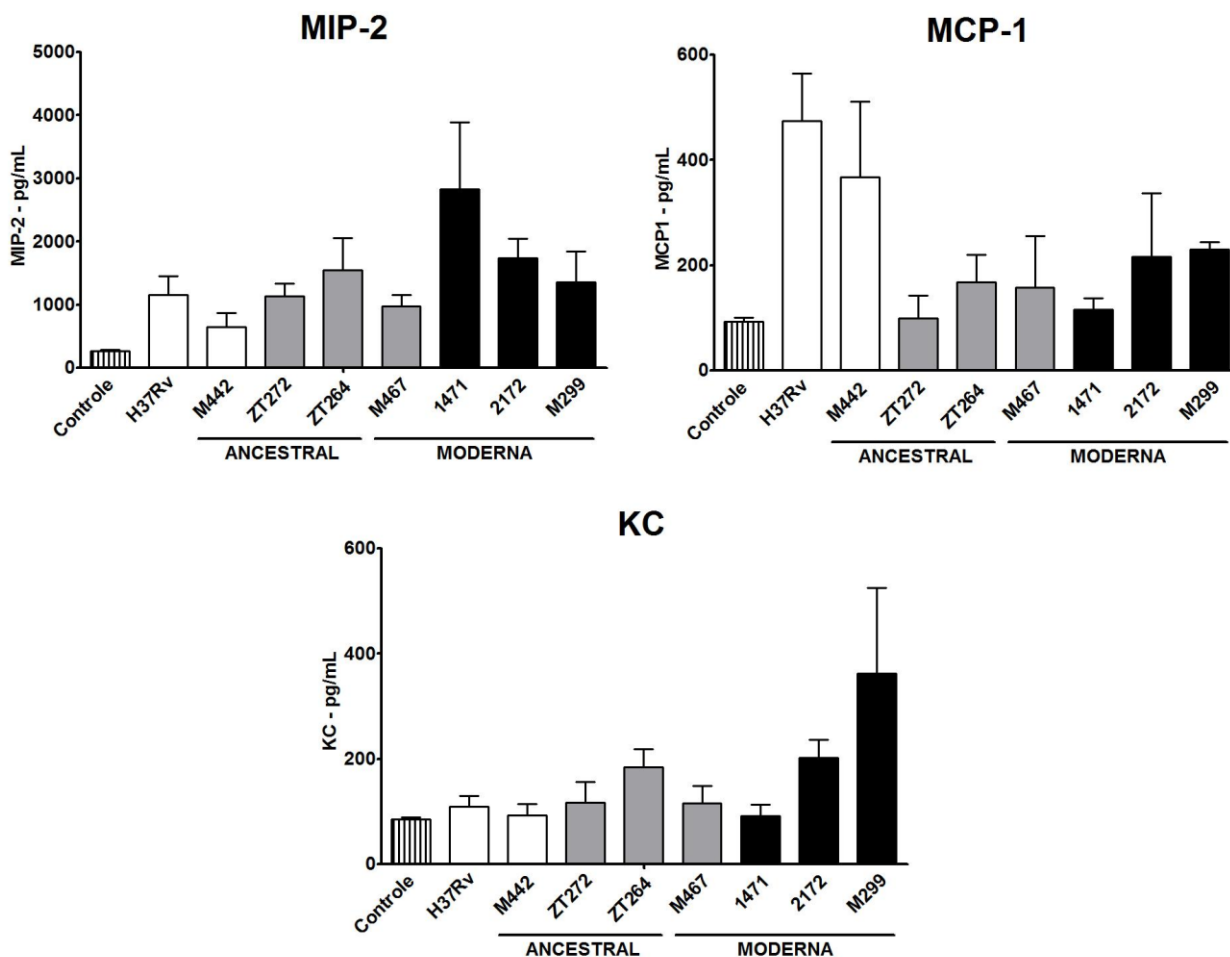
#### **4.5 Avaliação da indução de resposta imune pelas cepas Beijing através da quantificação das citocinas produzidas pelas células do pulmão ex vivo**

Para avaliar a resposta imune induzida pelas cepas em estudo, caracterizamos o perfil de citocinas produzidas *ex vivo*, pelas células do pulmão de camundongos infectados. As células obtidas a partir do pulmão dos animais infectados foi plaqueado e o sobrenadante da cultura foi coletado após 48 h de incubação. Foram quantificados os mediadores inflamatórios produzidos principalmente pelos macrófagos (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MIP-2, MCP-1) e linfócitos (IFN- $\gamma$ , IL-17), e também da quimiocina KC, e os resultados obtidos estão apresentados na **Fig. 16**.

Podemos observar que as cepas 1471, 2171 e M299 (padrão III) induziram uma alta produção de IFN- $\gamma$ , sendo estatisticamente significativa em relação à cepa H37Rv, assim como, também induziram uma produção relativamente maior das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-17 e da quimiocina MIP-2, citocinas e quimiocina pró-inflamatória. Também podemos observar que houve uma produção da citocina anti-inflamatória IL-10 pelas cepas do padrão III, sendo sua produção induzida em maior quantidade pelas cepas 1471 e M299, o que não aconteceu com cepas dos padrões I e II. Não observamos diferenças significantes na produção da citocina IL-6 e das quimiocinas MCP-1 e KC.

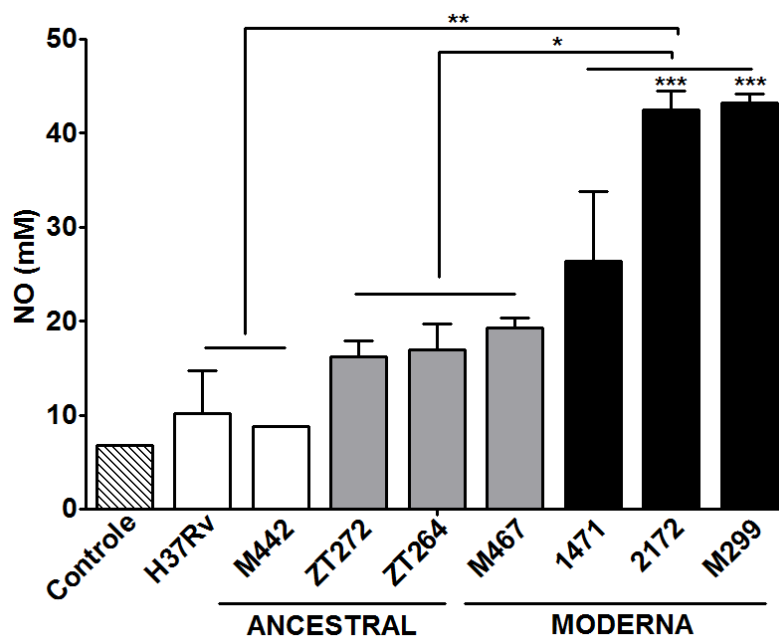






**Figura 16 – Produção de citocinas e quimiocinas pelas células do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas *Mtb Beijing*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^2$  bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. As células do pulmão foram extraídas e cultivadas *ex vivo* por 48h seguida de dosagem dos mediadores da inflamação por ensaio *Bioplex*. Os resultados representam a média de três experimentos independentes (três camundongos para cada experimento). Padrão III (colunas pretas), padrão II (colunas cinzas) e padrão I (colunas brancas). Diferenças estatísticas significantes da cepa quando comparado à cepa H37Rv (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).

Também foi avaliada a produção de óxido nítrico (NO) pelas células *ex vivo* do pulmão de animais infectados. Na **Fig. 17** podemos observar que as cepas do padrão III também induziram uma maior produção de NO, em relação ao padrão I (\*\* $p < 0.01$ ) e ao padrão II (\* $p < 0.05$ ).



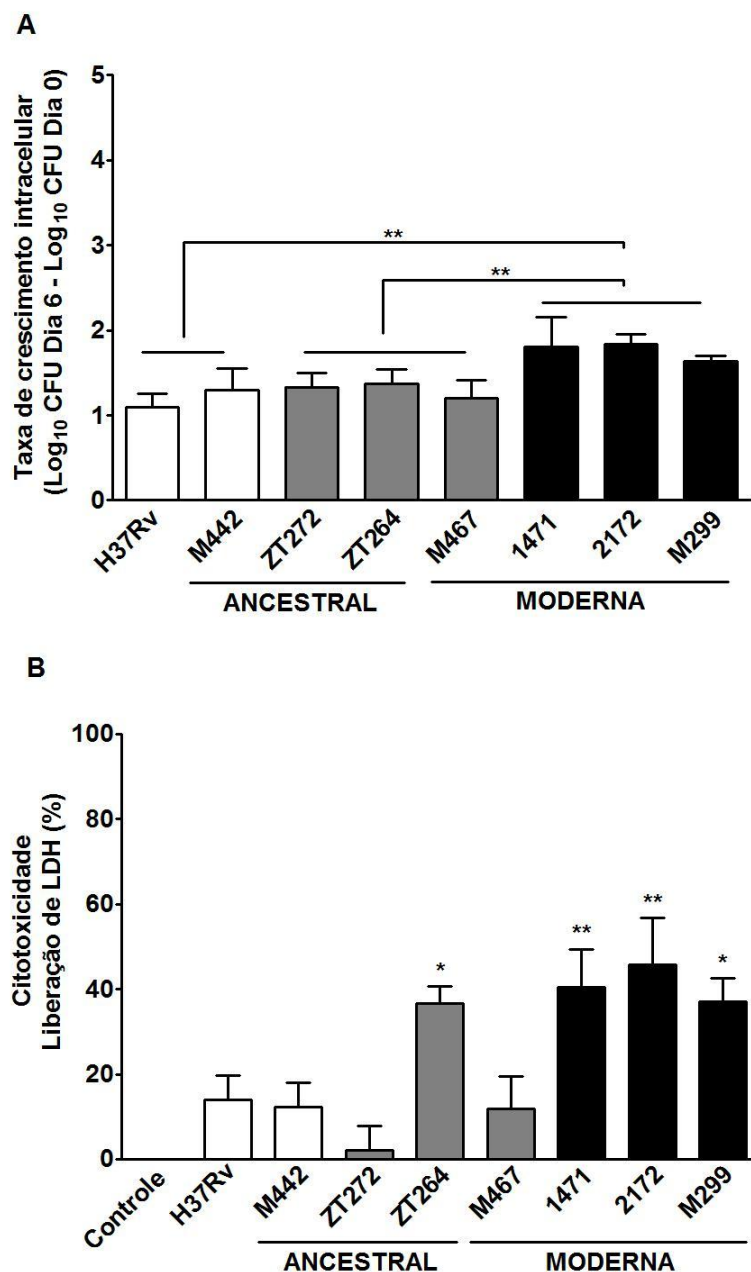
**Figura 17 – Produção de NO pelas células do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas *Mtb Beijing*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente com  $10^2$  bacilos e sacrificados após 28 dias de infecção. As células do pulmão foram extraídas e cultivadas ex vivo por 48h seguida da quantificação de óxido nítrico (NO) pela Reação de Griess. Diferenças estatísticas significantes foram determinadas em relação ao controle (\*\* $p < 0.001$ ) e entre os grupos do padrão III (colunas pretas), padrão II (colunas cinzas) e padrão I (colunas brancas) - \*  $p < 0.05$  e \*\*  $p < 0.01$ .

#### **4.6 Avaliação de virulência das cepas *Mtb Beijing* no modelo de infecção de macrófagos *in vitro***

Para estudarmos as propriedades que determinam o crescimento diferencial das cepas *Beijing* de *Mtb* nos pulmões na fase inicial da infecção, nós comparamos com a capacidade das cepas estudadas para crescer em macrófagos infectados *in vitro*, assim como a capacidade de induzir a morte necrótica nas culturas infectadas. Habilidade para se reproduzir mais rapidamente em macrófagos e induzir a morte necrótica destas células, levando a liberação da micobactéria e subsequentes ciclos de infecção de fagócitos recrutados, são importantes propriedades de micobactérias patogênicas, promovendo seu crescimento nos pulmões (SOHN et al., 2009; LASUNSKAIA et al., 2010).

O crescimento intracelular das diferentes cepas *Beijing* em macrófagos murinos derivados de medula óssea (BMDM $\Phi$ ) de camundongos C57BL/6 e a indução de morte celular necrótica nestes macrófagos infectados está mostrado na **Fig. 18**. Os resultados demonstram que as cepas *Beijing* do padrão III cresceram em macrófagos significativamente mais rápido que as cepas de outros grupos. Os níveis

de crescimento dos outros grupos foram semelhantes (**Fig.18A**). As cepas *Beijing* do padrão III também induziram altos níveis de morte necrótica nos macrófagos infectados em comparação com outras cepas, com exceção da cepa ancestral ZT264, que apresentou alta citotoxicidade (**Fig. 18B**).



**Figura 18 – Avaliação de virulência em modelo de infecção de macrófagos *in vitro* com cepas *Beijing* de *Mtb*.** Células BMDM $\Phi$  obtidas de camundongos C57BL/6 foram infectadas com as diferentes cepas *Beijing* de *Mtb* com MOI= 1:1(A) ou MOI 10:1 (B). **A.** O crescimento intracelular das micobactérias foi avaliado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 6 de infecção, e a taxa de crescimento intracelular foi determinada através da diferença das médias dos Log<sub>10</sub> de CFU obtidos no dia 6 e dia 0 ( $\log_{10}$  CFU dia 6 -  $\log_{10}$  CFU dia 0) para cada cepa *Beijing*. **B.** Indução de morte celular necrótica em macrófagos infectados com as diferentes cepas *Beijing*. A liberação de desidrogenase lática (LDH) pelas células mortas foi medida em sobrenadantes de cultura com 4 dias de infecção. Os resultados representam a média de três experimentos independentes. Padrão III (colunas pretas), padrão II (colunas cinzas) e padrão I (colunas brancas). Diferenças estatísticas significativas entre os padrões (A) e de cada cepa *Beijing* comparada à cepa H37Rv (B). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## 5. DISCUSSÃO

---

A proposta deste trabalho foi caracterizar a virulência das cepas de *Mtb* da família genética *Beijing*, das sublinhagens ancestral e moderna, a fim de compreendermos melhor o crescente aumento da disseminação e prevalência mundial de cepas *Beijing*, associada principalmente com as cepas modernas. O estudo das cepas do genótipo *Beijing* é de suma importância, devido ao seu alto potencial infeccioso, transmissibilidade, resistências a drogas e indução de doença severa (PARWATI et al, 2010; MOKROUSOV, 2013).

Primeiramente, foi realizado um *screening* com 16 cepas de *Mtb* de genótipo *Beijing* isoladas dos pacientes com TB no Moçambique e Brasil (GOMES et al., 2015) e 20 cepas isoladas na Rússia e Brasil (LASUNSKAIA et al, 2010), onde foram avaliadas algumas características fenotípicas relacionadas à virulência, como crescimento intracelular em macrófagos humanos e murinos, crescimento em meio de cultura micobacteriano (Middlebrook 7H9), citotoxicidade e produção de citocinas pelos macrófagos infectados. Todas as cepas foram caracterizadas e classificadas geneticamente. O resultado deste *screening* serviu de base para a seleção de cepas *Beijing* que apresentavam características genotípicas relacionadas à filogenia da linhagem *Beijing*.

Para avaliação de virulência foram selecionadas cepas que representam sublinhagens *Beijing* ancestral e moderna, mas com genótipos relacionados, mais próximos. As cepas selecionadas pertencem ao subgrupo filogenético RD181, que é caracterizado pela ausência do RD181, além de deleções nos RD105 e RD207, que são deleções características de todas as cepas da família *Beijing* (GAGNEUX e SMAL, 2007). Este subgrupo inclui cepas tanto de sublinhagem ancestral quanto moderna (FAKSRI et al, 2011), e de acordo com marcas genéticas, como mutações nos genes *mutT2* e *mutT4* (EBRAHIMI-RAD et al, 2003) e a inserção de *IS6110* na região do locus NTF (MOKROUSOV e tal, 2006).

No total foram estudadas seis cepas *Beijing* do subgrupo RD181, isoladas no Brasil e em Moçambique, incluindo três cepas da sublinhagem ancestral e três da sublinhagem moderna, com pequena variação nos genótipos, avaliados através de 24-MIRU-VNTRs genotipagem (em 2-3 loci). A virulência dessas cepas foi comparada com nível de virulência das cepas estudadas nos nossos trabalhos anteriores, com a cepa laboratorial H37Rv, como referência de baixa virulência, e

com a cepa *Mtb Beijing* 1471, também do subgrupo RD181, pertencente ao clone epidêmico B0/W148 de alta virulência, que foi isolada na Rússia (LASUNSKAIA et al, 2010; MOKROUSOV, 2013). Para avaliação de virulência, foi utilizado um modelo de infecção em macrófagos derivados de medula óssea, e um modelo de infecção pulmonar, via intratraqueal, em camundongos C57BL/6 já estabelecidos pelo nosso grupo (AMARAL et al, 2011).

Foram observados três padrões distintos de virulência, o primeiro de relativa baixa virulência (padrão I), o segundo de virulência intermediária (padrão II), e o terceiro definido por cepas altamente virulentas (padrão III). A alta virulência foi observada em duas das três cepas *Mtb Beijing* modernas, isoladas em Moçambique (M299) e no Brasil (2172), e o nível de virulência destas cepas foi semelhante à cepa *Mtb Beijing* moderna russa, 1471. O padrão II compreende cepas de ambas sublinhagens, cepa moderna M467 e cepas ancestrais ZT272 e ZT264, enquanto o padrão I foi representada pela cepa “mais antiga” M442 (caracterizada por possuir os alelos *mutT2* e *mutT4* do tipo selvagem) e pela cepa laboratorial H37Rv.

A diferença entre as cepas modernas altamente virulentas (padrão III) e as cepas antigas, particularmente a cepa M442, foi marcante. A sobrevivência dos camundongos infectados com as cepas *Mtb Beijing* do padrão III em alta dose de infecção foi limitado a 25-35 dias p.i., considerando que uma grande proporção de camundongos infectados com as cepas *Mtb Beijing* de virulência moderada mantiveram a viabilidade até 120 dias p.i.. Nenhuma redução de viabilidade foi observada no grupo de camundongos infectados com a cepa *Mtb Beijing* do padrão I, incluindo a cepa H37Rv. No entanto, nos nossos experimentos observamos que a cepa laboratorial H37Rv apresentou um baixo nível de virulência, quando comparada a virulência desta cepa em outros estudos usando modelos similares de infecção murina (KOZAK et al, 2011). Isso se deve à variabilidade genética desta cepa, que evoluiu diferentemente em cada laboratório, e isso está eventualmente ligado à sua variabilidade fenotípica (IOERGER et al, 2010).

O principal parâmetro de avaliação de virulência que nos permitiu chegar à conclusão sobre a alta virulência das cepas *Beijing* modernas foi a capacidade destas cepas em induzir grave patologia pulmonar, onde pudemos observar diferenças significativas, tanto em características macropatológicas, quanto na histopatologia dos pulmões infectados, uma vez que o aumento do crescimento

bacteriano nos pulmões dos camundongos infectados foi ligeiramente maior em cepas modernas do que em cepas antigas.

A histopatologia das cepas *Beijing* modernas do padrão III mostrou claramente o quanto estas cepas são hipervirulentas, onde podemos observar uma extensa área do pulmão com necrose tecidual e intenso infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear, áreas de alveolite e um grande número de bacilos em toda área do tecido pulmonar. Esse grande número de células infiltradas ocupou cerca de 70-80% da área do pulmão. Essa histopatologia, até o presente momento, só havia sido observada em estudos de avaliação de virulência utilizando modelos de infecção em *guinea pigs* (Porquinhos da Índia), que reproduz muitas características da infecção em humanos (KATO-MAEDA et al, 2012), e em modelos murinos utilizando camundongos sensíveis à *Mtb* (DRIVER et al, 2012; MARZO et al, 2014).

Os resultados de avaliação de virulência *in vitro* demonstraram uma maior capacidade das cepas caracterizadas como padrão III de induzir necrose, morte celular de macrófagos que leva à liberação de micobactérias ao meio extracelular, além de uma variedade de componentes celulares chamados sinais de “perigo”. A liberação destes componentes aumenta o recrutamento de fagócitos, incluindo neutrófilos, que promovem de um lado a eliminação das bactérias por estresse oxidativo, mas de outro lado é capaz de aumentar a patologia no local da infecção causando danos teciduais, levando a necrose do pulmão (YANG et al, 2012).

A necrose intragranulomatosa, observada nos pulmões dos camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas hiperverulentas *Beijing*, é um fenômeno que não foi descrito antes, quando as cepas *Mtb* menos virulentas, incluindo as cepas laboratoriais H37Rv ou Erdman, foram utilizadas para infecção. A ausência de necrose pulmonar neste modelo animal da TB foi considerada como um fator limitante para estudos de imunopatogenia da TB humana fortemente associada à necrose intragranulomatosa. Neste sentido, dados obtidos neste trabalho demonstram a utilidade dos camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas *Mtb* hipervirulentas como modelo para estudo da TB humana e para *screening* das novas drogas direcionadas na redução da necrose pulmonar. A redução da necrose pulmonar através de utilização das drogas anti-inflamatórias foi demonstrada recentemente como uma nova abordagem do tratamento adjuvante da tuberculose pulmonar (ORME, 2014; ZUMLA et al, 2014).

Para conhecer melhor os mecanismos que determinaram as variedades na patologia que foi induzida pelas cepas *Beijing* de diferentes grupos, nós avaliamos o perfil de resposta imune induzida nos camundongos infectados, através da quantificação de mediadores inflamatórios, citocinas e quimiocinas, importantes para o desenvolvimento da resposta imune. As cepas caracterizadas como padrão III (hipervirulentas), foram as que induziram no pulmão uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , e da quimiocina MIP-2, também acompanhado de uma maior produção de NO. Importante ressaltar, que as cepas *Beijing* hipervirulentas foram capazes de induzir uma forte resposta imune tipo Th1, associada com alta produção de IFN- $\gamma$ . Este fato demonstra que a alta virulência das cepas *Beijing* do grupo padrão III não foi associada à inibição da resposta imune protetora pela micobactéria, diferentemente ao que foi observado nos nossos experimentos anteriores com uma cepa hipervirulenta de *M. bovis* (AMARAL et al., 2014). Neste trabalho, nós demonstramos que a cepa *M. bovis* (cepa MP287/03), diferentemente da cepa *Mtb Beijing* 1471, induziu no pulmão dos camundongos uma produção de IFN- $\gamma$  muito baixa, o que correlacionou com maior número de bactérias no pulmão e com maior taxa de mortalidade destes animais. Entretanto, os camundongos infectados tanto pela cepa *M. bovis* MP287/03, quanto pela cepa *Mtb Beijing* 1471 apresentaram a histopatologia do pulmão similar (extensa pneumonia pyogranulomatosa com áreas de necrose).

Estes dados sugerem que este tipo de patologia, induzida pelas cepas hipervirulentas, é determinado por eventos ocorridos na fase de imunidade inata, antes do estabelecimento da resposta imune adquirida. Como foi demonstrado nos nossos trabalhos anteriores (LASUNSKAIA et al., 2010; ANDRADE et al., 2012; AMARAL et al., 2014), as cepas hipervirulentas (algumas cepas *Mtb Beijing* e cepa *M. bovis* MP287/03) foram capazes de crescer mais rápido em macrófagos e induzir a morte necrótica destas células, que foi acompanhada pela liberação do conteúdo intracelular, incluindo vários sinais de alerta para sistema imune, os “danger signals”, como moléculas ATP. Em trabalho de Amaral et al. (2014) foi demonstrado o papel da via mediada pelos receptores purinérgicos P2X7, capazes de ligar ATP, na promoção da morte celular e indução da inflamação exacerbada (hiperinflamação) no pulmão. Neste trabalho, nós demonstramos que a hiperinflamação induzida pelas bactérias hipervirulentas está associada a níveis mais altos das citocinas e

quimiocinas pró-inflamatórias (IL-17, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, MIP-2, MCP-1, KC-1) produzidas pelas células do pulmão.

As quimiocinas MIP-2, KC-1 e a citocina IL-17, que apresentaram altos níveis no nosso estudo, são fatores que aceleram o recrutamento dos neutrófilos ao pulmão (SADIK et al, 2011). Estes fatores contribuem também para a ativação dos neutrófilos e a liberação de ampla variedade de produtos bactericidas e citotóxicos, como radicais livres de oxigênio, enzimas proteolíticas, mieloperoxidase, defensinas, etc. Produção não-controlada ou liberação massiva destes produtos como resultado da morte necrótica dos neutrófilos durante tuberculose foi demonstrada como um dos importantes fatores de lesão pulmonar que contribui para a necrose tecidual (YANG et al, 2012).

A principal limitação deste estudo, assim como de outros estudos que comparam diferentes grupos filogenéticos de cepas de *Mtb* em modelos de infecção animal é o pequeno número de cepas que pode ser avaliado em cada delineamento experimental (AGUILAR et al, 2010; KATO-MAEDA et al, 2012). A avaliação de cepas em modelo animal demanda tempo e um número muito grande de animais é usado no estudo, limitando o número de cepas. Através da combinação de dados publicados na literatura de estudos de avaliação de virulência de diferentes cepas *Beijing*, diferenciados em sublinhagem ancestral e moderna, podemos comparar um maior número de cepas.

Em estudos anteriores, cepas avaliados como sendo de alta virulência, como por exemplo cepas HN878, W10, 210 e SA161 (MANCA et al, 2001; ORDWAY et al, 2007; PALANISAMY et al, 2008; JEON et al, 2008), foram identificadas como sendo da sublinhagem *Beijing* moderna, enquanto que as cepas menos virulentas, tais como as cepas NHN5 e N4 (MANCA et al, 2001; JEON et al, 2008), pertenciam a sublinhagem ancestral. Deve-se notar que a maioria das cepas modernas destes estudos era de ambientes onde causaram um grande número de casos de TB em indivíduos imunocompetentes, demonstrando sua alta transmissibilidade, enquanto que as cepas ancestrais foram isoladas a partir de casos únicos ou de pacientes imunocomprometidos. Os dados apresentados neste presente estudo mostram que cepas *Beijing* esporádicas da sublinhagem moderna, isoladas de regiões de baixa prevalência de cepas *Beijing*, mas não cepas ancestrais, podem exibir elevados níveis de virulência comparável com as cepas epidêmicas de regiões emergentes.



Estes dados, no entanto, não exclui a possibilidade de algumas cepas *Beijing* da sublinhagem ancestral terem uma alta virulência.

Um estudo anterior (KATO-MAEDA et al, 2012) em São Francisco, CA, demonstrou que algumas cepas *Beijing* ancestrais (subgrupo RD207) exibiram níveis de virulência semelhantes ou até mesmo superiores aos de cepas *Beijing* moderna dessa região e foram mais transmissíveis (KATO-MAEDA et al, 2010). Por outro lado, no Japão, uma região onde a TB é endêmica e causada por cepas *Beijing* ancestrais, apresenta casos recentemente transmitidos de TB mais frequentemente causado por cepas *Beijing* modernas, e os isolados da sublinhagem ancestral estão associados com casos de reativação da TB em pacientes idosos, sem transmissão em curso (IWAMOTO et al, 2009). Todos estes dados em conjunto demonstram que cepas *Beijing* da sublinhagem moderna são mais propensas a apresentar alta virulência do que cepas *Beijing* da sublinhagem ancestral. Apesar de que cepas de ambas sublinhagens podem apresentar fenótipos altamente virulentos, a proporção de cepas circulantes com maior virulência é maior no subgrupo *Beijing* moderna, sugerindo uma maior propensão destas cepas em atingir uma virulência mais pronunciada.

As razões para a maior virulência e competitividade das cepas *Beijing* da sublinhagem moderna não estão ainda totalmente determinadas, mas o sequenciamento do genoma de cepas *Beijing* pertencentes a diferentes subgrupos, definidos pela presença de deleções RD, demonstrou que estas cepas também exibem diferentes mutações em genes associados a virulência (KATO-MAEDA et al, 2012). Alguns desses SNPs são partilhados pelo ancestral comum mais recente e todos os seus descendentes, ao passo que outros podem ser detectados apenas nas cepas descendentes. Mutações específicas nos genes *mutT* são típicos para descendentes *Beijing* modernas e em contrapartida falta em cepas ancestrais (EBRAHIMI-RAD et al, 2003). Como consequência destas mutações, a fraqueza resultante nas funções de *DNArepair* nas cepas *Beijing* modernas poderia promover a aquisição de mutações e aumentar a adaptabilidade destas cepas a hospedeiros imunocompetentes. Além disso, a acelerada taxa de mutação geral e o *link* para a adaptabilidade bacteriana levam a um aumento muito maior na aquisição de mutantes MDR e XDR, e isso foi demonstrado em cepas da linhagem *East Asian/Beijing*, em comparação com cepas da linhagem *Euro-American* (FORD et al, 2013) ou da linhagem *East African-Indian* (DE STEENWINKEL, et al, 2012), mas

existem opiniões contrárias a este respeito (MOKROUSOV, 2014). Isto poderia favorecer a seleção de mutantes associados à virulência, particularmente nos doentes tratados com drogas anti-TB. Mutantes MDR altamente virulentos, expressando mutações compensatórias de adequação bacteriana e capazes de aumentar sua multiplicação em organismos hospedeiros tratados, podem ser selecionados, sob estas condições, a uma taxa maior do que mutantes de baixa virulência. Estudos em Singapura (SUN et al, 2007) e na Rússia (CASALI et al, 2014) demonstraram a alta frequência de isolados MDR e altas taxas de transmissão de TB droga-resistente entre cepas de genótipo *Beijing* do que em cepas não *Beijing*, sugerindo um aumento na virulência de cepas *Beijing* MDR circulantes nestas regiões.

Em conclusão, cepas *Beijing* modernas, altamente virulentas, foram selecionadas em países caracterizados por baixa prevalência da linhagem de *Mtb East Asian/Beijing* na estrutura local de cepas de *Mtb* (Brasil e Moçambique). Os dados obtidos em modelos animais de infecção favorecem a prova de que linhagens *Beijing* modernas, epidêmicas, bem como esporádicas, são mais propensas a exibir fenótipos relacionados com o aumento de virulência, do que linhagens ancestrais. Estes dados dão uma nova visão sobre o recente sucesso desta competitiva família de cepas, que parece contribuir para a recidiva da TB, em particular da TB multirresistente, em algumas partes do mundo, e demonstrar a importância do monitoramento contínuo das populações de cepas *Beijing* em diferentes regiões geográficas.

## 6. CONCLUSÕES

---

1. As cepas de *Mtb* do genótipo *Beijing* avaliadas neste trabalho apresentaram três padrões distintos de virulência: alta, intermediária e relativamente baixa;
2. Duas de três cepas *Beijing* da sublinhagem moderna, isoladas no Brasil e em Moçambique, apresentaram uma alta virulência similar à cepa moderna de alta transmissibilidade isolada na Rússia (clone epidêmico B0), o que permite considerar essas cepas como hipervirulentas. Por enquanto, as cepas da sublinhagem ancestral foram menos virulentas, apresentando virulência baixa ou intermediária;
3. As cepas da sublinhagem moderna, ao contrário das cepas da sublinhagem ancestral, são predispostas para apresentar maior virulência, o que pode ser determinado pelos polimorfismos genéticos específicos para cepas modernas (ex. mutações em *mutator* genes);
4. O aumento da virulência foi associado com maior capacidade das cepas hipervirulentas em crescer rapidamente em macrófagos e induzir morte necrótica dessas células associada a liberação dos sinais de alerta do sistema imune inata, de “*dead signals*”, o que promove uma severa inflamação nos pulmões dos animais infectados;
5. As cepas *Beijing* hipervirulentas induziram nas células do pulmão um maior nível de produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, o que levou ao recrutamento rápido e reforçado dos leucócitos fagocitários, incluindo neutrófilos, que contribuem para a indução de necrose pulmonar.
6. A detecção de cepas *Beijing* altamente virulentas em países de baixa e média renda, com altas cargas de TB, como Brasil e Moçambique, pode ser considerada como emergência epidemiológica e um alerta para os programas de controle da TB. A prevalência das cepas *Beijing*, e particularmente da sublinhagem moderna, no Brasil deve ser monitorada por métodos de epidemiologia molecular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABEBE F., BJUNE G. The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium Tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette–Guérin (BCG) vaccines: is there a link? **Clinical and Experimental Immunology**, v.145, p.389–397, 2006.
- AGUILAR D., HANEKOM M., MATA D., GEY VAN PITTIUS N.C., VAN HELDEN P.D., WARREN R.M., HERNANDEZ-PANDO R.. *Mycobacterium tuberculosis* strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. **Tuberculosis** (Edinb), v.90, p.319-325, 2010.
- AMARAL E.P., KIPNIS T.L., DE CARVALHO E.C.Q., DA SILVA W.D., LEÃO S.C., LASUNSKAIA E.B.. Difference in Virulence of *Mycobacterium avium* Isolates Sharing Indistinguishable DNA Fingerprint Determined in Murine Model of Lung Infection. **PLoS ONE**, v.6(6), e21673 (doi:10.1371/journal.pone.0021673), 2011.
- AMARAL E. P., RIBEIRO S. C. M., LANES V. R., ALMEIDA F. M., DE ANDRADE M. R. M., BOMFIM C. C. B., SALLES E. M., BORTOLUCI K. R., SILVA R. C., HIRATA M. H., ALVAREZ J. M., LASUNSKAIA E. B., D'IMPÉRIO-LIMA M. R.. Pulmonary Infection with Hypervirulent *Mycobacteria* Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. **PLoS Pathogens**, v.10(7), e1004188. doi:10.1371/journal.ppat.1004188, 2014.
- ANDRADE M. R. M, AMARAL E. P., RIBEIRO S. C. M., ALMEIDA F. M., PERES T. V., LANES V. R., D'IMPÉRIO-LIMA M. R., LASUNSKAIA E. B.. Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. **BMC Microbiology**, v.12:166, 2012.
- ASTARIE-DEQUEKER C., J. NIGOU, C. PASSEMAR, C. GUILHOT. The role of mycobacterial lipids in host pathogenesis. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 7, n. 1 (DOI: 10.1016/j.ddmec.2010.09.003), 2010.

- BAKER L., BROWN T., MAIDEN M. C., DROBNIIEWSKI F.. Silent nucleotide polymorphisms and a phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerg Infect Dis.**, v.10(9), p.1568-77, 2004.
- BARCZAK A. K., DOMENECH P., BOSHOF H. I., REED M. B., MANCA C., KAPLAN G., BARRY C. E.. In vivo phenotypic dominance in mouse mixed infections with *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J. Infect. Dis.**, v.192, p.600–606, 2005.
- BEGGS, M.L., EISENACH, K.D., AND CAVE, M.D.. Mapping of IS6110 insertion sites in two epidemic strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Clin. Microbiol.** V.38, p.2923-2928, 2000.
- BIFANI, P. J., B. MATHEMA , N. E. KUREPINA, AND B. N. KREISWIRTH. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. **Trends Microbiol.** V.10, p.45-52, 2002.
- BOEHME C.C., NABETA P., HILLEMANN D., NICOL M.P., SHENAI S., KRAPP F., ALLEN J., 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. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1005–1015, 2010.
- BOLETIM ELETRÔNICO EPIDEMIOLÓGICO. **Tuberculose: alinhada com o social, afinada com a tecnologia**. Secretaria de Vigilância em Saúde, v.44, nº 2, 2013.
- CASALI N., NIKOLAYEVSKYY V., BALABANOVA Y., HARRIS S.R., IGNATYEVA O., KONTSEVAYA I., CORANDER J., BRYANT J., PARKHILL J., NEJENTSEV S., HORSTMANN R.D., BROWN T., DROBNIIEWSKI F.. Evolution and transmission of drug-resistant tuberculosis in a Russian population. **Nat. Genet.**, v.46, p.279–286, 2014.

- CHEN Y.Y., CHANG J.R., HUANG W.F., HSU S.C., KUO S.C., SUN J.R., DOU H.Y.. The pattern of cytokine production in vitro induced by ancient and modern Beijing *Mycobacterium tuberculosis* strains. *PLoS One*, v.9(4) (doi: 10.1371/journal.pone.0094296), 2014.
- DE STEENWINKEL J.E., TEN KATE M.T., DE KNEGT G.J., KREMER K., AARNOUTSE R.E., BOEREE M.J., VERBRUGH H.A., VAN SOOLINGEN D., BAKKER-WOUDENBERG I.A.. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and association with MDR TB. **Emerg. Infect. Dis.** 18:660–663, 2012.
- DRIVER E.R., RYAN G.J., HOFF D.R., IRWIN S.M., BASARABA R.J., KRAMNIK I., LENAERTS A.J.. Evaluation of a mouse model of necrotic granuloma formation using C3HeB/FeJ mice for testing of drugs against *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v.56(6), p.3181-3195, 2012.
- EBRAHIMI-RAD M., BIFANI P., MARTIN C., KREMER K., SAMPER S., RAUZIER J., KREISWIRTH B., BLAZQUEZ J., JOUAN M., VAN SOOLINGEN D., GICQUEL B.. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. **Emerg. Infect. Dis.**, v.9, p.838–845, 2003.
- EHLERS S., SCHAIBLE U.E. The granuloma in tuberculosis: dynamics of a host–pathogen collusion. **Frontiers in Immunology**, v.3, article 411, doi: 10.3389/fimmu.2012.00411, 2013
- ERNST J.D. The immunological life cycle of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v.12, p.581, 2012.
- FAKSRI K., DROBNIEWSKI F., NIKOLAYEVSKYY V., BROWN T., PRAMMANANAN T., PALITTAPONGARNPIM P., PRAYOONWIWAT N., CHAIPRASERT A.. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family based on IS6110, SNP, LSP and VNTR profiles from Thailand. **Infection, Genetics and Evolution**, v.11 p.1142–1149, 2011.

- FLYNN J.L., CHAN J., LIN P.L.. Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis. **Mucosal Immunology**, v. 4, n.3, p.271-278, 2011.
- FORD C.B., SHAH R.R., MAEDA M.K., GAGNEUX S., MURRAY M.B., COHEN T., JOHNSTON J.C., GARDY J., LIPSITCH M., FORTUNE S.M.. *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. **Nat. Genet.**, v.45, p.784–790, 2013.
- FORRELLAD M.A., KLEPP L.I., GIOFFRÉ A., SABIO Y GARCÍA J., MORBIDONI H.R., SANTANGELO M. DE LA P., CATALDI A. A., BIGI F. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, v.4, n.1, p.1–64, 2013.
- GAGNEUX, S., K. DERIEMER, T. VAN, M. KATO-MAEDA, B.C. JONG, S. NARAYANAN, M. NICOL, S. NIEMANN, K. KREMER, M. C. GUTIERREZ, M. HILTY, P. C. HOPEWELL, AND P. M. SMALL. Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.103, p.2869–2873, 2006.
- GAGNEUX, S., AND SMAL P.M.. Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. **Lancet Infect. Dis.**, v.7, p.328–337, 2007.
- GLYNN J.R., WHITELEY J., BIFANI P.J., KREMER K., VAN SOOLINGEN D.. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. **Emerg Infect Dis.**, v.8(8), p.843-849, 2002.
- GOMES L.L.. Caracterização genética e fenotípica de *Mycobacterium tuberculosis* do tipo Beijing. Dissertação (Mestrado profissionalizante em Ciências – Microbiologia) – Rio de Janeiro, RJ – **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, UFRJ – 2011.
- GOMES L. L., VASCONCELLOS S. E. G., GOMES H. M., ELIAS A., ROCHA A., RIBEIRO S. C. M., PANUNTO A., FERRAZOLI L., TELLES M.A., IVENS DE ARAUJO M .E., KRITSKI A. L., MOKROUSOV I., MANICHEVA O. A.,

- LASUNSKAIA E. AND SUFFYS P. N.. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, artigo *in press*, publicado online em 24 de fevereiro de 2015. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.025.
- GORI A., BANDERA A., MARCHETTI G., ESPOSTI A. D., CATOZZI L, NARDI G.P., GAZZOLA L., FERRARIO G., VAN EMBDEN J.D., VAN SOOLINGEN D., MORONI M., FRANZETTI F.. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. **Emerg Infect Dis**, v.11(8), p.1242-1248, 2005.
- GUIRADO E., SCHLESINGER L. S.. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* granuloma – the critical battlefield in host immunity and disease. **Frontiers in Immunology**, v.4, Article 98 (doi: 10.3389/fimmu.2013.00098), 2013.
- GROENEN P.M.A., BUNSCHOTEN A.E., VANSOOLINGEN D., VAN EMBDEN J.D.A.. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Mol Microbiol**, v.10(5), p.1057-1065, 1993
- HANEKOM M., GEY VAN PITTIUS N.C., MCEVOY, VICTOR T.C., VAN HELDEN P.D., WARREN R.M.. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: A template for success. **Tuberculosis**, v.91, n.6 , p.510-523, 2011.
- HERNÁNDEZ-PANDO R., MARQUINA-CASTILLO B., BARRIOS-PAYÁN J., MATA-ESPINOSA D.. Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol.*, v.12, n.4, p. 725-731, 2012.
- HIRSH A.E., TSOLAKI A.G., DERIEMER K., FELDMAN M.W., SMALL P.M.. Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101(14), p.4871-4876, 2004.



IWAMOTO T., FUJIYAMA R., YOSHIDA S., WADA T., SHIRAI C., KAWAKAMI Y.. Population structure dynamics of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains during past decades in Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v.47, p.3340–3343, 2009.

IOERGER T.R., FENG Y., GANESULA K., CHEN X., DOBOS K.M., FORTUNE S., JACOBS W.R., JR, MIZRAHI V., PARISH T., RUBIN E., SASSETTI C., SACCHETTINI J.C.. Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. **J. Bacteriol.**, v.192, p.3645–3653, 2010.

JAGIELSKI T., VAN INGEN J., RASTOGI N., DZIADEK J., MAZUR P. K., BIELECKI J.. Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium tuberculosis* and Other *Mycobacteria*. **BioMed Research International**, Article ID 645802 (doi.org/10.1155/2014/645802), 2014.

JEON B.Y., DERRICK S.C., LIM J., KOLIBAB K., DHEENADHAYALAN V., YANG A.L., KREISWIRTH B., MORRIS S.L.. *Mycobacterium bovis* BCG immunization induces protective immunity against nine different *Mycobacterium tuberculosis* strains in mice. **Infect. Immun.**, v.76, p.5173–5180, 2008.

JORDAO L. E VIEIRA O.V. Tuberculosis: New Aspects of an Old Disease. **International Journal of Cell Biology**, doi: 10.1155/2011/403623, 2011.

KATO-MAEDA M., KIM E.Y., FLORES L., JARLSBERG L.G., OSMOND D., HOPEWELL P.C.. Differences among sublineages of the East-Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* in genotypic clustering. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v.14, p.538–544, 2010.

KATO-MAEDA M., SHANLEY C.A., ACKART D., JARLSBERG L.G., SHANG S., OBREGON-HENAO A., HARTON M., BASARABA R.J., HENAO-TAMAYO M., BARROZO J.C., ROSE J., KAWAMURA L.M., COSCOLLA M., FOFANOV V.Y., KOSHINSKY H., GAGNEUX S., HOPEWELL P.C., ORDWAY D.J., ORME I.M.. Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in

pathogenicity in the guinea pig. *Clin Vaccine Immunol.*, v.19(8), p.1227-1237, 2012.

KLEINNIJENHUIS J., OOSTING M., JOOSTEN L.A.B., NETEA M.G., VAN CREVEL R. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, doi: 10.1155/2011/405310, 2011.

KOZAK R.A., ALEXANDER D.C., LIAO R., SHERMAN D.R., BEHR M.A.. Region of difference 2 contributes to virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect. Immun.**, v.79, p.59–66, 2011.

LASUNSKAIA E., RIBEIRO S.C.M., MANICHEVA O., GOMES L.L., SUFFYS P.N., MOKROUSOV I., FERRAZOLI L., ANDRADE M.R.M., KRITSKI A., OTTEN T., KIPNIS T.L., DA SILVA W.D., VISHNEVSKY B., OLIVEIRA M.M., GOMES H.M., BAPTISTA I.F., NARVSKAYA O. Emerging multi drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia Express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 467-475, 2010.

LAZZARINI L. C. O.; HUARD R. C.; BOECHANEIO L. T.; GOMES H. M.; OELEMANN M. C.; KUREPINA N.; SHASHKINA E.; MELL F. C. Q.; GIBSON A. L.; VIRGINIO M. J.; MARSICO A. G.; W. BUTLER R.; KREISWIRTH B. N.; SUFFYS P. N.; e SILVA J. R. L.; HO J. L. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage that is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.12, p.3891-3902, 2007.

LI Q.; WHALEN C. C.; ALBERT J. M.; LARKIN R.; ZUKOWSKI L.; CAVE M. D.; SILVER R. F. Differences in Rate and Variability of Intracellular Growth of a Panel of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates within a Human Monocyte Model. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.6489–6493, 2002.

LÓPEZ B.; AGUILAR D.; OROZCO H.; BURGER M.; ESPITIA C.; RITACCO V.; BARRERA L.; KREMER K.; HERNANDEZ-PANDO R.; HUYGEN K.; VAN SOOLINGEN D. A marked difference in pathogenesis and immune response

- induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**, v.133, p.30–37, 2003.
- LOWE D. M., REDFORD P. S., WILKINSON R. J., O'GARRA A., MARTINEAU A. R.. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? **Trends in Immunology**, v. 33, n.1 p.14-25, 2012.
- MANCA C.; TSENOVA L.; BARRY C.E. 3<sup>rd</sup>; BERGTOLD A.; FREEMAN S.; HASLETT P. A.; MUSSER J. M.; FREEDMAN V. H.; KAPLAN G. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. **The Journal of Immunology**, v.162, n.11, p.6740-6746, 1999.
- MANCA C., TSENOVA L., BERGTOLD A., FREEMAN S., TOVEY M., MUSSER J.M., BARRY C.E., III, FREEDMAN V.H., KAPLAN G.. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.98, p.5752–5757, 2001.
- MARZO E., VILAPLANA C., TAPIA G., DIAZ J., GARCIA V., CARDONA P.J.. Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb.)*, v.94(1), p.55-64, 2014.
- MEENA L.S., RAJNI. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **FEBS Journal**, v. 277, p.2416–2427, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias – Guia de bolso**. Brasília, DF, 8<sup>a</sup>ed., 2010.
- MOKROUSOV I. Genetic geography of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype: a multifacet mirror of human history? **Infect Genet Evol**, v.8, p.777-785, 2008.

MOKROUSOV I.. Insights into the origin, emergence, and current spread of a successful Russian clone of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.*, v.26(2), p.342-360, 2013.

MOKROUSOV I.. Widely-used laboratory and clinical *Mycobacterium tuberculosis* strains: to what extent they are representative of their phylogenetic lineages? **Tuberculosis (Edinb.)**, v. 94, p.355–356, 2014.

MOKROUSOV I., NARVSKAYA O., OTTEN T., VYAZOVAYA A., LIMESCHENKO E., STEKLOVA L. VYSHNEVSKIY B.. Phylogenetic reconstruction within *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype in northwestern Russia. **Res. Microbiol.**, v.153, p.629-637, 2002

MOKROUSOV I.; JIAO W. W.; VALCHEVA V.; VYAZOVAYA A.; OTTEN T.; LY H. M.; LAN N. N.; LIMESCHENKO E.; MARKOVA N.; VYSHNEVSKIY B.; SHEN A. D.; NARVSKAYA O. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2851-2856, 2006.

MONTAÑÉSA C.M., GICQUEL B. New tuberculosis vaccines. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.29 (supl.1), p. 57-62, 2011;

NEYROLLES O., GUILHOT C. Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. **Tuberculosis**, v.91, p.187-195, 2011.

NUNES-ALVES C., BOOTY M.G., CARPENTER S.M., JAYARAMAN P., ROTHCHILD A.C., BEHAR S.M.. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews Microbiology*, v.12, p.289-299, 2014.

O'GARRA A., REDFORD P.S., MCNAB F.W., BLOOM C.I., WILKINSON R.J., BERRY M.P.R. The Immune Response in Tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.**, v.31, p.475–527, 2013.

- ORDWAY D., HENAO-TAMAYO M., HARTON M., PALANISAMY G., TROUDT J., SHANLEY C., BASARABA R.J., ORME I.M.. The hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878 induces a potent TH1 response followed by rapid down-regulation. **J. Immunol.**, v.179, p.522–531, 2007.
- ORME I.M.. A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, v.94(1), p.8-14, 2014.
- OTTENHOFF T.H.M., The knowns and unknowns of the immunopathogenesis of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.16, n.11, p.1424–1432, 2012.
- PALANISAMY G.S., SMITH E.E., SHANLEY C.A., ORDWAY D.J., ORME I.M., BASARABA R.J.. Disseminated disease severity as a measure of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig model. **Tuberculosis (Edinb)**, v.88, p.295–306, 2008.
- PARWATI I., VAN CREVEL R., VAN SOOLINGEN D. Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. **Lancet Infect Dis**, v.10, p.103–111, 2010.
- PLIKAYTIS, J.L. MARDEN, J.T. CRAWFORD, C.L. WOODLEY, W.R. BUTLER, T.M. SHINNICK. Multiplex PCR assay specific for the multidrug-resistant strain W of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.32, p.1542–1546, 1994.
- RAD M.E., GIQUEL E.I.D., EBRAHIMI-RAD M., BIFANI P., MARTIN C., KREMER K., SAMPER S., RAUZIER J., KREISWIRTH B., BLAZQUEZ J., JOUAN M., VAN SOOLINGEN D., GICQUEL B. Mutations in putative mutator genes of *Mycobacterium tuberculosis* strains of the W-Beijing family. **Emerg Infect Dis.**, v.9, p.838-45, 2003.
- RAGHAVAN S., MANZANILLO P., CHAN K., DOVEY C., COX J. S.. Secreted transcription factor controls *Mycobacterium tuberculosis* virulence. **Nature**, v.454(7205), p.717–721, 2008

- RIENDEAU C.J.; KORNFIELD H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. **Infection and Immunity**, v.71, n.1, p.254-259, 2003.
- RINDI L., LARI N., CUCCU B., GARZELLI C.. Evolutionary pathway of the Beijing lineage of *Mycobacterium tuberculosis* based on genomic deletions and mutT genes polymorphisms. **Infect Genet Evol.**, v., n.1, p.48-53, 2009.
- SADIK C. D., KIM N. D., LUSTER A. D.. Neutrophils cascading their way to Inflammation. *Trends in Immunology*, v.32, n.10, p.452-460, 2011
- SAIGA H., SHIMADA Y., TAKEDA K.. Innate Immune Effectors in Mycobacterial Infection. **Clinical and Developmental Immunology**, artigo ID 347594, (doi:10.1155/2011/347594), 2011.
- SENARATNE R.H., SIDDEERS B., SEQUEIRA P., SAUNDERS G., DUNPHY K., MARJANOVIC O., READER J.R., LIMA P., CHAN S., KENDALL S., MCFADDEN J., RILEY L.W.. *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in *mce3* and *mce4* operons are attenuated in mice. **J. Med. Microbiol.**, v.57 p.164–170, 2008.
- SILVER R. F.; LI Q.; ELLNER J. J. Expression of Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within Human Monocytes: Virulence Correlates with Intracellular Growth and Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha but Not with Evasion of Lymphocyte-Dependent Monocyte Effector Functions. *Infection and Immunity*, v.66, n.3, p. 1190–1199, 1998.
- SIMEONE R., BOTTAI D., BROSCH R.. ESX/type VII secretion systems and their role in host–pathogen interaction. **Current Opinion in Microbiology**, v.12, p.4–10, 2009.
- SOHN H., LEE K. S., KIM S. Y., SHIN D. M., SHIN S. J., JO E. K., PARK J. K., KIM H. J.. Induction of cell death in human macrophages by a highly virulent Korean Isolate of *Mycobacterium tuberculosis* and the virulent strain H37Rv. **Scand J Immunol.**, v.69(1), p.43-50, 2009.

SOLA C., FILLIOL I., LEGRAND E., MOKROUSOV I., RASTOGI N.. *Mycobacterium tuberculosis* phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. **J Mol Evol.**, v.53(6), p.680-989, 2001.

STOKES A.; DOXSEE R. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. **Cellular Immunology**, v.197, p.1-9, 1999.

SUN Y.J., LEE A.S., WONG S.Y., HEERSMA H., KREMER K., VAN SOOLINGEN D., PATON N.I.. Genotype and phenotype relationships and transmission analysis of drug-resistant tuberculosis in Singapore. **Int. J. Tuberc. Lung Dis.**, v.11, p.436–442, 2007.

THEUS S.; EISENACH K.; FOMUKONG N.; SILVER R. F.; CAVE M. D. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages. **The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.11, n.10, p.1087–1093, 2007.

TSOLAKI A.G., GAGNEUX S., PYM A. S., GOGUET DE LA SALMONIERE Y. L., KREISWIRTH B. N., VAN SOOLINGEN D., SMALL P. M. Genomic deletions classify the Beijing/W strains as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Clin Microbiol**, v.43, p.3185-91, 2005.

VAN LAARHOVEN A., MANDEMAKERS J. J., KLEINNIJENHUIS J., ENAIMI M., LACHMANDAS E., JOOSTEN L. A. B., OTTENHOFF T. H. M., NETEA M. G., VAN SOOLINGEN D., VAN CREVEL E R. Low Induction of Proinflammatory Cytokines Parallels Evolutionary Success of Modern Strains within the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing Genotype. **Infection and Immunity**, v.81, n.10, p.3750–3756, 2013.

VAN SOOLINGEN D., QIAN L., DE HAAS P.E., DOUGLAS J.T., TRAORE H., PORTAELS F., QUING H.Z., ENKHSaikan D., NYMADAWA P., VAN EMBDEN

- J.D. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of east Asia. **J Clin Microbiol**, v.33, p.3234-3238, 1995.
- WALZL G., RONACHER K., HANEKOM W., SCRIBA T.J., ZUMLA A. Immunological biomarkers of tuberculosis. **Nature Reviews Immunology**, v.11, p. 343-354, 2011.
- WANG C., PEYRON P., MESTRE O., KAPLAN G., VAN SOOLINGEN D., GAO Q., GICQUEL B., NEYROLLES O. Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and Other Genotypes. **PLoS ONE**, v. 5, n. 10, p. 13594, 2010.
- WHO. **Global tuberculosis report 2014**. World Health Organization, Geneva, Suíça, 2014.
- YANG C.T., CAMBIER C.J., DAVIS J.M., HALL C.J., CROSIER P.S., RAMAKRISHNAN L. Neutrophils exert protection in the early tuberculous granuloma by oxidative killing of mycobacteria phagocytosed from infected macrophages. **Cell Host Microbe**, v.12, p.301–312, 2012
- ZHANG M., GONG J., YANG Z., SAMTEN B., CAVE M.D., BARNES P.F.. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. **J. Infect. Dis.**, v.179, p.1213–1217, 1999.
- ZUMLA A., RAO M., PARIDA S. K., KESHAVJEE S., CASSELL G., WALLIS R., AXELSSON-ROBERTSSON R., DOHERTY M., ANDERSSON J., MAEURER M. Inflammation and tuberculosis: host-directed therapies. **J Intern Med.** (doi: 10.1111/joim.12256), 2014.



## ANEXO I

---

### ➤ ARTIGOS PUBLICADOS:

1. **RIBEIRO S. C. M.**, GOMES L. L., AMARAL E. P., ANDRADE M. R. M., ALMEIDA F. M., REZENDE A. L., LANES V. R., CARVALHO E. C. Q., SUFFYS P.N., MOKROUSOV I., LASUNSKAIA E. B. *Mycobacterium tuberculosis* Strains of the Modern Sublineage of the Beijing Family Are More Likely To Display Increased Virulence than Strains of the Ancient Sublineage. *J. Clin. Microbiol.*, v.52(7), p.2615, 2014.
2. AMARAL E. P., **RIBEIRO S. C. M.**, LANES V. R., ALMEIDA F. M., DE ANDRADE M. R. M., BOMFIM C. C. B., SALLES E. M., BORTOLUCI K. R., SILVA R. C., HIRATA M. H., ALVAREZ J. M., LASUNSKAIA E. B., D'IMPÉRIO-LIMA M. R.. Pulmonary Infection with Hypervirulent Mycobacteria Reveals a Crucial Role for the P2X7 Receptor in Aggressive Forms of Tuberculosis. *PLoS Pathogens*, v.10(7), e1004188. DOI:10.1371/journal.ppat.1004188, 2014.
3. GOMES L. L., VASCONCELLOS S. E. G., GOMES H. M., ELIAS A., ROCHA A., **RIBEIRO S. C. M.**, PANUNTO A., FERRAZOLI L., TELLES M.A., IVENS DE ARAUJO M .E., KRITSKI A. L., MOKROUSOV I., MANICHEVA O. A., LASUNSKAIA E. AND SUFFYS P. N.. Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, artigo *in press*, publicado online em 24 de fevereiro de 2015. DOI: 10.1016/j.tube.2015.02.025.