

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE  
*Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES COM  
DOENÇA PULMONAR NÃO TUBERCULOSA**

**VINICIUS DE OLIVEIRA MUSSI**

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

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ  
JULHO - 2017**

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE  
*Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES COM  
DOENÇA PULMONAR NÃO TUBERCULOSA**

**VINICIUS DE OLIVEIRA MUSSI**

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

**Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Elena Lassounskaia**

**Co-orientadora: Dr<sup>a</sup>. Thatiana Lopes Biá Ventura Simão**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ**

**JULHO- 2017**

**CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE  
*Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES COM  
DOENÇA PULMONAR NÃO TUBERCULOSA**

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

Aprovada em 10 de julho de 2017

**Comissão examinadora:**

Dr<sup>a</sup> Alba Lucínia Peixoto Rangel – UENF  
Doutora em Biociências e Biotecnologia

Dr<sup>a</sup> Marília Amorim Berbert de Molina - UENF  
Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

Dr. Philip Noel Suffys – FIOCRUZ  
Doutor em Biologia Molecular

Dr<sup>a</sup> Thatiana Lopes Biá Ventura Simão- UFRJ  
Doutora em Biociências e Biotecnologia  
CO-ORIENTADORA

Dr<sup>a</sup> Elena lassounskaia – UENF  
Doutora em Ciências Médicas  
ORIENTADORA

**Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do  
Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia,  
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,  
sob co-orientação da Dr<sup>a</sup> Thatiana Lopes Biá Ventura Simão e  
orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Elena Lassounskaia.**

**Apoio:**

- UENF- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

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

## **AGRADECIMENTOS**

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

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

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

À minha orientadora, Elena, por todo conhecimento transmitido. Agradeço pela confiança em mim depositada, principalmente por me inserir num universo científico completamente novo, pelas palavras de motivação para sempre seguir em frente e o carinho com que sempre tratou seus alunos.

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

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

Aos meus amigos Elenetes: Gislane, Fabrício, Igor, Andreza, Giliane, Efranci, Anderson, Matheus e Letícia, por todos os momentos de alegria, aprendizado, paciência e suporte nos momentos de tristeza. Vocês se tornaram pessoas especiais e que me alegram a cada dia. Muito obrigado!

Ao corpo técnico administrativo do LBR, as técnicas Verônica, Rita e Núbia. Agradeço também aos colegas de laboratório David, Rebeka, Grazielle e Taís pelos momentos de alegria que sempre nos reuniram.

Agradeço aos professores Dr<sup>a</sup>. Alba, Dr<sup>a</sup>. Marília e Dr. Philip por participarem da minha banca de defesa. Agradeço a Dr<sup>a</sup>. Érica de Oliveira Mello pela disponibilidade de revisar este trabalho. Agradeço a CAPES, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

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

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

Ao meu avô Bichara, minha madrinha Simone, minha prima Laisa e Diogo por estarem sempre presentes em minha vida e pelo apoio em todos eles.

Aos meus amigos Júlio César, Wesley, Joice, Rhaíza, Bruna, Aline e Catiele por todos os momentos (bons e ruins) que passamos juntos. Por sempre estarem presentes em minha vida.

Ao meu grande amigo Igor Cunha, que desde a graduação, se tornou um irmão de vida, uma pessoa que sempre está disposta a ajudar e que posso contar em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos de graduação: Juliana, Rhayane, Luisa, Luziana, Samantha, Ana Carolina, Bruna, Tobias e Josiane pela grande amizade formada durante os quatro anos de graduação e que continua até hoje.

A prof. Beatriz Ferreira (Cederj) e ao meu professor de inglês Cleones, por terem acreditado em mim, sempre me apoiando, me incentivando e me acompanhado nessa trajetória.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS.....</b>                                                                                            | <b>ix</b>  |
| <b>LISTA DE TABELAS.....</b>                                                                                            | <b>xi</b>  |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>                                                                                       | <b>xii</b> |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                      | <b>xiv</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                    | <b>xv</b>  |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                | <b>01</b>  |
| 1.1. Micobactérias não tuberculosas.....                                                                                | 01         |
| 1.2. <i>Mycobacterium kansasii</i> .....                                                                                | 03         |
| 1.3. Resposta Imune contra micobactérias.....                                                                           | 07         |
| 1.4. Virulência micobacteriana.....                                                                                     | 13         |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>                                                                                            | <b>17</b>  |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                | <b>19</b>  |
| 3.1. Objetivo geral.....                                                                                                | 19         |
| 3.2. Objetivos específicos.....                                                                                         | 19         |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                      | <b>20</b>  |
| 4.1. Testes <i>in vitro</i> .....                                                                                       | 20         |
| 4.1.1. Cultura celular.....                                                                                             | 20         |
| 4.1.2. Obtenção e preparo da cultura de estoque e do cultivo micobacteriano.....                                        | 20         |
| 4.1.3. Avaliação do crescimento micobacteriano em meio líquido .....                                                    | 21         |
| 4.1.4. Infecção da cultura de macrófagos.....                                                                           | 21         |
| 4.1.5. Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano.....                                                    | 22         |
| 4.1.6. Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados por isolados clínicos de Mkan..... | 22         |



|                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.1.7. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por isolados clínicos de Mkan.  | 23        |
| 4.1.8. Obtenção do <i>ranking</i> de virulência entre isolados clínicos estudados.....                                           | 24        |
| 4.1.9. Modelo de estudo <i>in vitro</i> .....                                                                                    | 25        |
| 4.2. Testes <i>in vivo</i> .....                                                                                                 | 25        |
| 4.2.1. Animais.....                                                                                                              | 25        |
| 4.2.2. Infecção experimental dos camundongos.....                                                                                | 26        |
| 4.2.3. Obtenção de células do pulmão e dos bacilos.....                                                                          | 27        |
| 4.2.4. Análise macroscópica e histológica dos pulmões.....                                                                       | 28        |
| 4.2.5. Análises estatísticas.....                                                                                                | 29        |
| 4.2.6. Conduta de trabalho.....                                                                                                  | 29        |
| 4.2.7. Modelo de pesquisa <i>in vivo</i> .....                                                                                   | 30        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                                                                                        | <b>31</b> |
| 5.1. Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido.....                                                     | 31        |
| 5.2. Avaliação do crescimento intracelular de Mkan em macrófagos infectados.....                                                 | 32        |
| 5.3. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de Mkan.....                                      | 34        |
| 5.4. Avaliação da produção de citocinas e mediadores inflamatórios pelos macrófagos infectados com diferentes cepas de Mkan..... | 38        |
| 5.5. Quantificação da taxa de virulência relativa das cepas Mkan avaliadas em testes <i>in vitro</i> .....                       | 41        |
| 5.6. Avaliação do crescimento de Mkan nos pulmões de camundongos infectados.....                                                 | 43        |

|                                                                                         |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.7. Patologia dos pulmões de camundongos infectados com cepas de Mkan.....             | 44        |
| 5.8. Avaliação da histopatologia do pulmão de animais infectados com cepas de Mkan..... | 48        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>                                                                | <b>53</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>                                                               | <b>59</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                               | <b>60</b> |
| <b>9. ANEXO.....</b>                                                                    | <b>67</b> |

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

|           |                                                                                                                                                           |    |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. | Diferença morfológica entre colônias de <i>M. kansasii</i> e <i>M. tuberculosis</i> em meio de cultivo sólido na presença de luz.....                     | 04 |
| Figura 2. | Árvore filogenética derivada de sequências intergênicas do gene do rRNA 16 S – 23 S mostrando as relações dos tipos de Mkan com outras micobactérias..... | 07 |
| Figura 3. | Representação esquemática da constituição e organização do granuloma .....                                                                                | 11 |
| Figura 4. | Representação esquemática da influência dos fatores regulatórios no aparecimento de infecção bacteriana.....                                              | 13 |
| Figura 5. | Distribuição mundial de <i>Mycobacterium kansasii</i> em amostras pulmonares em 2008 .....                                                                | 18 |

### MATERIAIS E MÉTODOS

|           |                                                            |    |
|-----------|------------------------------------------------------------|----|
| Figura 6. | Fluxograma da sequência experimental <i>in vitro</i> ..... | 25 |
| Figura 7. | Fluxograma da sequência experimental <i>in vivo</i> .....  | 30 |

### RESULTADOS

|            |                                                                                                                                         |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 8.  | Avaliação do crescimento micobacteriano em meio Middlebrook 7H9.....                                                                    | 32 |
| Figura 9.  | Avaliação do crescimento de <i>M. kansasii</i> em macrófagos RAW 264.7 infectados (A) e no meio sólido 7H10 (B).....                    | 33 |
| Figura 10. | Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por <i>M. kansasii</i> na proporção 50:1 por meio do teste com Azul de Tripan..... | 35 |

|            |                                                                                                                                         |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 11. | Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por <i>M. kansasii</i> na proporção 10:1 por meio do teste com Azul de Tripán..... | 36 |
| Figura 12. | Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por <i>M. kansasii</i> na proporção 10:1 por meio do teste de LDH.....             | 37 |
| Figura 13. | Análise da produção de citocinas pelos macrófagos RW 264.7 infectados pelas cepas de <i>M. kansasii</i> na proporção 10:1.....          | 39 |
| Figura 14. | Análise da produção de NO pelos macrófagos RAW264.7 infectados por cepas de <i>M. kansasii</i> na proporção 10:1.....                   | 40 |
| Figura 15. | Crescimento de bactérias no pulmão de animais infectados com cepas de <i>M. kansasii</i> em 28, 40 e 60 dias de infecção.....           | 44 |
| Figura 16. | Patologia pulmonar induzida em pulmões de camundongos C57BL/6 infectados por <i>M. kansasii</i> .....                                   | 46 |
| Figura 17. | Morbidade de camundongos C57BL/6 inoculados com cepas de <i>M. kansasii</i> .....                                                       | 48 |
| Figura 18. | Histopatologia do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados por <i>M. kansasii</i> .....                                                 | 50 |
| Figura 19. | Histopatologia do pulmão de camundongos C57BL/6 no dia 60 após infecção por cepa padrão 12478.....                                      | 51 |
| Figura 20. | Bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) no pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas de <i>M. kansasii</i> .....            | 52 |

## LISTA DE TABELAS

### RESULTADOS

|           |                                                                                                                                                                                                                            |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. | Avaliação da taxa de virulência das cepas de <i>M. kansasii</i> , isoladas dos pacientes com doença pulmonar, em relação da cepa padrão 12478 (ATCC), em testes de infecção dos macrófagos RAW 264.7 <i>in vitro</i> ..... | 42 |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE ABREVIATURAS

- ACK - Tampão Lise de Eritrócitos
- ADC - Albumina, dextrose, catalase
- AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida
- APCs - Células apresentadoras de antígenos
- ATCC - do inglês, *American Culture Collection*
- ATP - Adenosina trifosfato
- ATS/ADSA - do inglês, *American Thoracic Society/ Infectious Diseases Society of America*
- BAAR - Bacilos álcool-ácidos resistentes
- CDs - Células dendríticas
- CEVAs - Células epiteliais das vias aéreas
- CFP - Proteína do filtrado de cultura
- CFU - do inglês, *Colony forming unit*
- CLP - Lectina tipo C
- CTIAMs - Células T invariantes associadas à mucosa
- CTL - Linfócitos T citotóxicos
- D.O. - Densidade óptica
- DAMPs - Padrões moleculares associados a danos
- DC-SIGN - do inglês, *Dendritic cell specific ICAM-3 grabbing non integrin*
- DMEM-F12 - do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DPOC - Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- ESAT-6 - do inglês, *"6-kDa Early Secreted Antigenic Target"*
- ESX-1 - Sistema de Secreção 1 de ESAT-6
- HE - Hematoxilina-eosina
- i.p. - Intraperitoneal
- i.t. - Intratraqueal
- IFN- $\gamma$  - Interferon gama
- IgA - Imunoglobulina A
- IL-12 - Interleucina 12
- IL-1 $\beta$  - Interleucina 1 beta

- LAM - lipoarabinomana
- LDH - Lactato desidrogenase
- LSVAs - Líquido de superfície das vias aéreas
- MAC - Complexo *Mycobacterium avium*
- MAs - Macrófagos alveolares
- Mkan - *Mycobacterium kansasii*
- MNT - Micobactérias não tuberculosas
- MOI - Multiplicidade de infecção
- Mtb - *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC - Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- NAD - Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- NK - Célula *Natural Killer*
- NKG2D - Receptor 2A tipo lectina de célula *Natural Killer*
- NKp - Proteína de Célula *Natural Killer*
- NKTs - Células T *Natural Killer*
- NLRP3 - do inglês, NLR family, pyrin domain containing 3
- NO - Óxido Nítrico
- NOD2 - Domínio de oligomerização de nucleotídeo 2
- OADC - Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
- PBS - Tampão fosfato de sódio
- PCR - Reação em cadeia da polimerase
- PGE<sub>2</sub> - Prostaglandina E<sub>2</sub>
- PGL - Glicolipídeos fenólicos
- PPD – Derivado proteico purificado
- PRR - Receptor de reconhecimento padrão
- ROS - do inglês, *Reactive oxygen species*
- SFB - Soro fetal bovino
- TB - Tuberculose
- TCD4<sup>+</sup> - Linfócitos T auxiliares
- TCD8<sup>+</sup> - Linfócitos T citolíticos
- TLRs - Receptores Toll-Like
- TNF- $\alpha$  - Fator de necrose pulmonar

## RESUMO

Infecções pulmonares causadas por micobactérias não tuberculosas (NTM), incluindo *Mycobacterium kansasii* (Mkan), demonstram prevalência crescente no Brasil. Os sinais clínicos da doença causada por Mkan são similares aos da tuberculose, sugerindo elevada virulência destas bactérias. O objetivo deste estudo foi avaliar a virulência de dez cepas Mkan isoladas no Brasil de pacientes com doença pulmonar em comparação com a cepa Mkan de referência ATCC 12478. A aptidão bacteriana em meio de cultura foi avaliada pelo monitoramento do crescimento em meio Middlebrook 7H9. A capacidade da micobactéria de crescimento intracelular e a indução de morte necrótica nos macrófagos infectados foram avaliadas pela infecção das células RAW 264,7. Além disso, avaliamos a ativação dos macrófagos induzida por micobactérias através da quantificação de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) e óxido nítrico no sobrenadante da cultura por ELISA e ensaio de Griess, respectivamente. As cepas 8835, 8839 e 10953 exibiram alto nível de crescimento em macrófagos e foram capazes de induzir morte por necrose em células infectadas em MOI (Multiplicidade de infecção) 10:1, sendo consideradas altamente virulentas. Em contrapartida, as cepas 3657, 7287 e 7439 mostraram baixa toxicidade em culturas de macrófagos infectadas em alta dose de infecção, MOI 50:1, sugerindo baixa virulência. Outras cepas, incluindo a cepa de referência, exibiram níveis intermediários de virulência. Para validar os resultados dos testes in vitro, o grau de virulência de três cepas (8835, 4404 e 12478) foi avaliado adicionalmente in vivo, utilizando camundongos C57BL/6 infectados intratraquealmente com 50.000 CFU/animal. Como esperado, a cepa 8835 exibiu maior virulência, sendo capaz de induzir doença fatal associada a inflamação pulmonar granulomatosa extensiva, levando à morte dos animais em 40 dias após a infecção. A inflamação induzida pelas cepas 4404 e 12478 foi melhor controlada e causou à doença crônica em ambos os grupos de animais. Entretanto, a virulência da cepa 12478 foi maior, sendo que a carga bacteriana dessa cepa nos pulmões foi estável durante 60 dias de observação, diferentemente da carga da cepa 4404 que apresentou tendência de redução. Os resultados demonstram considerável diferença na virulência dos isolados clínicos de Mkan, sendo que a maioria dos isolados exibiu maior virulência que a cepa de referência.

**Palavras-chaves:** *Mycobacterium kansasii*, infecção, virulência.



## ABSTRACT

Pulmonary infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM), including those caused by *Mycobacterium kansasii* (Mkan), demonstrate increasing prevalence in Brazil. Clinical signs of the disease caused by Mkan are similar to those in tuberculosis, suggesting increased virulence of these bacteria. The aim of this study was to evaluate virulence of ten Mkan strains isolated in Brazil from patients with lung disease in comparison with the reference Mkan ATCC strain 12478. Bacterial fitness in culture medium was evaluated by monitoring of Mkan growth in the 7H9 Middlebrook broth. Ability of mycobacteria to intracellular growth and induction of necrotic death in macrophages was evaluated by infection of RAW 264.7 cells. Additionally, we studied mycobacteria-induced macrophage activation through the quantification of cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-10) and nitric oxide in the cell culture supernatants by sandwich ELISA and Griess assay, respectively. The strains 8835, 8839 and 10953 exhibited the highest levels of growth in macrophages and were able to induce necrotic death in cells infected at a multiplicity of infection, MOI, of 10:1, were considered highly virulent. In contrast, the strains 3657, 7287 and 7439 showed low levels of cell toxicity in macrophage cultures infected either in low dose (MOI 10:1) or high dose of infection (MOI 50:1), suggesting low virulence. Other strains, including the reference Mkan strain 12478, exhibited intermediate levels of virulence. To validate the results of *in vitro* testing, the virulence of selected Mkan strains (8835, 4404 and 12478) was additionally evaluated in C57BL/6 mice infected intratracheally with 50.000 bacteria/mice. As expected, virulence of the strain 8835 was significantly higher, being able to induce rapidly progressive disease associated with extensive granulomatous lung inflammation leading to animal death within 40 days after infection. The inflammation induced by the strains 4404 and 12478 was better controlled and caused the chronic disease in both groups of animals. However, the virulence of the 12478 strain was greater, and the bacterial burden of this strain in the lungs was stable during 60 days of observation, unlike the cargo of 4404 strain which presented a reduction trend. The results demonstrate considerable difference in the virulence of the clinical isolates of Mkan, and most of the isolates exhibited greater virulence than the reference strain.

**Keywords:** *Mycobacterium kansasii*, infection, virulence.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Micobactérias não tuberculosas

O gênero *Mycobacterium* é constituído por micobactérias tuberculosas, pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* (MTBC - *M. tuberculosis* (Mtb), *M. microti*, *M. bovis*, incluindo *M. bovis* BCG entre outras) e pelas micobactérias não tuberculosas (MNT), que comumente são oportunistas e ambientais. As micobactérias pertencentes ao grupo MNT, podem ser classificadas de acordo com a patogenicidade, em potencialmente patogênicas e não-patogênicas, e também segundo sua taxa de crescimento, crescimento rápido (antes de 7 dias) ou lento (em sete dias ou mais) (JOHNSON e ODELL, 2014).

Já foram descritas mais de 172 espécies de MNT, dentre elas destacam-se as micobactérias pertencentes ao complexo *M. avium* (MAC) incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*, como também *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. marinum* e *M. goodii* (FARIA *et al.*, 2015).

Os primeiros relatos de MNT ocorreram em 1882, logo após a descoberta de *M. tuberculosis*, principal agente causador da tuberculose (TB), por Robert Koch. Até a década de 1950, pouco se conhecia a respeito das MNT, sendo inicialmente denominadas como micobactérias atípicas ou anônimas (SHAO *et al.*, 2015).

As MNT potencialmente patogênicas podem acometer humanos e animais, sendo as espécies pertencentes ao complexo MAC e a *M. kansasii* as mais comuns em infecções em humanos (MORIMOTO *et al.*, 2014).

Nos humanos, as manifestações clínicas vão desde a ausência de sintomas até a doença cavitária. Os sintomas clínicos da infecção pulmonar variam em alcance e intensidade, contudo é comum a tosse crônica com presença de escarro purulento. Os sintomas sistêmicos incluem mal-estar, fadiga e perda de peso (JOHNSON e ODELL, 2014).

As MNT de crescimento lento são frequentemente responsáveis pelo desenvolvimento da doença pulmonar ou linfadenite, enquanto MNT de crescimento rápido podem afetar a cutis, tecidos moles, ossos e articulações. Além disso, formas disseminadas da doença são observadas em pessoas imunocomprometidos (KHALEDI *et al.*, 2016). Contudo, indivíduos com mais de

50 anos, apresentando predisposição a condições pulmonares obstrutivas também podem desenvolver infecção por MNT.

Os critérios microbiológicos e clínicos para o diagnóstico de infecções pulmonares ocasionadas por MNT requerem a avaliação da presença de sintomas, anormalidades radiológicas e cultivo microbiológico, em conjunto com a exclusão da possibilidade da presença de outro agente etiológico. Nos casos de infecção disseminada, a cultura do sangue em meios específicos para micobactérias também é realizada (KHALEDI *et al.*, 2016).

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

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

Observa-se aumento da prevalência de doenças pulmonares causadas por MNT em várias partes do mundo, principalmente em países industrializados da América do Norte, Europa e na Austrália (CASSIDY *et al.*, 2009; PREVOTS *et al.*, 2010). No leste da Ásia, destacando o Japão, Coreia do Sul e Taiwan, a taxa de prevalência de infecções por MNT também apresentou aumento, o que reforça o alerta de vigilância para outros países (PREVOTS e MARRAS, 2015).

A estimativa é de aproximadamente 6 casos/100.000 habitantes nos Estados Unidos da América. Em muitos países em desenvolvimento com prevalência elevada de TB, a identificação e registro dos casos de infecções provocadas por MNT entre imunocompetentes estão subestimados, devido à baixa realização da rotina de cultivo das espécies a partir de amostras suspeitas

e a dificuldade de obtenção do diagnóstico diferencial da TB (CASSIDY *et al.*, 2009; DE MELLO *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que cerca de 60% dos pacientes diagnosticados com infecção pulmonar por MNT no Estado do Rio de Janeiro, entre 1993 e 2011, foram inicialmente diagnosticados e tratados de forma empírica (sem confirmação microbiológica) para TB (DE MELLO *et al.*, 2013).

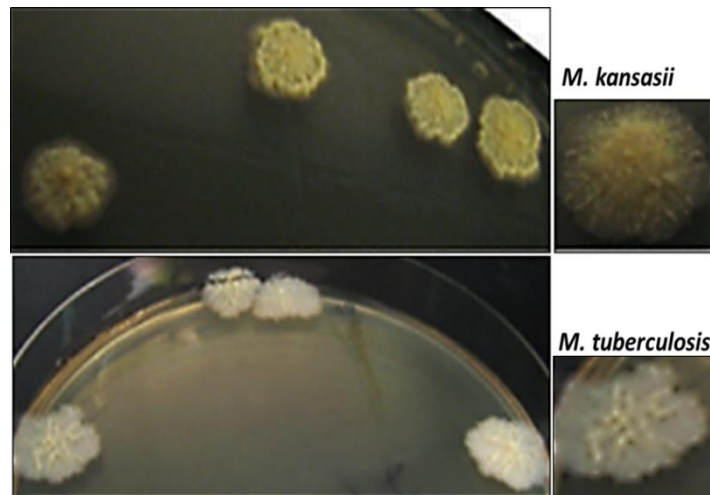
## **1.2. *Mycobacterium kansasii***

*M. kansasii* (Mkan) é uma das mais importantes MNT isoladas de espécimes clínicos, e responsável por grande parte das infecções destas micobactérias na população humana, sendo a segunda MNT mais comum e potencialmente patogênica, precedida apenas pelas espécies do MAC.

Similar às demais micobactérias, Mkan são organismos aeróbicos, não móveis e possuem parede celular rica em lipídeos e principalmente em ácidos micólicos (JOHNSON e ODELL, 2014). Devido à espessura e composição de parede celular, Mkan é resistente a metais pesados, desinfetantes e pirazinamida, sendo classificada como bacilo álcool-ácido-resistente (BAAR). Esta característica está relacionada ao fato da micobactéria, quando tratada com fucsina fenicada, resistir à descoloração por uma solução de álcool-ácido, permanecendo corada em vermelho (SADAPHAL *et al.*, 2008).

Os glicolípidos fenólicos (PGL) podem estar presentes na parede micobacteriana de acordo com a espécie e ser composto de um a quatro desoxiaçúcares O-metilados. Foi descrito que PGLs são produzidos por *M. leprae*, *M. kansasii*, *M. bovis* e algumas cepas de *M. tuberculosis*. Reed *et al.* (2004) descreveu que a produção de PGL em Mtb está associada ao fenótipo hipervirulento exibido por um subconjunto de isolados desta cepa pertencente à família W-Beijing (REED *et al.*, 2004).

A fotocromogenicidade (**Figura 1**) é uma das principais propriedades apresentadas por Mkan. Quando exposto à luz, o bacilo produz um pigmento de coloração amarela, em decorrência da formação de carotenoides provocados por raios UV (JOHNSTON *et al.*, 2017).



**Figura 1 – Diferença morfológica entre colônias de *M. kansasii* e *M. tuberculosis* em meio de cultivo sólido na presença de luz. (Adaptado de WANG *et al.*, 2015).**

O cultivo bacteriano de Mkan, em geral, pode ser facilmente obtido em meio de cultura líquido e sólido. As suspensões de Mkan em meio líquido favorecem maior crescimento em menor tempo, podendo duplicar a concentração inicial de bacilos em poucos dias. Enquanto o cultivo em meio sólido permite o isolamento e visualização de características morfológicas das colônias (JOHNSON e ODELL, 2014).

O crescimento micobacteriano de Mkan é considerado lento comparado a outras MNT, embora seja mais rápido do que o crescimento observado para as cepas de Mtb, ocorrendo em torno de duas a quatro semanas em meio de cultura sólido (SEISCENTO *et al.*, 2005). As colônias de Mkan em meio sólido apresentam forma arredondada, superfície rugosa e úmidas (POLLAK e BUHLER, 1955).

Diferentemente da TB, a rota de transmissão do *M. kansasii* não é bem definida, contudo MNT podem ser ingeridas ou inaladas. A transmissão de Mkan entre humanos é incomum (RICKETTS *et al.*, 2014) e não foi convincentemente demonstrada. Embora animais possam configurar um reservatório para Mkan, a transmissão animal-humano não é presumida (KANKYA *et al.*, 2011). No entanto, o compartilhamento de sistemas de água com animais pode ser fonte de transmissão desta micobactéria, tendo em vista a principal forma de contaminação por Mkan estar relacionada ao contato ou consumo de água,

independente da mesma ser proveniente de fonte natural ou tratada (KANKYA *et al.*, 2011).

Estudos sobre a capacidade de transmissão de Mkan entre humanos pela via respiratória, como ocorre na TB, ainda devem ser efetuados. Os principais fatores de risco para a infecção por Mkan incluem a doença pulmonar crônica, tabagismo e alcoolismo, sendo a doença pulmonar a manifestação clínica mais comum (MATVEYCHUK *et al.*, 2012).

Mkan acomete principalmente indivíduos imunocomprometidos tais como pacientes com AIDS, insuficiência renal, transplantados com uso crônico de corticosteroides, TNF- $\alpha$  e leucemia. Além disso, pacientes que apresentam alterações estruturais pulmonares, associados à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), bronquiectasia, sequelas de TB prévia e fibrose cística são mais susceptíveis a infecção por Mkan (GRIFFITH, 2007).

Após a infecção pulmonar por Mkan, o desenvolvimento da doença é lento e pode desencadear sinais clínicos semelhantes aos da TB, incluindo febre, dor no peito, tosse com ou sem hemoptise, suores noturnos e perda de peso, nos estágios mais avançados e severos da doença. Apresentações radiográficas do comprometimento pulmonar por MNT podem exibir lesão fibrocavitária, bronquiectasia nodular, nódulo solitário ou pneumonite por hipersensibilidade, ou pode ser representado por lesões cavitárias ou não cavitárias (SEISCENTO *et al.*, 2005). A infecção extrapulmonar por Mkan pode causar gastroenterite, linfadenite, osteomielite, sinovite, celulite, empiema ou pericardite (CHEN *et al.*, 2012).

O diagnóstico para Mkan requer o isolamento da micobactéria. Os testes mais utilizados são a baciloscopia e a cultura do escarro de pacientes, contudo outros testes podem ser utilizados para confirmação do diagnóstico, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), cultura de sangue (em casos de suspeita de bacteremia) e a prova tuberculínica (PPD – Derivado proteico purificado), que é um teste inespecífico (KOIRALA *et al.*, 2017).

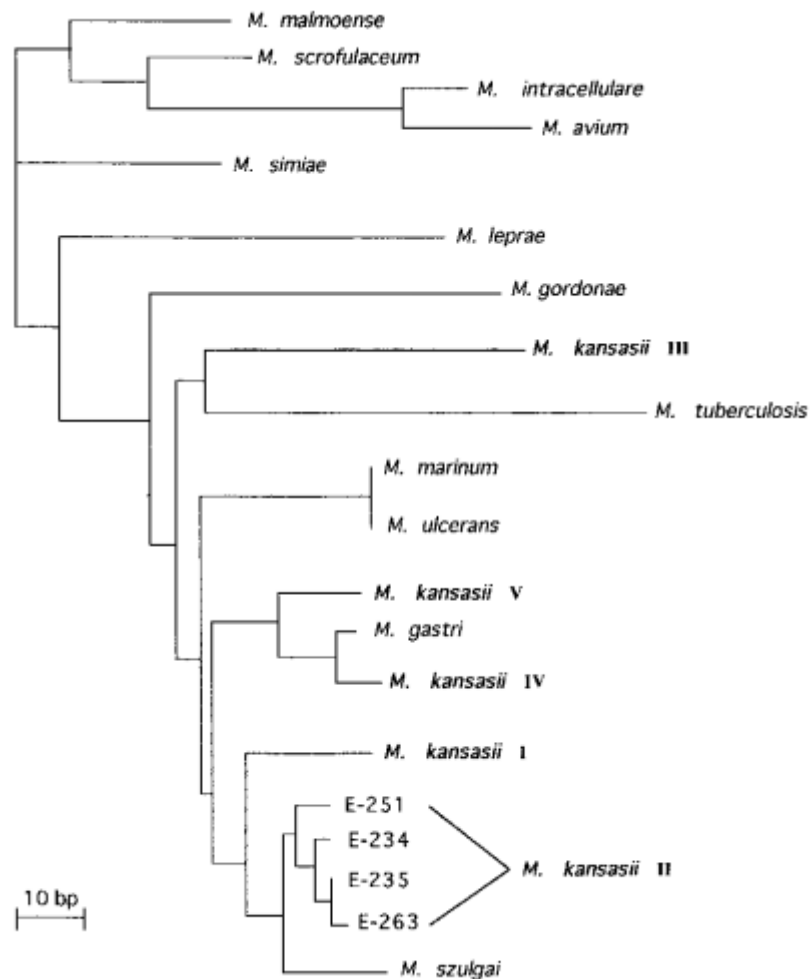
O diagnóstico diferencial entre as infecções ocasionadas por Mkan e Mtb é complexo, mas essencial para que o tratamento seja adequado, uma vez que

os fármacos anti-TB não são amplamente eficazes contra Mkan e outros antibióticos e esquemas terapêuticos devem ser adicionados (LIM *et al.*, 2013).

A ATS/IDSA (*American Thoracic Society/ Infectious Diseases Society of America*) indica a utilização de dois regimes de tratamento para os casos de infecção pulmonar causada por Mkan. Inicialmente, é recomendado o regime terapêutico utilizando rifampicina, etambutol e isoniazida, por 12 a 18 meses e pelo menos 12 meses de cultura de escarro negativa. O regime alternativo incluindo rifampicina, isoniazida e etambutol, complementado com estreptomicina durante os primeiros 2-3 meses foi descrito com baixa taxa de recidiva no período de tratamento de 12 meses. Nos casos de resistência a isoniazida e de acordo com os testes de susceptibilidade *in vitro*, macrolídeos como a claritromicina ou azitromicina e a moxifloxacina (fluoroquinolona de quarta geração) demonstraram ser uma alternativa, podendo ser incluso também o sulfametoxazol (KOIRALA *et al.*, 2017).

Mkan pode ser dividido em 5 grupos geneticamente distintos (MKA-I, MKA-II, MKA-III, MKA-IV e MKA-V) com base na genotipagem da região espaçadora intergênica 16S-23S, que está localizada entre os genes que codificam os genes do RNA ribossomal 16S e 23S (AREND *et al.*, 2005).

Estudos anteriores mostraram que dois grupos genéticos estão diretamente relacionados a doença em humanos. O grupo MKA-I foi encontrado com maior frequência nas amostras dos isolados clínico dos pacientes, enquanto o grupo MKA-II foi encontrado com menor frequência. Os isolados ambientais eram predominantemente dos grupos MKA-II, MKA-III, MKA-IV ou MKA-V. O genótipo MKA-II foi associado a infecção em pacientes imunocomprometidos refletindo em um potencial patogênico inferior ao genótipo MKA-I. Essa dicotomia parcialmente sobreposta sugere a presença de diferenças geneticamente baseadas na virulência entre cepas clínicas e ambientais de Mkan (TAILLARDI, *et al.*, 2003).



**Figura 2 – Árvore filogenética derivada de seqüências intergênicas do gene do rRNA 16S-23S mostrando as relações dos tipos de Mkan com outras micobactérias. (Adaptado de TAILLARDI, *et al.*, 2003).**

### 1.3. Resposta imune contra micobactérias

A aerossolização de pequenas gotículas, como ocorre nos chuveiros domésticos e borrifadores de plantas com água contaminada, possibilitam Mkan adentrar nos alvéolos pulmonares, sendo a via provável de aquisição de doença nos pulmões (RICKETTS *et al.*, 2014; JOHNSON e ODELL, 2014).

Ao infectar o organismo, a primeira barreira encontrada pelo patógeno é o sistema imune, embora pouco seja conhecido sobre a resposta imune inata contra Mkan (CHEN *et al.*, 2012). A própria mucosa respiratória fornece defesa contra a micobactéria. Esta consiste de uma camada de células epiteliais das vias aéreas (CEVAs), a lâmina própria (constituída por tecido conjuntivo e células



imunes) e pelo líquido de superfície das vias aéreas (LSVAs), composto por muco, imunoglobulina A (IgA) e por inúmeros fatores imunes inatos na superfície luminal (LERNER *et al.*, 2015).

Além da produção de proteínas surfactantes, as CEVAs apresentam em sua superfície celular, receptores Toll-like (TLRs) que se destacam no reconhecimento e interação com componentes micobacterianos durante a infecção. Outros receptores de reconhecimento padrão (PRR) estão envolvidos no reconhecimento de micobactérias e medeiam a produção de citocinas e moléculas efetoras, tais como: NOD2, Dectina-1, receptores de lectina tipo C (CLP), receptor de manose e DC-SIGN (LI *et al.*, 2012).

As CEVAs apresentam o antígeno as células T invariantes associadas à mucosa (CTIAMS), que são estimuladas a produzirem IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e granzimas. As células CTIAMS, rapidamente respondem à infecção, providenciando um aumento na produção de IFN- $\gamma$  e maior ativação dos macrófagos (LERNER *et al.*, 2015).

Os bacilos podem ser eliminados pelas células do sistema imune ou desencadear uma infecção produtiva evoluindo para uma doença ativa e disseminação bacilar. Embora a resposta imune desenvolvida contra Mkan e Mtb exibam similaridades, acredita-se que um hospedeiro sadio seja capaz de controlar o crescimento bacilar de Mkan, ou mesmo eliminar o bacilo através da resposta imune inata (WIELAND *et al.*, 2006a).

Ao evadirem à defesa primária das vias aéreas, as micobactérias alcançam os alvéolos pulmonares constituídos por células epiteliais do tipo I e II, macrófagos alveolares (MAs), neutrófilos e células dendríticas (CDs) (LERNER *et al.*, 2015).

Os macrófagos são as principais células da defesa imune do hospedeiro a interagir com a micobactéria, sendo estimuladas a produzir de uma gama de mediadores químicos (NO, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12). Existem cerca de dez MAs em cada alvéolo, e estes possuem mecanismos celulares antimicrobianos autônomos, embora a micobactéria possa evadir ou tolerar tais mecanismos dependendo da virulência e dose de infecção (ORME *et al.*, 2015). O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso produzido por macrófagos e outras células, exercendo função antimicrobiana. Contudo existe uma linha tênue entre a

proteção decorrente do recrutamento de células e efeito microbicida e a promoção de danos teciduais (BODGAN, 2001).

Os neutrófilos recrutados contribuem com a liberação de ampla variedade de produtos microbicidas e citotóxicos (mieloperoxidases, oxigênio reativo, metaloproteinases, entre outros) secretados ou liberados durante a morte celular (TAN *et al.*, 2006).

Células NK recrutadas para o local da infecção reconhecem macrófagos infectados por micobactérias através dos receptores NKp44, NKp26 e NKG2D, desencadeando a lise destas células. Além disso, células NK produzem IFN- $\gamma$  e outras citocinas responsáveis pelo aumento no número de células TCD8<sup>+</sup> e células T NK (NKTs) (VANKAYALAPATI e BARNES, 2009).

As CDs destacam-se pela indução da resposta imune específica. Após a fagocitose dos bacilos, estas células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs), se deslocam do local da infecção nos pulmões para os órgãos linfoides secundários na região torácica superior, apresentando via MHC de classe I e II, os antígenos micobacterianos para as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Após o reconhecimento e ativação dos linfócitos, ocorre um influxo de células T específicas para o foco infeccioso (RAO *et al.*, 2015; CHADHA *et al.*, 2015).

Durante o desenvolvimento da resposta imune adaptativa à micobactérias, são observados a presença de linfócitos T auxiliares (TCD4<sup>+</sup>) e T citolíticos (TCD8<sup>+</sup>). As células T auxiliares são responsáveis por organizar e conduzir a resposta imune adaptativa, à medida que as linfócitos T citotóxicos atuam na lise das células infectadas. Estes tipos de linfócitos T desempenham papel crítico na eliminação ou controle de infecções micobacterianas crônicas (ESSER *et al.*, 2003).

Células TCD4<sup>+</sup> do tipo Th1 são necessárias na imunidade celular contra Mtb e na contenção micobacteriana no interior dos granulomas (WINSLOW *et al.*, 2008). O IFN- $\gamma$  produzido pelas células TCD4<sup>+</sup> do tipo Th1 em resposta a antígenos micobacterianos é uma das principais citocinas responsáveis pela ativação clássica dos macrófagos e indução da autofagia nas células infectadas. Estes mecanismos são fundamentais para eliminação da micobactéria pelos macrófagos. Entretanto, algumas micobactérias podem inibir seu efeito microbicida. Um exemplo de mecanismo de inibição da produção de IFN- $\gamma$  pelas células T é o desencadeado pelo sistema de secreção ESX-1 no Mtb. O sistema

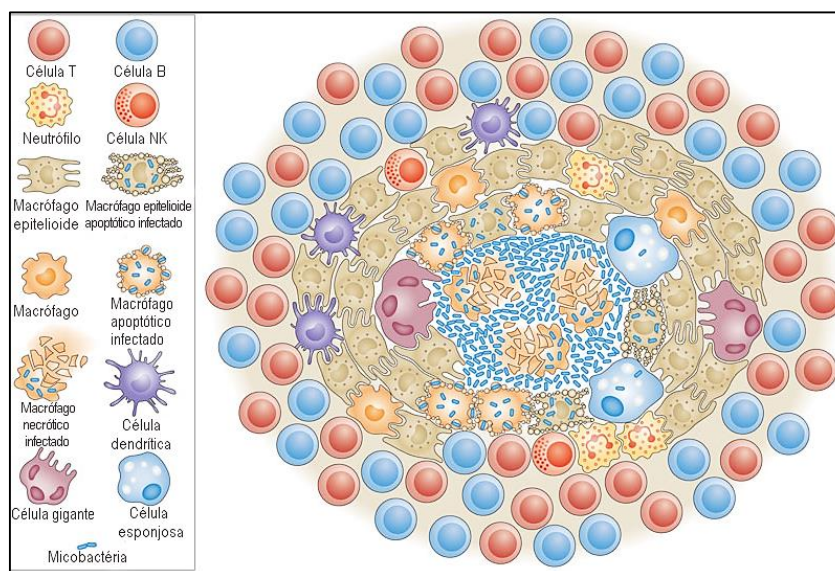
de secreção ESX-1 é necessário à virulência de micobactérias patogênicas e o locus ESX-1 codifica uma série de genes necessários à secreção de fatores de virulência como as proteínas ESAT-6 e CFP10. A lipoarabinomana (LAM), antígeno glicolipídico encontrado na parede celular micobacteriana, também pode bloquear a ativação da transcrição de genes induzíveis pela IFN- $\gamma$  em linhagens celulares de macrófagos humanos (LERNER *et al.*, 2015).

WIELAND *et al* (2006b) descreveu que durante a infecção *in vivo* por Mkan ocorre menor produção de IFN- $\gamma$  comparado ao observado em infecções por Mtb. Sugeriu-se então que a resposta imune protetora contra a infecção pulmonar por Mkan independe da presença de células TCD4<sup>+</sup> ou da produção de IFN- $\gamma$ .

A atuação da imunidade humoral pode alterar o desfecho da resposta imune a micobactérias (NIKI *et al.*, 2015). Foi descrito que folículos linfóides periféricos junto ao granuloma nos pulmões dos pacientes com TB, são sítios de iniciação de células imunes, cujos folículos compreendem agregados de células B, intercalados com células T e macrófagos infectados por Mtb (KUMAR *et al.*, 2015). Células B podem contribuir para a proteção e indução precoce de uma resposta efetiva de células TCD4<sup>+</sup> na TB, podendo se envolver na apresentação de antígenos às células T e na produção de citocinas e de anticorpos específicos contra micobactérias (RAO *et al.*, 2015). Alguns subgrupos de células B efectoras, podem promover o desenvolvimento de respostas Th1 através da produção de IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (KOZAKIEWICZ *et al.*, 2013). A produção de anticorpos específicos contra Mtb pode ter efeitos clinicamente relevantes nas respostas imunes adaptativas, em adição à resposta imune mediada por células na TB (ZHANG *et al.*, 2012).

Ao longo do curso da infecção, as células quimioatraídas vão se acumulando e reunindo-se para a formação de um agregado de células compactas formados por macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, células B, células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> rodeados por fibroblastos para contenção da disseminação bacilar (**Figura 3**). O granuloma, principal característica da resposta imune a TB, era descrito apenas como uma forma de defesa do hospedeiro contra micobactérias, porém, recentes estudos demonstraram que as micobactérias podem se utilizar desta estrutura para subverter a resposta

imune, recrutando células permissíveis (monócitos, neutrófilos) para sua replicação, possibilitando sua disseminação para outros locais no interior do hospedeiro (BOZZANO *et al.*, 2014).



**Figura 3 – Representação esquemática da constituição e organização do granuloma.** (Adaptado de RAMAKRISHNAN, 2012).

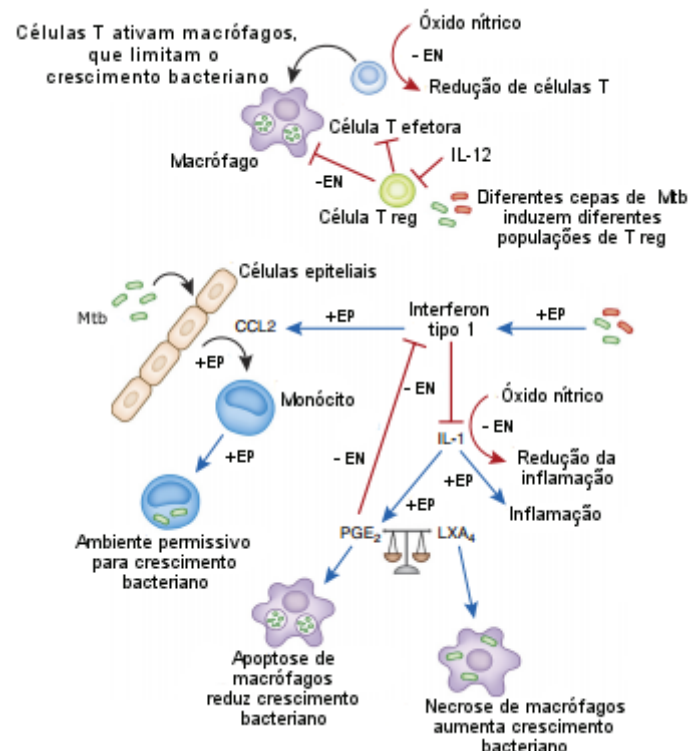
O tipo de morte celular induzido após infecção da célula hospedeira pela micobactéria é crucial para o desfecho da doença. A autofagia é um mecanismo de defesa inato e possui papel importante no controle e eliminação micobacteriana. Contudo, Mtb consegue evadir esta defesa através da inibição da fusão do fagossomo ao lisossomo pela atuação do sistema de secreção de ESX-1 (ROMAGNOLI *et al.*, 2012). Cepas de Mkan também expressam o sistema de secreção ESX-1 e podem formar poros na membrana celular, ocasionando efluxo de potássio e consequente ativação do inflamassoma (CHEN *et al.*, 2012).

A replicação acelerada de micobactérias virulentas em macrófagos induz morte necrótica promovendo liberação do bacilo. A necrose dos macrófagos favorece a disseminação da bactéria e a infecção de novas células permissíveis, induzindo novos ciclos de replicação (LERNER *et al.*, 2015).

Durante a infecção por micobactérias patogênicas, há a formação e ativação do inflamassoma NLRP3 que resulta na ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$ . A ativação da caspase-1 medeia a sobrevivência ou a morte de células, além de regular a secreção não convencional de proteínas. CHEN *et al* (2012) descreveram que em macrófagos infectados por Mkan ocorre ativação do inflamassoma NLRP3/ASC dependente de ESX-1 ou ESAT-6, com consequente ativação da caspase-1 e secreção de IL-1 $\beta$ . Isto resulta em efluxo de potássio, acidificação do lisossoma, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e catepsina B, sugerindo uma forma de contenção e eliminação de Mkan pelo hospedeiro.

Cepas virulentas de Mtb, em contraste do descrito para Mkan, utilizam deste mecanismo para evadir a resposta imune. A indução acelerada de morte necrótica nos macrófagos infectados por Mtb conduz a uma cascata de sinalização que ativa a formação do complexo multiprotéico do inflamassoma, promovendo a produção de IL-1 $\beta$  e exarcebando a inflamação pulmonar. O núcleo necrótico possibilita um local de sobrevivência para o bacilo e dificulta a ação de fármacos antimicobacterianos (ORME e BARSARABA, 2014).

O NO produzido limita o acúmulo de células T diferenciadas no granuloma micobacteriano e a atividade do inflamassoma NLRP3, requerida para a resposta inflamatória inata mediada por IL-1 $\beta$ . O IFN do tipo I limita a produção de IL-1 $\beta$  bioativo, enquanto a IL-1 $\beta$  também limita o IFN de tipo 1. A IL-1 $\beta$  é necessária para o controle do crescimento bacteriano por conduzir a produção de PGE<sub>2</sub> (**Figura 4**). A PGE<sub>2</sub> atua no controle do crescimento bacteriano por macrófagos, provavelmente promovendo a apoptose nestas células. A função da IL-1 $\beta$ , regulada pelo NO, mediando a inflamação prejudicial, se contrasta com sua função no estímulo à produção de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) para o controle do crescimento micobacteriano, o que destaca a importância crucial no equilíbrio entre a resposta imune protetora e imunopatologia no desfecho da infecção por micobactérias (ORME *et al.*, 2015).



**Figura 4 – Representação esquemática da influência dos fatores regulatórios no aparecimento de infecções bacterianas.** (Adaptado de ORME *et al.*, 2015).

#### 1.4. Virulência micobacteriana

A virulência pode ser definida como a capacidade de um agente patogênico se multiplicar e causar danos em seu hospedeiro, evadindo assim, das defesas do sistema imune do hospedeiro e induzindo a doença que pode levar a morte. A virulência é determinada geneticamente pelos genes que codificam fatores de virulência, como enzimas de várias vias lipídicas, proteínas de superfície celular, proteínas reguladoras, proteínas de sistemas de transdução de sinal, toxinas entre outros. Estes fatores auxiliam a micobactéria no processo de infecção e reprodução no hospedeiro, a fim de superar as respostas imunes desenvolvidas pelo mesmo (POULIN e COMBES, 1999).

As micobactérias carecem de fatores de virulência clássicos, como toxinas, típicos de outros patógenos bacterianos. Contudo, muitos dos genes de virulência das espécies do MTBC são conservados em micobactérias não patogênicas, sugerindo que espécies patogênicas adaptaram seus genomas

para sobrevivência no ambiente intracelular, com aquisição mínima de genes de virulência exclusivos (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Fenotipicamente, o nível da virulência de um patógeno está diretamente associado ao nível de expressão de fatores de virulência nas diferentes etapas de sua interação com o hospedeiro (SMITH, 2003).

Avanços consistentes no entendimento das bases moleculares da patogenicidade, virulência e persistência de micobactérias têm sido obtidos, com contribuição fundamental na identificação de genes de virulência de micobacterianos essenciais. Em particular, a identificação de genes de virulência têm sido realizada através da utilização de bibliotecas de *transposons* mutantes em combinação com diferentes métodos e modelos de estudo, o que colabora com a elucidação de mecanismos que os bacilos utilizam para sobreviver e persistir nos hospedeiros (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Existe uma variedade de parâmetros para caracterizar a virulência e ainda não há uma definição específica e universalmente aceita sobre o que constitui um gene de virulência. A existência de patógenos oportunistas e indivíduos altamente suscetíveis dificulta a obtenção de definições precisas (KEANE *et al.*, 2000). É fundamental caracterizar a virulência do patógeno e sua relação de interação e sobrevivência do hospedeiro, visto que a ausência de fatores de virulência atenua a ação do microrganismo em modelos *in vivo* (SMITH, 2003).

A virulência micobacteriana pode ser caracterizada quanto ao perfil imunológico utilizando modelos de infecção *in vitro*, nos quais os hospedeiros são linhagens celulares, e *in vivo*, em que os hospedeiros são animais de experimentação (FORRELLAD *et al.*, 2013).

O teste de infecção *in vitro* em macrófagos permite avaliar as primeiras etapas de interação intracelular do patógeno com a célula hospedeira. Podem ser utilizadas como células-alvo para infecção por micobactéria: macrófagos humanos ou murinos, células dendríticas e/ou pneumócitos. Geralmente, as células mais utilizadas para infecção são macrófagos de diferentes linhagens celulares humanas (ex. THP-1) ou murinas (ex. RAW 267.4) ou células provenientes de culturas primárias obtidas através de precursores hematopoiéticos derivados da medula óssea e diferenciados em macrófagos *in vitro* (MAULÉN, 2011). Contudo, as células obtidas de diferentes doadores possuem características imunogenéticas variáveis que podem contribuir para o

caráter da resposta dos macrófagos contra a micobactéria, por esse motivo, se faz necessário a padronização dos testes (RIENDEAU e KORNFELD, 2003).

Os principais parâmetros analisados *in vitro* são o crescimento intracelular micobacteriano nos macrófagos infectados, que avalia a capacidade da micobactéria em se adaptar a um ambiente desfavorável, e os possíveis mecanismos de inibição dos efeitos bactericidas das células fagocitárias. Neste sentido, é conhecido que micobactérias virulentas crescem mais rápido que cepas avirulentas, sendo esta uma forma de evadir a defesa imune (KEANE *et al.*, 2000).

Também é possível avaliar *in vitro* a capacidade das micobactérias virulentas e avirulentas de induzirem a morte celular em macrófagos (citotoxicidade) e o tipo de morte (necrose ou apoptose). Micobactérias virulentas inibem o mecanismo de indução de apoptose em células do hospedeiro, criando um nicho para sua replicação. A indução da necrose nas células infectadas favorece a liberação de conteúdo celular, incluindo as próprias micobactérias e vários componentes intracelulares como ATP (adenosina trifosfato) e proteínas de estresse que funcionam como sinais de perigo – *danger signals* (DAMPs) - para o hospedeiro. A liberação dos DAMPs induz o recrutamento celular de novos fagócitos para o local da infecção para serem utilizados pelas micobactérias como células permissíveis para sua propagação (BUTLER *et al.*, 2012).

A utilização do modelo de infecção *in vitro* permite avaliar a ativação inata dos macrófagos pela micobactéria, induzida através de TLRs, e a de produção das citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-1 $\beta$ ). Foi demonstrado que micobactérias virulentas induzem menos TNF- $\alpha$  e IL-12 do que cepas avirulentas, o que diminui a capacidade do hospedeiro de eliminar a micobactéria, reduzindo a resposta efetora de macrófagos e células T contra o patógeno (REED *et al.*, 2008).

A utilização de modelos de infecção *in vivo* para avaliação da virulência e perfil imunológico desencadeado pelo patógeno ao interagir com o hospedeiro é o teste “padrão ouro” (FLYNN, 2006). Para a análise *in vivo* são utilizados principalmente camundongos, devido à maior relação custo/benefício. Os animais são infectados pela micobactéria através das vias respiratórias (via natural de infecção) e posteriormente são analisados a morbidade, perda do



peso, histopatologia e mortalidade induzida pela cepa micobacteriana. Nestes modelos podem ser estudados o percentual de morte ocasionado pela cepa infectante e o período de tempo em que ocorre a morte do animal. Também é realizada a quantificação do número de micobactérias (CFU- *Colony forming unit*) encontradas no pulmão do hospedeiro após a infecção inicial e a avaliação da resposta imune desencadeada, com a quantificação de mediadores inflamatórios e subpopulações celulares dos leucócitos recrutados para local da infecção (SMITH, 2003).

Estudos mostraram que camundongos infectados com baixas doses de Mkan são capazes de controlar a infecção e até mesmo eliminar o bacilo do organismo. Para o procedimento de infecção animal por Mkan é recomendada a utilização de altas doses de bactéria, variando de  $10^4$  (WANG *et al.*, 2015) a  $10^6$  CFU/mL (WIELAND *et al.*, 2006b).

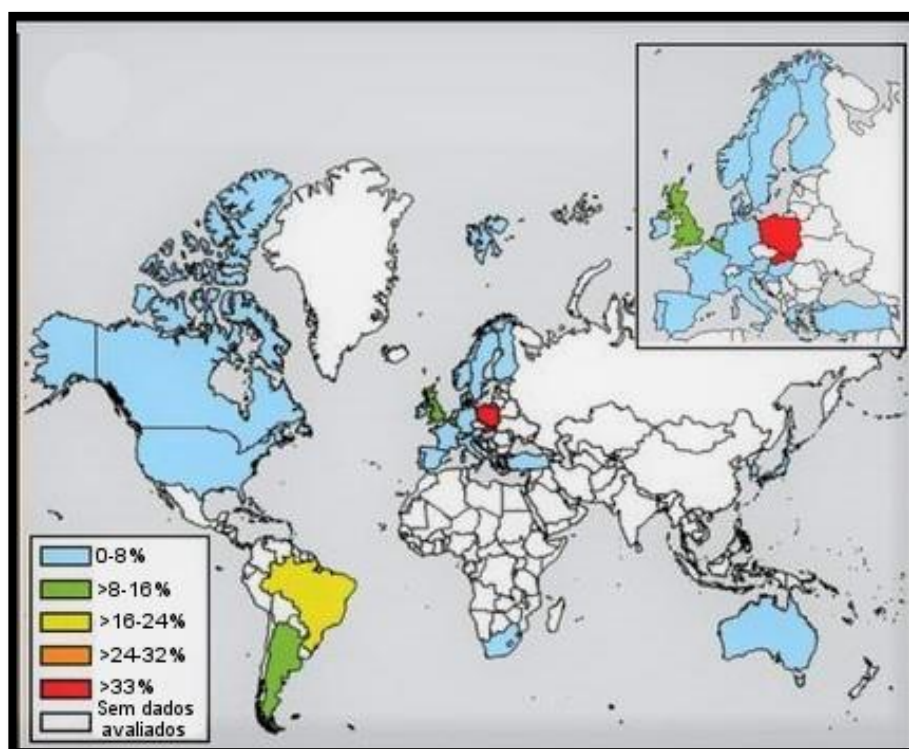
Embora estudos *in vivo* sejam considerados “padrão ouro”, estes demandam maior período de tempo e apresentam maior custo comparado aos estudos *in vitro*. Outro aspecto importante a ser considerado é o número de cepas a serem avaliadas e distinções relacionadas à compreensão da doença em humanos.

## 2. JUSTIFICATIVA

No mundo, *M. kansasii* é a micobactéria não tuberculosa (MNT) mais comum e com maior potencial patogênico entre as bactérias oportunistas, precedida apenas pelas bactérias do complexo *M. avium* (MAC). Pode causar infecções pulmonares com sinais clínicos da doença similar a TB, acometendo principalmente indivíduos imunocomprometidos, devido à baixa imunidade e pacientes que apresentam alterações das vias respiratórias (CHEN *et al.*, 2012).

No Brasil, existe alta prevalência de TB e os dados registrados sobre a prevalência de pacientes com doença pulmonar decorrente de infecção por MNTs não são precisos, evidenciando a dificuldade do diagnóstico diferencial da doença pulmonar proveniente de infecção por TB e MNT. Apesar desta limitação, nos últimos anos foram registrados no Brasil um aumento significativo de relatos de doenças pulmonares tendo como agente etiológico MNT (DA COSTA *et al.*, 2010).

Estudos contemporâneos realizados por DE MELLO *et al.* (2013) em pacientes no Estado do Rio de Janeiro, demonstraram que cepas de Mkan foram mais frequentes entre as MNT isoladas de pacientes (33,9%) com doença pulmonar, seguido pelas espécies do complexo *M. avium* (30,4%) e *M. abscessus* (13,2%). Em particular, Mkan apresentou proporção muito maior entre os isolados de MNT comparado aos dados obtidos em outras regiões no Brasil (LEITE *et al.*, 1995, MARTINS *et al.*, 2005) ou em outras partes do mundo, como nos Estados Unidos e na Austrália (PREVOTS *et al.*, 2010, CDC 2017).



**Figura 5 – Distribuição mundial de *Micobacterium kansasii* em amostras pulmonares em 2008.** (Adaptado de HOEFSLOOT *et al.*, 2013).

Estes dados sugerem um aumento na virulência das cepas de Mkan que circulam no Brasil e no Estado do Rio de Janeiro e demonstram a importância dos estudos de virulência destes isolados em comparação com as cepas (padrão) bem caracterizadas. Além disso, corrobora a importância em se determinar a relevância clínica dos isolados e o entendimento dos mecanismos de patogenia, possibilitando um melhor diagnóstico e tratamento dos pacientes.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Caracterizar cepas de *Mycobacterium kansasii* provenientes de isolados clínicos de pacientes brasileiros com transtorno respiratório, com relação à virulência micobacteriana e o caráter da resposta imune induzida pela micobactéria, utilizando modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a capacidade de crescimento dos diferentes isolados clínicos de *M. kansasii* em cultivo em meio líquido;
- Caracterizar os isolados clínicos de *M. kansasii* em modelo *in vitro* de infecção de macrófagos murinos, segundo a:
  - Capacidade de crescimento intracelular e a indução de morte celular na cultura infectada por estas cepas;
  - Capacidade de produção de citocinas pró e anti-inflamatórias pelos macrófagos infectados pelas cepas de *M. kansasii*;
- Determinar o perfil de virulência micobacteriana e avaliar o caráter da resposta imune anti-micobacteriana em um modelo de infecção intratraqueal *in vivo* através da:
  - Avaliação semanal do percentual de peso corporal dos animais;
  - Avaliação do crescimento micobacteriano pulmonar por quantificação de CFU;
  - Análise macroscópica e histológica pulmonar;

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. TESTES *IN VITRO***

#### **4.1.1. Cultura celular**

A linhagem murina de macrófagos peritoneais RAW 264.7, obtida da ATCC – *American Culture Collection* (VA, USA), foi cultivada em garrafas de 25 e 75 cm<sup>2</sup> (Corning), utilizando meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gentamicina (20 µg/mL) (Gibco/Invitrogen, NY, USA), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando em experimentação, as células RAW 264.7 (5x10<sup>5</sup> células/mL) foram plaqueadas em placa de 96 poços com DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, 24 h antes da infecção da cultura com as cepas de Mkan, e incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **4.1.2. Obtenção e preparo da cultura estoque e do cultivo micobacteriano**

Dez cepas de Mkan foram utilizadas no estudo: a cepa padrão ATCC 12478, e os isolados clínicos de pacientes (1580, 3657, 4404, 7439, 7287, 8835, 8837, 8839 e 10953), que foram genotipadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Philip Suffys do Instituto Oswaldo Cruz-RJ. As culturas micobacterianas estoque de Mkan foram mantidas em meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 (DIFCO, Detroit) suplementado com 10% de glicerol e 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase – BD BBL). Para o preparo da suspensão estoque, duas alçadas de colônias micobacterianas foram retiradas do meio sólido e colocadas em um tubo com tampa de rosca contendo esferas de plástico, e agitado no vórtex (Biomotic). Após a agitação, foi adicionado 1 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit) acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase - BD BBL) e agitado novamente no vortex. A partir desta suspensão, foram semeadas 3 alças de cultura para o meio sólido 7H10 fresco e alíquotas de 1 mL foram distribuídas em criotubos (10<sup>7</sup> a 10<sup>8</sup> bactérias/ml) e estocadas em freezer -70 °C.

A padronização e ajuste da concentração bacteriana utilizada nos experimentos foi realizada através da leitura prévia da densidade ótica (D.O) da

suspensão das culturas, a 600 nm, em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra s6), subtraindo-se a densidade óptica do meio de cultura 7H9 suplementado com glicerol e ADC. A diluição da suspensão bacteriana obedeceu ao critério de relação da densidade óptica *versus* número de bacilos. Após quantificação da D.O. da suspensão bacteriana, foi realizada a diluição para a D.O. 0,200 e plaqueamento em ágar Middlebrook 7H10 suplementado. Após 10 dias, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) para cada cepa e então obtida a relação entre CFU e D.O. 0,200, a qual foi utilizada para os experimentos posteriores.

#### **4.1.3. Avaliação do crescimento micobacteriano em meio líquido**

Todas as cepas de Mkan foram previamente descongeladas em meio 7H9 suplementado com glicerol e 10% de ADC, permanecendo cinco dias em suspensão. Após este período, a D.O. das cepas foi mensurado em espectrofotômetro a 600 nm, conforme descrito no item 4.1.2. O valor obtido foi ajustado para a D.O. 0,050 e disposto para um tubo contendo o volume total de 8 mL. As suspensões bacterianas de cada cepa foram incubadas na estufa a 37 °C e a densidade óptica mensurada a 600 nm, em dias alternados (dia 0, 2, 4, 6, 8 e 10) para cada cepa Mkan estudada.

#### **4.1.4. Infecção da cultura de macrófagos**

Macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  células/mL) em placas de 96 poços com meio DMEM-F12 sem antibiótico e suplementado com 10% SFB, 24 h antes da infecção micobacteriana. Após esse período, a suspensão de cada cepa foi agitada conforme item 4.1.2 e a densidade óptica ajustada para 0,200. A cultura de macrófagos foi infectada, separadamente, com cada cepa, em diferentes proporções de multiplicidade da infecção (MOI): 1:1 (bactéria/macrófago) para análise do crescimento micobacteriano; 10:1 para análise do perfil de citocinas pró e anti-inflamatórias secretadas pelos macrófagos infectados; 50:1 para avaliação da indução de morte celular provocada pela micobactéria. Pelo menos 8 poços foram utilizados para cada

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

#### **4.1.5. Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano**

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

#### **4.1.6. Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados por isolados clínicos de Mkan**

PARK *et al.* (2006) evidenciaram que a infecção de macrófagos por micobactérias patogênicas em altas doses de infecção (50 bactérias/macrófago) induz necrose nestas células. Para comparar a capacidade dos diferentes isolados de Mkan induzirem necrose nos macrófagos, as células foram infectadas na razão de MOI 50:1.

A cultura de macrófagos infectados foi mantida por um período de 4 dias. Nos dias 1, 2, 3 e 4 de infecção, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada através da utilização do corante azul de tripan. Este corante penetra somente nas células

mortas, corando-as de azul, o que possibilita a quantificação através de microscopia óptica (Microscópio invertido Nikon, 400x). O resultado obtido foi expresso em percentual de células azul de tripan positivas. A avaliação da capacidade de indução de morte celular também foi realizada na razão MOI 10:1 para aprofundar as informações obtidas nas infecções em altas doses e detalhar os intervalos de morte induzido por cada cepa testada.

Para isto, a liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) foi avaliada no sobrenadante de cultura infectada, utilizando o Kit comercial Labrax (GO, Brasil). O sobrenadante da cultura infectada na proporção de MOI 10:1 foi coletado em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3) de infecção, filtrado em filtro acetato de celulose de poro 0,22µm. Cinquenta microlitros do sobrenadante da cultura infectada por cada cepa no período de tempo mencionado, foram acrescidos de 100 µL da solução de alumen férrico e substrato, mantendo-se à 37°C por 3 min. Logo após, foram acrescentados 100 µL da solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e fenasina metasulfato, mantendo-se à 37°C por mais 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 492 nm (Dinatech MR5000). Para obtenção do percentual de inibição foi calculado o percentual de liberação de LDH =  $100 \times (\text{liberação LDH amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{máximo da liberação} - \text{liberação espontânea})$ . Como controle positivo, para o máximo de liberação de LDH (mínimo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos estimuladas, acrescidas de 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) e para a liberação espontânea de LDH (máximo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos somente acrescida do estímulo celular pela micobactéria.

#### **4.1.7. Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por isolados clínicos de Mkan**

Para quantificação dos mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados pelos isolados clínicos de Mkan, foi utilizada a cultura de macrófagos infectados na proporção de MOI 10:1 e os sobrenadantes coletados em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3). As citocinas presentes nos sobrenadantes foram quantificadas através do ensaio de ELISA



*sandwich*, utilizando os kits correspondentes (BD Biosciences, CA, USA) para TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, de acordo com o protocolo do fabricante.

O NO produzido no sobrenadante das culturas infectadas pelos isolados clínicos de Mkan foi quantificado através do método de Griess (ZHANG *et al.*, 2002). Cinquenta microlitros do sobrenadante da cultura foi acrescido de 50 $\mu$ L de reagente de Griess (*p*-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico (Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância, a 570 nm, foi medida em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em  $\mu$ M usando como referência uma curva padrão de nitrito de sódio (200  $\mu$ M a 1,56  $\mu$ M).

#### **4.1.8. Obtenção do *ranking* de virulência entre os isolados clínicos estudados**

Para obtenção do *ranking* de virulência entre a cepa padrão ATCC 12478 e os isolados clínicos avaliados, foram considerados dois parâmetros: 1) o crescimento intracelular da cepas Mkan em macrófagos RAW 264.7 e 2) a capacidade destas cepas induzirem morte celular nos macrófagos infectados. Neste último, foram considerados para os cálculos do *ranking*, a avaliação de morte celular através da contagem de células azul de tripan positivas (MOI 50:1) e o percentual de liberação de LDH (MOI 10:1).

Inicialmente, foram obtidas as médias de crescimento intracelular no dia 4 subtraído do dia 0, para cada cepa Mkan, e comparado ao da cepa ATCC padrão 12478 determinada com o valor 1.0. Posteriormente, foram obtidos os percentuais de indução de morte celular para cada cepa Mkan, através do teste de azul de tripan e do teste de LDH. Neste caso, foi realizada a média entre os valores percentuais obtidos para cada método e também comparado à cepa padrão como mencionado anteriormente. Por fim, foi realizada a média entre os valores relativos obtidos para cada cepa Mkan nos quesitos capacidade de crescimento intracelular e indução de morte celular.

#### 4.1.9. Modelo de estudo *in vitro*

A figura 6 mostra o fluxograma das atividades *in vitro*.

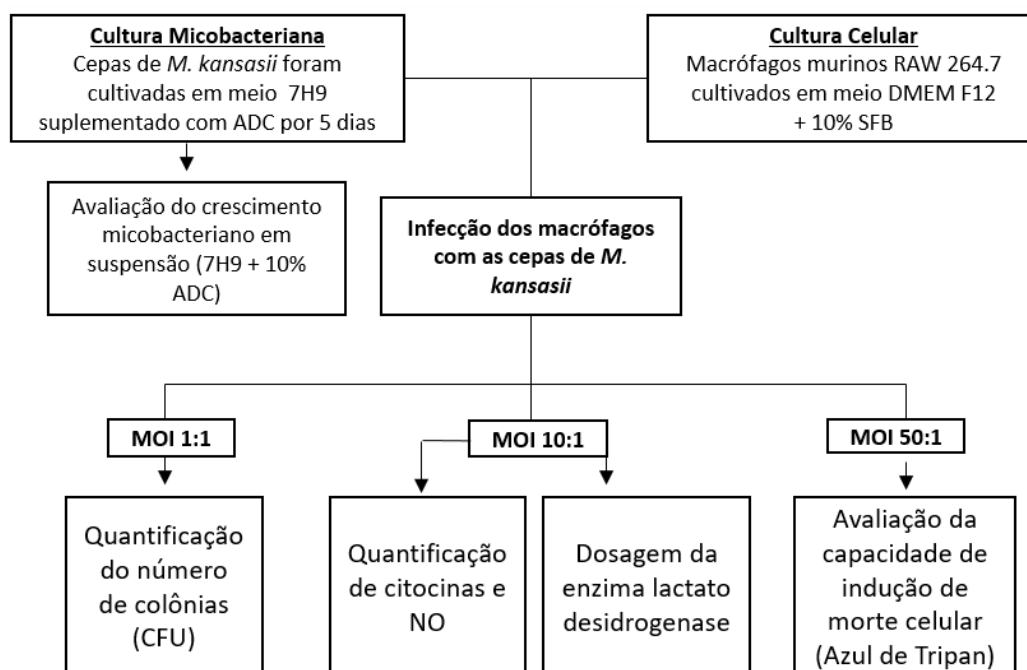


Figura 6 – Fluxograma da sequência experimental *in vitro*.

## 4.2. TESTES *IN VIVO*

### 4.2.1. Animais

Para a realização dos testes *in vivo* foram utilizados camundongos C57BL/6 livres de germes, com a idade entre 6 e 8 semanas, adquiridos do Biotério Central Thereza Liberman Kipnis da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF – Campos/RJ). Os animais foram infectados e mantidos em micro-isoladores, distribuídos organizadamente em estantes ventiladas no biotério de Biossegurança nível III do Laboratório de Biologia do Reconhecer (CBB/ UENF), sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elena Lassounskaia. O modelo de infecção dos camundongos foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal, CEUA, da UENF (protocolo nº 350 em 28/03/2017).

#### 4.2.2. Infecção experimental dos camundongos

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

Após a verificação da analgesia, os camundongos foram infectados com suspensão das cepas de Mkan ATCC 12478, 4404 e 8835, através de uma incisão transversal de 0,5 cm na pele da região do pescoço do animal para exposição da traqueia, onde foi injetado o volume de 60 µL ( $\sim 5 \times 10^4$  bacilos) entre os anéis cartilagosos mais proeminentes, com auxílio de uma seringa hipodérmica 0,3 mL (Terumo, SP, Brasil). Os animais controle receberam 60 µL de PBS estéril. Logo após a infecção intratraqueal (i.t.), a incisão foi suturada. Os animais infectados foram separados em quatro grupos com oito animais cada e supervisionados diariamente quanto aos sinais vitais e eutanasiados (inalação de CO<sub>2</sub>), se requerido, seguindo o protocolo de bioética animal, quando observado perda de peso, ausência de mobilidade e dificuldade de respiração, a fim de minimizar o sofrimento.

Após os períodos de 28, 40 e 60 dias, os animais foram sacrificados por exposição em câmara de CO<sub>2</sub> e os seguintes parâmetros averiguados: carga bacilar por meio do CFU no pulmão, alterações teciduais e celulares no pulmão (macropatologia e histopatologia), relação entre o peso dos pulmões e o número de células contabilizadas.

Durante todo o período experimental, os animais infectados para cada cepa, assim como os animais controle, foram pesados em balança de precisão e o percentual de peso corporal obtido. Foram observados diariamente sinais clínicos, como perda de peso, ausência de mobilidade e dificuldade de respiração nos animais infectados para minimização do sofrimento e quantificação do período de tempo no qual as cepas de Mkan infectantes conduziam ao desfecho da doença.

#### 4.2.3. Obtenção de células do pulmão e dos bacilos

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

Após este período, os órgãos imersos na solução de digestão foram dissociados utilizando seringas de 10mL por 10 ciclos de homogeneização e os homogenatos obtidos filtrados em *cell strainer* com poro de 40 µm (BD Bioscience, CA, USA). O homogenato isento de matriz tecidual foi destinado à quantificação micobacteriana através da diluição decimal seriada e plaqueamento meio sólido 7H10 suplementado. As placas foram lacradas e incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub> por 10 a 15 dias e o CFU quantificado. O restante do homogenato foi processado para obtenção de células. As hemácias foram removidas através da depleção com tampão de lise ACK (*Ammonium Chloride Potassium*) (0,144 M NH<sub>4</sub>Cl, 0,0169M TRIS base, pH 7,4) à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 4 min. A lise de hemácias foi interrompida com o acréscimo de PBS 1X suplementado com 10% SFB. Os tubos contendo homogenato pulmonar de cada animal foram centrifugados a 1200 rpm, por 5 min e o sobrenadante descartado. O pellet de células foi ressuspendido proporcionalmente em RPMI suplementado com 10% SFB e 20 µg/mL de gentamicina. As células foram quantificadas e plaqueadas em placas de 96 poços (5 x 10<sup>5</sup> células/mL). As placas com a cultura celular foram lacradas e incubadas por 48 h em estufa bacteriológica a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>). O sobrenadante da cultura *ex vivo* foi coletado para análises posteriores de quantificação de mediadores inflamatórios.

#### **4.2.4. Análise macroscópica e histológica dos pulmões**

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

O processamento histológico decorreu após a fixação do pulmão em formol 10% tamponado, e as seções foram lavadas com água destilada por 30 min e conduzidas por banhos crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 100%) por 1 h em cada concentração. Em seguida, as seções pulmonares passaram por dois banhos de xilol por 1 h cada. Ao final desse processo, foi realizado a inclusão em parafina por 30 min.

Após este procedimento de fixação e clarificação (Histotec), as peças emblocadas em parafina foram acondicionadas em gelo. Os blocos contendo as seções rígidas foram clivadas no micrótomo (Leica) numa espessura de 5 µm.

Os cortes foram banhados em duas baterias de xilol por 3 min cada e depois banhadas em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 min em cada concentração. Após foram coradas com hematoxilina por 3 min e eosina por 50 segundos. Logo após, foram banhadas novamente em álcool (100%, 90%, 80%, 70%) por 1 min em cada concentração e depois em xilol por 3 min. Em seguida, os cortes foram fixados permanentemente com Permount.

Para a coloração com a técnica de Ziehl-Neelsen, as lâminas lavadas foram imersas em solução aquecida de carboxifuscina por 30 min. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e tratada com álcool-ácido 1% até

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

As técnicas de coloração com HE e Ziehl Neelsen foram realizadas em colaboração com o prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Patologista Clínico do Laboratório de Sanidade Animal, do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

#### **4.2.5. Análises estatísticas**

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 4 (GraphPad, EUA) e as diferenças entre os grupos experimentais foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$  (5%). Os efeitos simultâneos de dois fatores foram analisados por ANOVA e pelo teste de Bonferroni One-way ANOVA e o teste de Tukey foram utilizados para avaliar os efeitos de um único parâmetro.

#### **4.2.6. Conduta de trabalho**

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

Após a realização dos experimentos, todo resíduo e material contaminado por Mkan foi coletado em sacos de autoclave dentro da cabine de biossegurança ou imersos em solução de hipoclorito de sódio 4%, e conduzidos para a descontaminação em autoclave a 121°C por 30 min.

#### 4.2.7. Modelo de pesquisa *in vivo*

A figura 4 mostra o fluxograma das atividades *in vivo*.

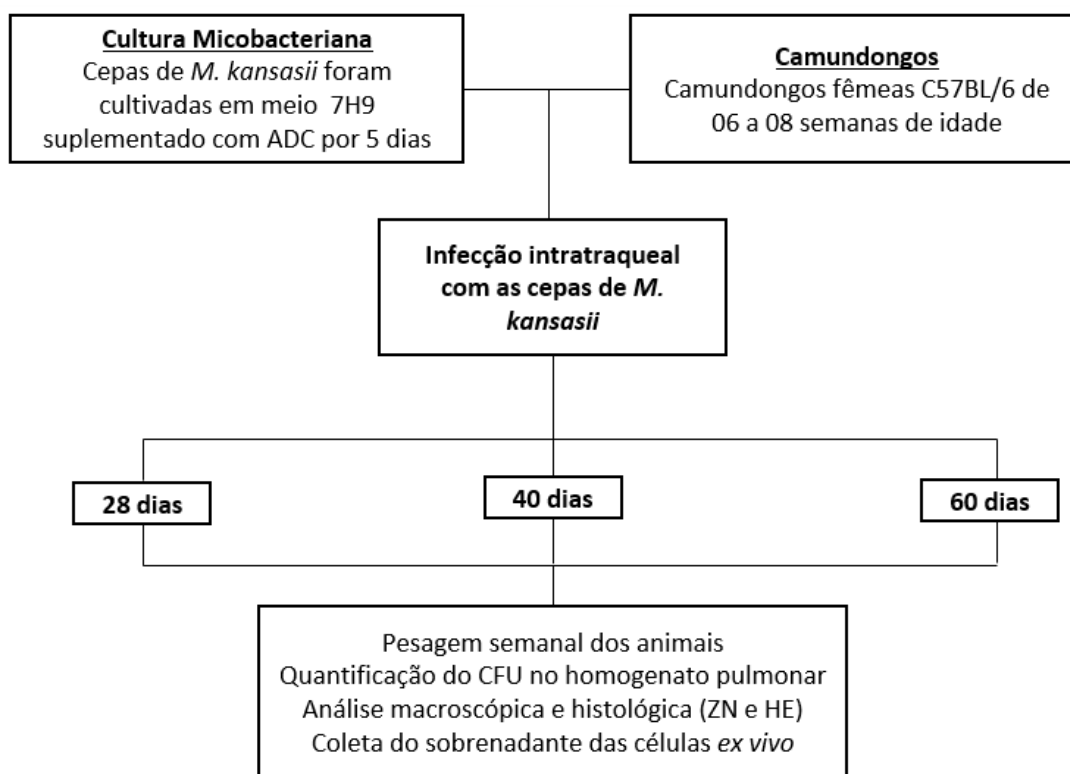


Figura 7 – Fluxograma da sequência experimental *in vivo*.

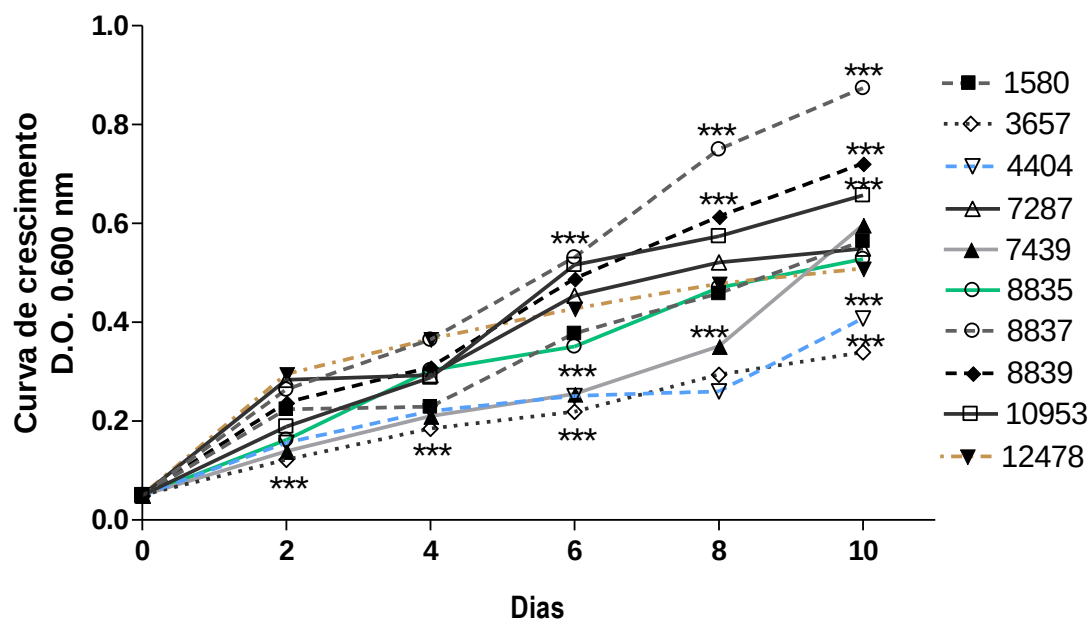
## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido

As bactérias foram cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com glicerol e 10% ADC para definir os perfis de crescimento de cada uma. O crescimento da população de bactérias foi monitorado durante 10 dias pela medida da densidade óptica de cultura medida pela espectrofotometria, utilizando o comprimento de onda de 600 nm ( $D.O._{600}$ ). As suspensões de todas as cepas bacterianas foram ajustadas à  $D.O.$  inicial de 0.050. Na **Figura 8**, podemos observar a curva de crescimento de cada uma das dez cepas. A  $D.O.$  da cultura da cepa padrão 12478 (ATCC) aumentou 10 vezes. Três cepas se destacaram crescendo significativamente mais rápido comparado com a cepa 12478 (cepas 8837, 8839 e 10953). Duas cepas cresceram menos que cepa 12478 (cepas 4404 e 3657).

A cepa 7287 cresceu menos que a cepa padrão apenas nos dias 6 e 8 de cultivo, no dia 10, ela equiparou o seu crescimento ao da cepa padrão. As demais cepas testadas tiveram o crescimento em 10 dias semelhante à cepa padrão.





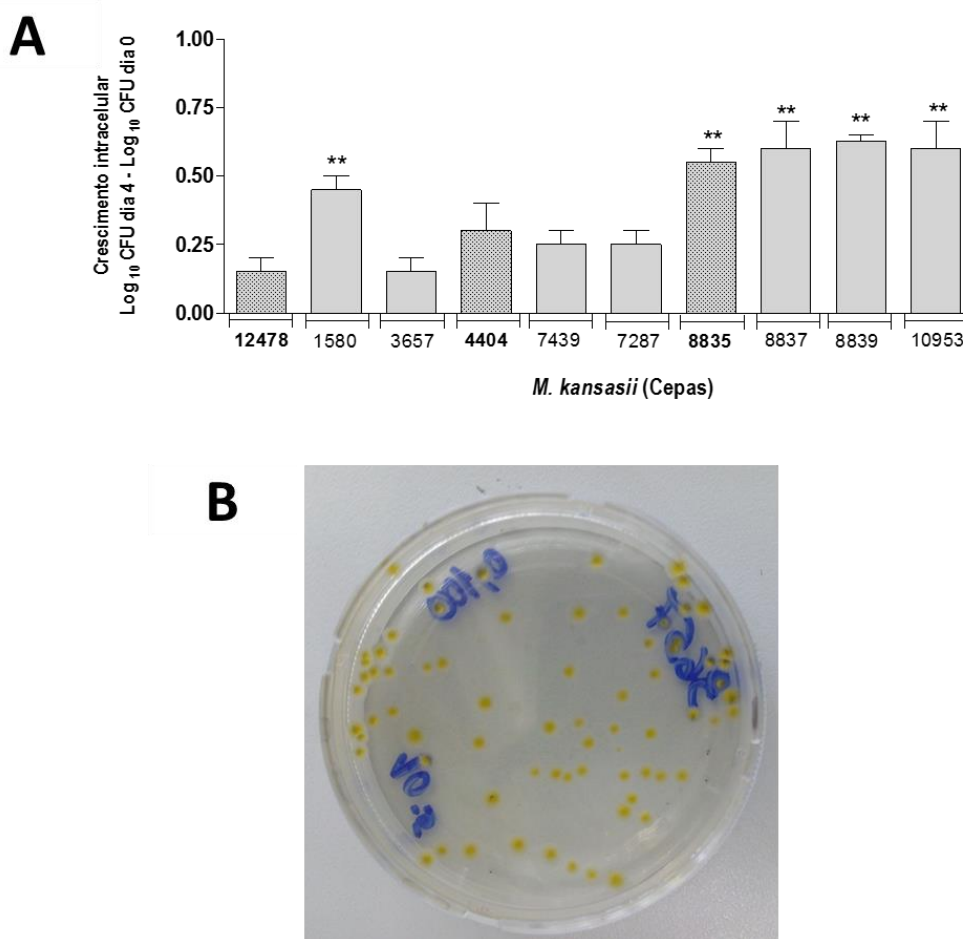
**Figura 8 – Avaliação do crescimento micobacteriano em meio Middlebrook 7H9.** As suspensões de dez cepas de *Mycobacterium kansasii* foram ajustadas em meio 7H9 a D.O. 0.050 e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Nos dias 2, 4, 6, 8 e 10, a densidade óptica da suspensão foi medida através de espectrofotometria, com comprimento de onda 600nm. Os valores foram reportados como média ± desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas, p < 0,001 (\*\*\*).

## 5.2. Avaliação do crescimento intracelular de Mkan em macrófagos infectados

Foi avaliado o crescimento intracelular de micobactérias em células RAW 264.7 (macrófagos murinos). Após a infecção das células por micobactéria, na proporção 1:1 (bactéria:macrófago), as culturas dos macrófagos foram lavadas 3 vezes, para eliminar as micobactérias não fagocitadas, e cultivadas por 4 dias a 37 °C. Para avaliar o crescimento intracelular da bactéria, as células foram lisadas no dia 0 e no dia 4 após infecção, e o número de bactérias foi determinado através do plaqueamento do lisado celular em meio sólido 7H10 (ensaio de CFU).

Após 10 dias de incubação, as colônias foram quantificadas (em CFU/mL) e os valores expressos em Log<sub>10</sub>. O crescimento intracelular de cada cepa foi expresso como média no aumento do número de bactérias intracelulares entre

o dia 0 e o dia 4 após infecção ( $\text{Log}_{10}\text{CFU dia 4} - \text{Log}_{10}\text{CFU dia 0}$ ), conforme mostrado na **Figura 9A**. O perfil de crescimento de bactéria no meio solido foi avaliado e demonstrado na **Figura 9B**.



**Figura 9 – Avaliação do crescimento de *M. kansasii* em macrófagos RAW 264.7 infectados (A) e no meio sólido 7H10 (B).** As células foram infectadas na proporção 1:1 e cultivadas por 4 dias. As células foram lisadas no dia 0 e 4 de infecção e depois plaqueadas em meio Middlebrook 7H10 (teste CFU). Após 10 dias de cultivo a 37° C, os números de colônias que cresceram em meio sólido foram quantificados e apresentados em  $\text{log}_{10}\text{CFU}$ , como a diferença entre os números de bactéria intracelular no dia 4 e no dia 0 de infecção (A). Os valores estão reportados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas,  $p < 0,01$  (\*\*). Perfil de crescimento de colônias de *M. kansasii* no meio 7H10 (B).

As cepas 1580, 8835, 8837, 8839 e 10953 mostraram maior capacidade da replicação intracelular quando comparadas à da cepa padrão ATCC 12478. Os resultados mostraram que quatro dessas cepas (cepas 8835, 8837, 8839 e 10953) cresceram três vezes mais que a cepa padrão testada.

O crescimento intracelular das cepas 3657, 4404, 7439 e 7287 foi similar à cepa padrão. Durante 4 dias de incubação, a população intracelular dessas cepas aumentou cerca de  $\log_{10}$  0,25.

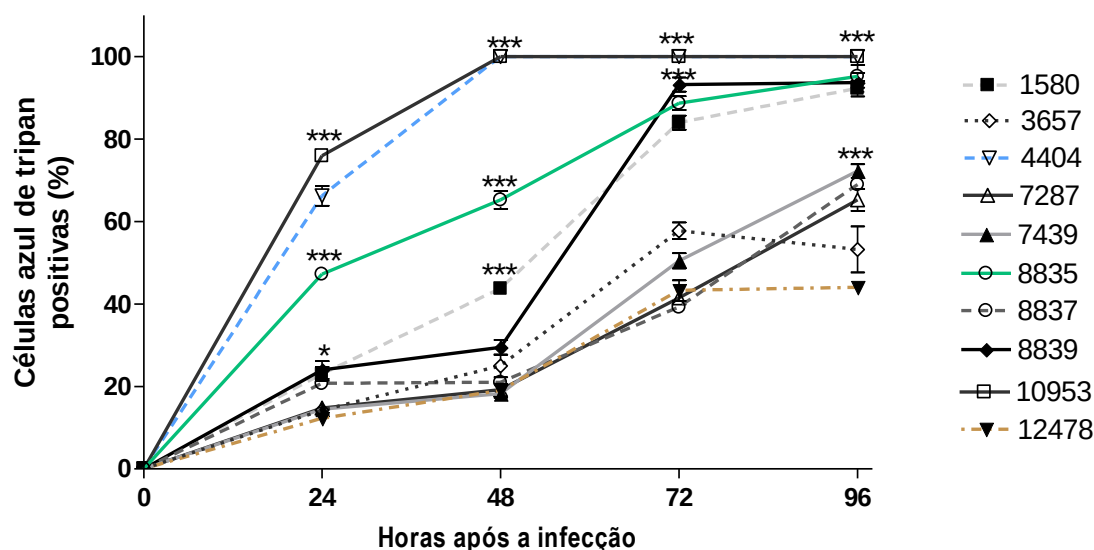
Todas as dez cepas testadas apresentaram o mesmo aspecto em suas colônias, sendo capazes de crescer em meio de cultura sólido em 10 dias de cultivo e apresentando coloração amarela quando expostas à luz, característica marcante das colônias de *M. kansasii*.

### **5.3. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de Mkan**

Para avaliar a capacidade da micobactéria induzir a morte celular dos macrófagos, as células RAW 264.7 foram infectadas com maior dose de infecção (MOI), na proporção 50:1 e 10:1. A morte dos macrófagos foi avaliada pelo método de coloração por azul de tripan e pelo método de liberação da enzima intracelular lactato desidrogenase (LDH).

O azul de tripan é um corante que penetra nas células que sofreram permeabilização da membrana celular, levando-as à necrose celular. Desta forma, as células coradas em azul estão mortas. As células que possuem a membrana intacta não são coradas por este corante (STROBER, 2015).

Para induzir à morte necrótica, os macrófagos foram infectados em alta dose de infecção, MOI 50:1 (50 bactérias/ 1 macrófago). Os resultados estão apresentados na **Figura 10**.



**Figura 10 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por *M. kansasii* na proporção 50:1 por meio do teste com azul de tripan.** As células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 96 h. O número das células mortas na cultura foi monitorado através do teste de coloração por azul de tripan. As células coradas em azul (mortas) e não coradas (vivas) foram contadas através de microscopia óptica e os resultados foram expressos em porcentagem das células mortas (azul de tripan-positivas). Os valores foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478 e as diferenças significativas estão indicadas,  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

As cepas 4404 e 10953 foram mais citotóxicas que as demais cepas, sendo que foram capazes de matar a maioria dos macrófagos em 48 h de infecção. Neste caso, grande número de bactérias foi liberado para o meio extracelular, devido a indução da necrose nos macrófagos em poucas horas de infecção.

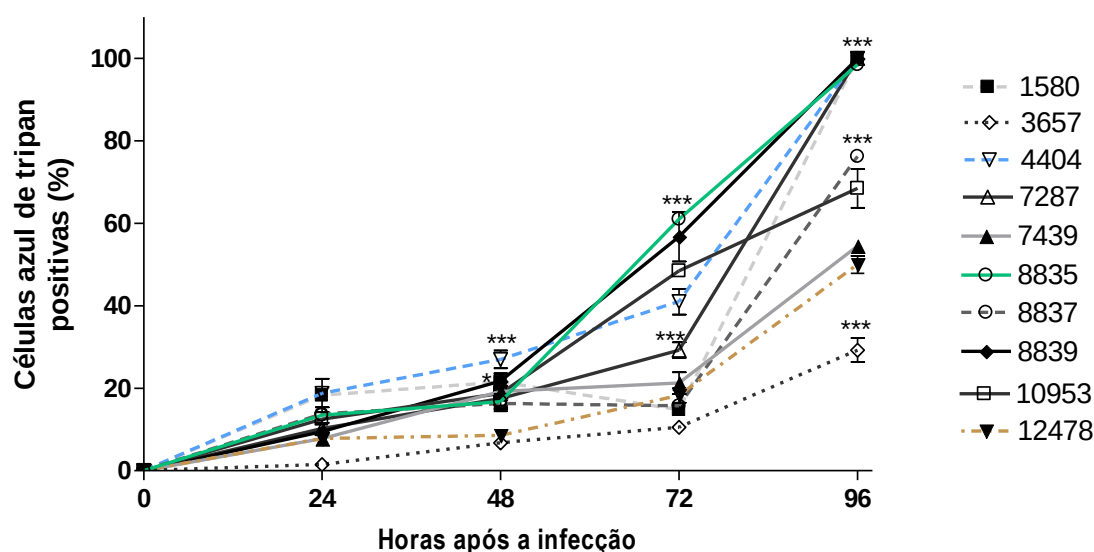
As cepas 1580, 8835 e 8839 foram capazes de matar 80% das células em 72 h, também demonstrando citotoxicidade elevada em comparação com as demais cepas. Menor taxa de morte celular foi observada nos macrófagos infectados pelas cepas 3657 e a cepa padrão 12478.

Como algumas cepas de *M. kansasii* induziram uma alta taxa de morte celular já em 48 h da infecção, decidimos reduzir a dose de infecção para 10:1 (10 bactérias / 1 macrófago) e repetir o ensaio (**Figura 11**).

Como esperado, a redução da taxa bacteriana foi associada ao aumento da sobrevivência dos macrófagos: 80% das células nas culturas infectadas estavam vivas até 48 h de infecção. As cepas 4404, 8839 e 10953 confirmaram

sua maior citotoxicidade, induzindo maior taxa de morte necrótica, em cerca de 40% das células, em 72 h de infecção.

As taxas de morte em culturas infectadas pelas cepas 1580, 8835 e 8837 também foram elevadas, sendo que essas cepas, junto com as cepas 4404, 8839 e 10953, foram responsáveis pela morte de 70-90% dos macrófagos no final do período de observação de 96 h. A cepa padrão 12478 ficou entre as menos citotóxicas, sendo capaz de induzir apenas a morte em aproximadamente 40% dos macrófagos após 96 h da infecção.



**Figura 11 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por *M. kansasii* na proporção 10:1 por meio do teste com azul de tripan.** As células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 96 h. A morte celular foi avaliada como apresentado na legenda da Figura 10.

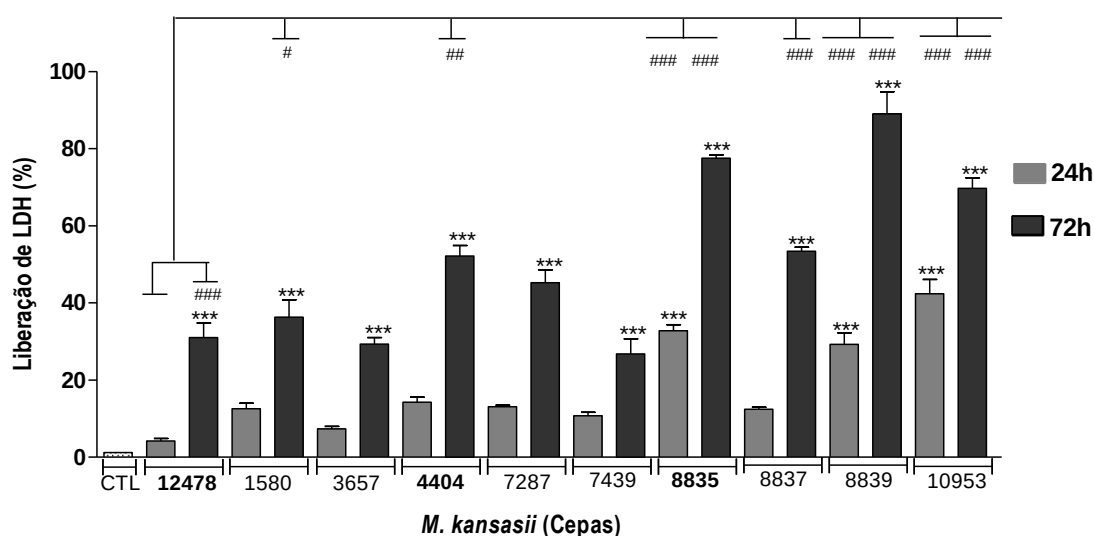
Além da contagem de células mortas coradas com azul de tripan, as culturas dos macrófagos infectados por cepas *M. kansasii* na proporção 10:1 foram submetidas à dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) presente no sobrenadante da cultura em 24 e 72 h de infecção (**Figura 12**). Os sobrenadantes das culturas dos macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo. Já como controle positivo, foi utilizado cultura de macrófagos estimulados acrescida de 1% (v/v) Triton X-100.

A LDH é uma enzima importante da rota metabólica celular que atua convertendo o ácido láctico em ácido pirúvico, levando à produção de ATP

(BALLS e CLOTHIER, 1992). Por se tratar de uma enzima intracelular, a sua presença no sobrenadante indica que ocorreu lise na membrana plasmática celular. Sendo assim, as cepas mais virulentas apresentam uma maior quantidade dessa enzima em seu sobrenadante, decorrente da maior indução de necrose nos macrófagos infectados.

As cepas 8835, 8839 e 10953 foram mais citotóxicas e somente essas cepas foram capazes de induzir a necrose dos macrófagos, que levou ao aumento considerável da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante de cultura, já em 24 h após infecção.

Após 72 h da infecção, os níveis de lactato desidrogenase no sobrenadante aumentaram em todas as culturas infectadas, sendo que os maiores valores foram observados em culturas infectadas pelas cepas 8835, 8839 e 10953, seguidas pelas cepas 4404 e 8837. A cepa padrão 12478 e as cepas 7439 e 3657 foram as menos citotóxicas, confirmando os resultados da avaliação de citotoxicidade obtidos no primeiro teste (teste de exclusão de azul de tripan).



**Figura 12 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados por *M. kansasii* na proporção 10:1 por meio do teste de LDH.** As células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 24 e 72 h. O número das células mortas na cultura foi monitorado através do teste de LDH. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 490 nm. Os valores foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas,  $p < 0,05$  (#) e  $p < 0,001$  (###), ou com o valor obtido em cultura das células de controle, não infectados,  $p < 0,001$  (\*\*\*).

#### 5.4. Avaliação da produção de citocinas e mediadores inflamatórios pelos macrófagos infectados com diferentes cepas de *Mkan*

Foi quantificada a produção de três citocinas importantes para a inflamação e indução da resposta imune protetora, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , que são citocinas pró-inflamatórias, e IL-10, que é anti-inflamatória. A dosagem dessas citocinas é importante para definir o caráter da resposta inicial dos macrófagos às micobactérias.

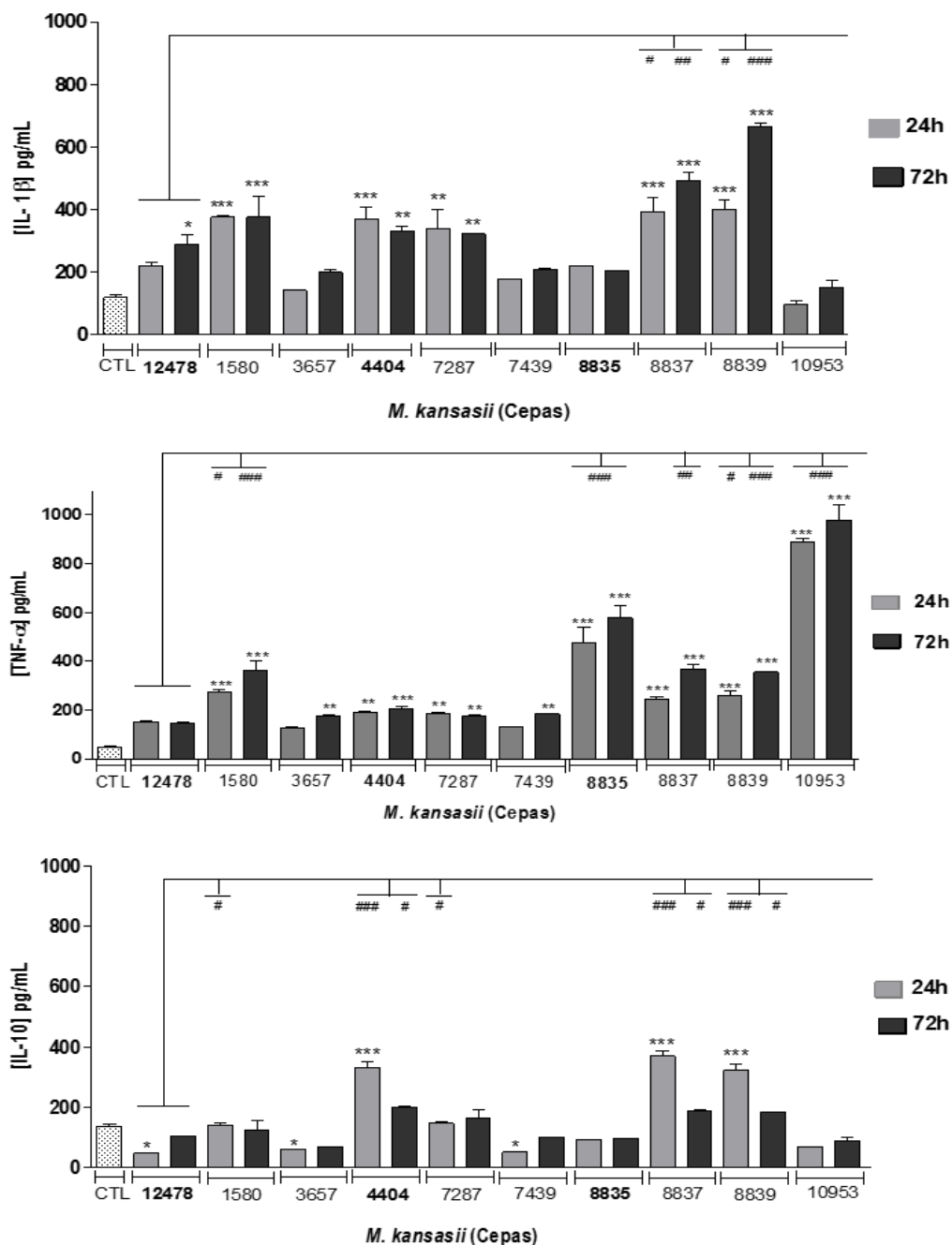
Para análise, o sobrenadante das culturas de macrófagos infectados foram coletados em 24 e 72 h de infecção, congelados e armazenados a -70° C até a utilização. Após o descongelamento, as amostras foram submetidas ao ensaio de ELISA *sandwich* para dosagem de cada uma dessas citocinas (**Figura 13**).

Ao analisarmos a produção de IL-1 $\beta$  podemos perceber que nem todas as cepas foram capazes de induzir a secreção dessa citocina pelos macrófagos. Das dez cepas analisadas, seis induziram IL-1 $\beta$  (cepa padrão 12478 e cepas 1580, 4404, 7287, 8837, 8839) e quatro cepas (3657, 7439, 8835 e 10953) não induziram. Os maiores produtores foram macrófagos infectados pelas cepas 8837 e 8839, que produziram significativamente mais IL-1 $\beta$  em comparação com macrófagos infectados pela cepa padrão.

Todas as cepas *M. kansasii* foram capazes de induzir a citocina TNF- $\alpha$  pelos macrófagos. Entretanto, a cepa padrão 12478 induziu baixo nível da produção, que foi menor entre todas as cepas testadas. O aumento da quantidade de TNF- $\alpha$  no sobrenadante da cultura infectada pela cepa 12478, não foi significativo em comparação com o sobrenadante das células RAW 264.7 não infectadas, que também produziram baixa quantidade dessa citocina. Maiores níveis de produção de TNF- $\alpha$  foram observados nas cepas 10953, 8835 e 1580, que foram 7, 4 e 2,5 vezes maior, respectivamente, em comparação com a quantidade dessa citocina produzida na cultura infectada pela cepa 12478 após 72 h de infecção.

A produção de IL-10 nas células infectadas por *M. kansasii* foi baixa. Apenas as cepas 4404, 8837 e 8839 foram capazes de induzir sua produção, que foi cerca de duas vezes maior em comparação com as culturas não

infectadas. A produção da IL-10 foi temporária, sendo observada diminuição em 72 h, em relação ao valor obtido em 24 h.

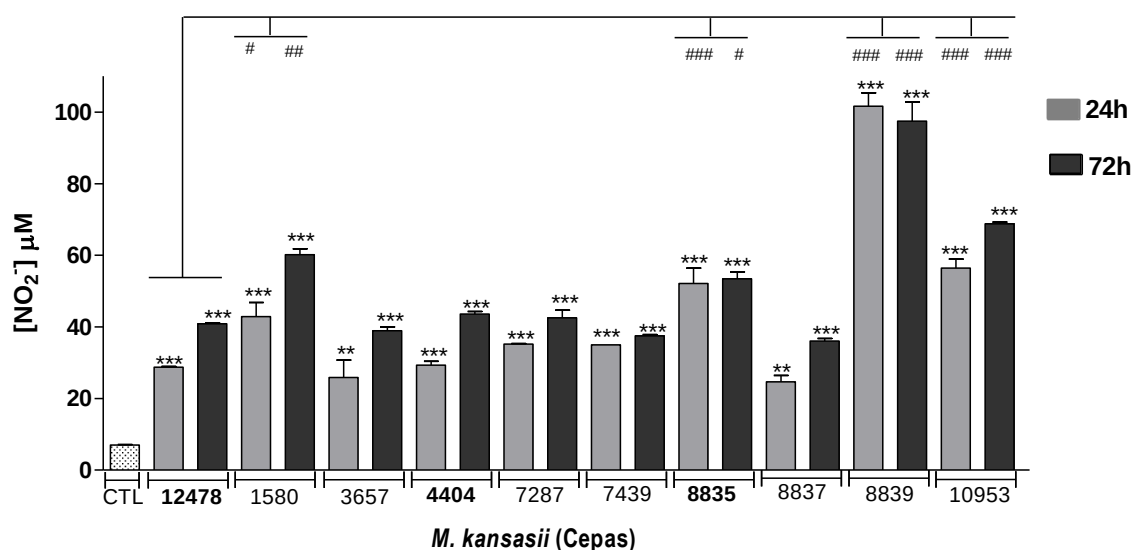


**Figura 13 – Análise da produção de citocinas pelos macrófagos RAW 264.7 infectados pelas cepas de *M. kansasii* na proporção 10:1.** Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação de citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10) através de ELISA *sandwich* utilizando kits específicos. Os macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas,  $p < 0,05$  (#) e  $p < 0,001$  (###), ou com o valor obtido em cultura das células de controle, não infectados,  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,001$  (\*\*).



Além das citocinas, outro mediador inflamatório avaliado em cultura dos macrófagos infectados foi o óxido nítrico (NO).

A **Figura 14** demonstra que todas as cepas foram capazes de induzir a produção de NO, dentre elas, as cepas 1580, 8835, 8839 e 10953 foram as que apresentaram maior nível de produção de NO. A cepa 8839 foi que induziu a maior produção de NO, cerca de 100  $\mu$ M de nitrito. Já comparando com o nível da produção induzida pela cepa padrão 12478, apenas quatro cepas (1580, 8835, 8839 e 10953) induziram maiores quantidade de NO.



**Figura 14 – Análise da produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por cepas de *M. kansasii* na proporção 10:1.** Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação de NO através da reação de Griess, que estima a produção de NO indiretamente medindo as concentrações de nitrito. Os macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em  $\mu\text{M}$  usando como referência uma curva de nitrito de sódio, decrescida do valor obtido com os aditivos sem células. Os valores foram calculados e depois reportados como média  $\pm$  desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão 12478, e as diferenças significativas estão indicadas,  $p < 0,05$  (#),  $p < 0,01$  (##) e  $p < 0,001$  (###), ou com o valor obtido em cultura das células de controle, não infectados,  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*).

### 5.5. Quantificação da taxa de virulência relativa das cepas Mkan avaliadas em testes *in vitro*

Para comparar o grau de virulência das cepas estudadas, nós analisamos os dados referentes às duas principais propriedades associadas à virulência de micobactéria: 1) a capacidade de replicação em macrófagos e 2) indução da morte necrótica nas células infectadas, que foram apresentados nos itens 5.2 e 5.3.

Os valores referentes ao crescimento dos isolados clínicos de *M. kansasii* em macrófagos quantificados como diferença entre  $\log_{10}$  CFU dia 4 e  $\log_{10}$  CFU dia 0 (**Figura 9A**) foram comparados com o respectivo valor referente a cepa padrão 12478, e uma taxa relativa de crescimento de cada isolado em relação da taxa do crescimento da cepa 12478 (estabelecida como 1.0) foi calculada em proporção e nomeada taxa A (taxa de crescimento intracelular do isolado).

Dos dois valores referentes à indução da morte necrótica nos macrófagos infectados por *M. kansasii*, a porcentagem de células azul tripan-positivas em cultura dos macrófagos infectados na proporção 50:1, 72 h pós infecção (**Figura 10**) e a liberação de LDH na cultura dos macrófagos infectados na proporção 10:1, 72 h pós infecção (**Figura 12**), foram comparados com os respectivos valores referentes à cepa padrão 12478, e as taxas relativas de citotoxicidade dos isolados em relação à citotoxicidade da cepa 12478 (estabelecidos como 1.0) foram calculadas em proporção. A média dessas duas taxas foi quantificada para cada isolado, e o valor obtido foi nomeado taxa B (taxa de citotoxicidade do isolado).

A taxa de virulência relativa foi quantificada como a média de taxas A e B ( $\text{taxa A} + \text{taxa B} / 2$ ) e os resultados são apresentados na **Tabela 1**.

**Tabela 1. Avaliação da taxa de virulência das cepas de *Mycobacterium kansasii*, isoladas dos pacientes com doença pulmonar, em relação da cepa padrão 12478 (ATCC), em testes de infecção dos macrófagos RAW 264.7 *in vitro*.**

| Cepa              | Taxa A<br>(capacidade de crescimento intracelular de micobactéria nos macrófagos) | Taxa B<br>(capacidade de micobactéria de induzir a morte necrótica nos macrófagos) | Taxa de Virulência dos isolados de micobactéria<br>(taxa A + taxa B / 2) | Ranking de virulência* |
|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| Cepa padrão 12478 | 1,0                                                                               | 1,0                                                                                | 1,0                                                                      | 10                     |
| 1580              | 2,25                                                                              | 1,89                                                                               | 2,07                                                                     | 5                      |
| 3657              | 1,0                                                                               | 1,20                                                                               | 1,10                                                                     | 9                      |
| 4404              | 1,5                                                                               | 2,27                                                                               | 1,89                                                                     | 6                      |
| 7287              | 1,25                                                                              | 1,23                                                                               | 1,24                                                                     | 7                      |
| 7439              | 1,25                                                                              | 0,98                                                                               | 1,12                                                                     | 8                      |
| 8835              | 2,75                                                                              | 2,52                                                                               | 2,64                                                                     | 3                      |
| 8837              | 3,0                                                                               | 1,76                                                                               | 2,38                                                                     | 4                      |
| 8839              | 3,25                                                                              | 2,63                                                                               | 2,94                                                                     | 1                      |
| 10953             | 3,0                                                                               | 2,6                                                                                | 2,80                                                                     | 2                      |

\*As cepas de grau de virulência elevado estão marcadas na cor cinza escuro, de grau intermediário- na cor cinza claro, e de virulência baixa- em branco.

Os resultados demonstram que o grau de virulência da cepa padrão 12478 pode ser considerado baixo, sendo que a virulência da maioria dos isolados clínicos foi maior. Quatro isolados clínicos (cepas 8839, 10953, 8835 e 8837) apresentaram grau de virulência elevado, apresentando uma taxa de virulência média cerca de 2.5 vezes maior que a virulência da cepa padrão. A virulência de dois isolados (cepas 3657 e 7439) foi baixa, similar à cepa padrão. As cepas 1580, 4404 e 7287 apresentaram grau de virulência intermediário.

Estes dados foram obtidos em experimentos de infecção dos macrófagos por micobactérias *in vitro*. Este modelo reproduz apenas o que seria a fase inicial da infecção *in vivo* e não permite avaliar o comportamento de bactéria frente à resposta imune adquirida, bem como outros fatores de defesa do organismo hospedeiro que também são importantes para avaliação de virulência.

Para validar o ranking de virulência estabelecido no modelo de infecção *in vitro*, nós verificamos virulência de alguns isolados em testes *in vivo*, utilizando o modelo de infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6 estabelecido no nosso laboratório (AMARAL *et al*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2014). Para testes *in*

vivo foram selecionadas três cepas: com grau de virulência elevado (cepa 8835), intermediário (cepa 4404) e baixo (cepa padrão 12478).

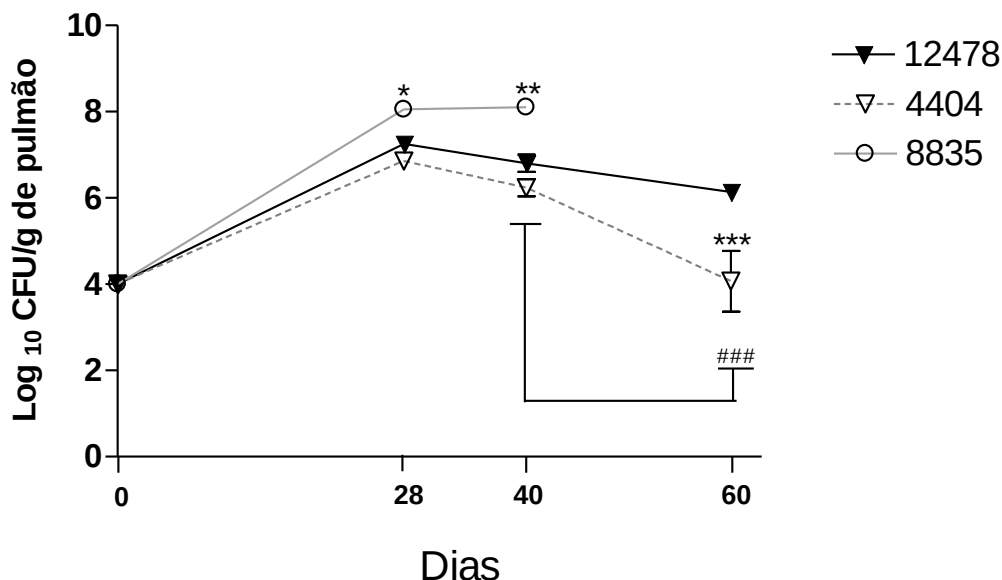
#### **5.6. Avaliação do crescimento de Mkan nos pulmões de camundongos infectados**

Para avaliar a replicação de micobactérias *in vivo*, nos pulmões dos camundongos infectados, nós realizamos infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6 utilizando uma dose elevada de bactéria. Foi realizado o ensaio de CFU, em que os camundongos foram sacrificados, o pulmão macerado e plaqueado em meio sólido para contagem das colônias.

Na **figura 15**, podemos ver que em 28 e 40 dias de infecção as cepas 12478 e 4404 não apresentaram diferença no CFU, indicando que o número de bactérias no pulmão não se alterou. Já ao compararmos a cepa de referência ATCC 12478 com a cepa 8835, podemos verificar um aumento significativo do número de bactérias nos camundongos infectados com a cepa 8835, mostrando que essa cepa teve maior capacidade de “driblar” o sistema imune e se multiplicar nos pulmões.

Quando comparamos a cepa de referência com a cepa 4404, em 60 dias de infecção, podemos perceber que a cepa 4404 teve diminuição significativa do número de bactérias, evidenciando sua menor capacidade de crescimento *in vivo* e o estado de cronicidade da doença. Esse estado de cronicidade apresentado em camundongos infectados pela cepa 4404 pode ser visualizado na **Figura 15** através da diminuição significativa de bactérias no pulmão do dia 40 para o dia 60 de infecção.

Com relação a cepa 8835, não foi possível analisar o número de bactérias presentes nos pulmões em 60 dias de infecção devido ao fato de nenhum animal infectado com essa cepa ter conseguido sobreviver até o sexagésimo dia de infecção.



**Figura 15 – Crescimento de bactérias no pulmão de animais infectados com cepas de *M. kansasii* em 28, 40 e 60 dias de infecção.** Camundongos C57Bl/6 foram infectados intratraquealmente com  $5.10^4$  CFU/camundongo (12 animais por cada grupo de cepas) e a carga bacteriana no pulmão foi avaliada em 28, 40 e 60 dias de infecção (3 animais por ponto) através do ensaio de CFU. Experimentos foram repetidos 3 vezes. A carga bacteriana foi quantificada em Log<sub>10</sub> do número de CFUs/g de pulmão. Os valores foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e os grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*), comparando os grupos infectados com a cepa de referência ATCC 12478 e com  $p < 0,001$  (###) para mostrar a diferença de crescimento da cepa 4404 em diferentes dia de infecção.

## 5.7. Patologia dos pulmões de camundongos infectados com cepas de Mkan

Para avaliar a progressão da patologia induzida por cepas de *M. kansasii*, foi realizada a análise da patologia pulmonar dos animais infectados. Os camundongos foram infectados na dose  $5.10^4$  CFU/animal por via intratraqueal.

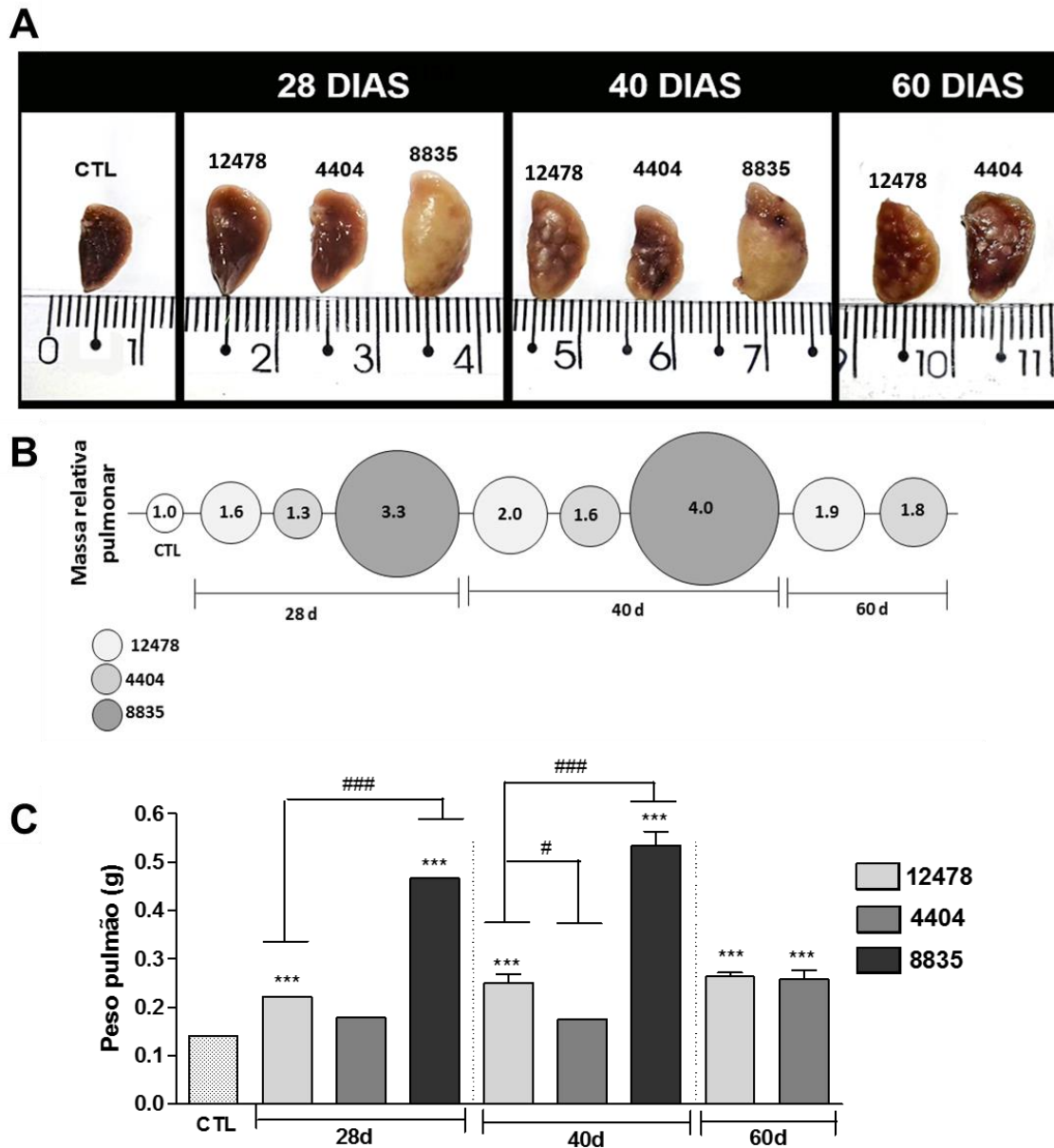
Os animais foram abertos em três momentos distintos (28, 40 e 60 dias) para avaliar o grau da patologia induzida. Foi fotografado o lóbulo pulmonar direito representativo de cada dia de abertura, para comparação da macropatologia induzida (**Figura 16A**). A massa relativa de cada órgão (**Figura 16B**) foi calculada em relação ao peso em gramas (**Figura 16C**) do pulmão do animal controle.

Na **Figura 16A**, podemos observar que os pulmões dos animais infectados aumentaram consideravelmente de tamanho se comparado ao pulmão do grupo controle (não infectado). Macroscopicamente, os pulmões dos animais infectados apresentaram grandes lesões inflamatórias, onde pode-se observar a presença de nódulos difusos com coloração esbranquiçada de diferentes tamanhos, característicos de granulomas. A cepa 8835, de maior virulência, causou maior dano no pulmão devido ao grande infiltrado celular gerado, o que fez com que o seu tamanho ficasse maior do que os outros pulmões infectados com outras cepas.

Esse resultado associa-se com o aumento do peso e da massa relativa pulmonar observado no dia 28 de infecção, que foi 3,3 vezes maior que nos animais controles (**Figuras 16B e C**). No quadragésimo dia de infecção, o peso e a massa relativa pulmonar dos animais infectados tiveram um leve aumento (**Figuras 16 B e C**). Já no sexagésimo dia de infecção, o peso e a massa relativa dos pulmões dos animais infectados pelas cepas 12478 e 4404 não teve muita variação, indicando o estado crônico da doença (**Figuras 16 B e C**).

Somente os animais infectados pelas cepas ATCC 12478 e 4404 conseguiram sobreviver até o sexagésimo dia de infecção, já os animais infectados com a cepa 8835 tiveram que ser sacrificados com quarenta dias de infecção devido à fragilidade dos animais.

Ao compararmos a cepa 8835, que é a mais virulenta, com o controle (animais não infectados) e a cepa de referência ATCC 12478, podemos observar que além desta induzir macroscopicamente maior lesão pulmonar que as demais cepas, o peso e a massa relativa pulmonar nos animais infectados por esta cepa foi significativamente maior que a do grupo controle e da cepa de referência ( $p < 0,001$ ).



**Figura 16 – Patologia pulmonar induzida em pulmões de camundongos C57BL/6 infectados por *M. kansasii*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente na dose  $5.10^4$  CFU/animal. Dois animais de cada grupo foram abertos em 28, 40 e 60 dias para análise da patologia. A macropatologia pulmonar foi avaliada qualitativamente através da imagem do lóbulo direito pulmonar fotografado em um animal representativo de cada grupo experimental (A) e pelo peso pulmonar aferido em balança de precisão expresso em gramas (C). A massa relativa pulmonar foi determinada através da razão entre a média do peso pulmonar dos animais de cada grupo pela média do peso pulmonar dos animais controles (B). Os valores foram calculados e depois reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e os grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*) para o grupo controle (CTL) e com  $p < 0,001$  (###) e  $p < 0,05$  (#) para a comparação com a cepa padrão ATCC 12478.

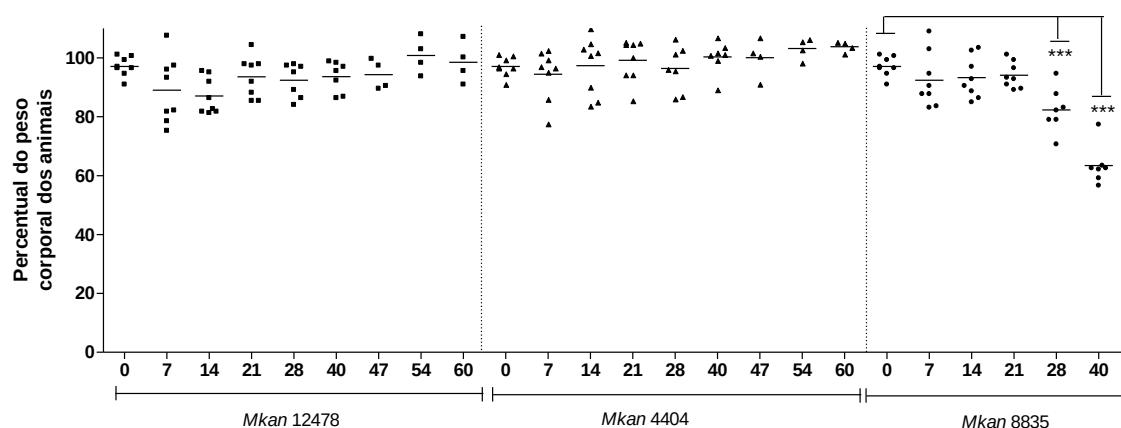
Além de analisar a patologia induzida no pulmão de camundongos C57Bl/6 infectados com as cepas de *M. kansasii* verificando a lesão causada nos pulmões, formação de granuloma e infiltrado celular, também foi analisada a morbidade dos animais através da cinética do peso corporal dos animais infectados (**Figura 17**).

Ao analisarmos o percentual do peso corporal de animais infectados em relação ao seu peso corporal inicial podemos perceber que não houve diferença significativa de peso dos animais infectados com as cepas 12478 e 4404.

Os animais infectados com as cepas 12478 e 4404 mantiveram o seu peso durante os 60 dias de infecção. Além disso, os animais infectados com essas duas cepas não vieram a óbito, sendo que ao sexágésimo dia de infecção, os camundongos estavam com suas funções motoras e comportamentais normais.

Já os camundongos infectados com a cepa 8835, tiveram perda de peso significativamente maior que os demais. Ao quadragésimo dia de infecção, os camundongos infectados por essa cepa perderam um terço de seu peso. Além disso, mudança comportamental. Devido ao quadro clínico e patológico induzido pela cepa 8835, os animais não conseguiram sobreviver até o sexagésimo dia de infecção, tendo que ser sacrificados no quadragésimo dia de infecção, o que evidenciou uma maior virulência dessa cepa.





**Figura 17 - Morbidade de camundongos C57BL/6 inoculados com cepas de *M. kansasii*.** Camundongos C57BL/6 foram infectados intratraquealmente na dose  $5.10^4$  CFU/animal. Os animais infectados foram pesados em balança de precisão em diferentes semanas de infecção (1°, 2°, 3°, 4°, 5°, 6°, 7° e 8° semanas) para verificar a cinética da alteração do peso corporal de camundongos após a infecção, sendo que a perda de peso foi usada como um indicador de morbilidade. Os dados foram apresentados como a percentagem do peso corporal inicial de cada animal antes da infecção. Os valores foram reportados como média  $\pm$  desvio padrão, e os grupos diferentes foram considerados significantes de acordo com  $p < 0,001$  (\*\*\*),  $p < 0,01$  (\*\*) e  $p < 0,05$  (\*).

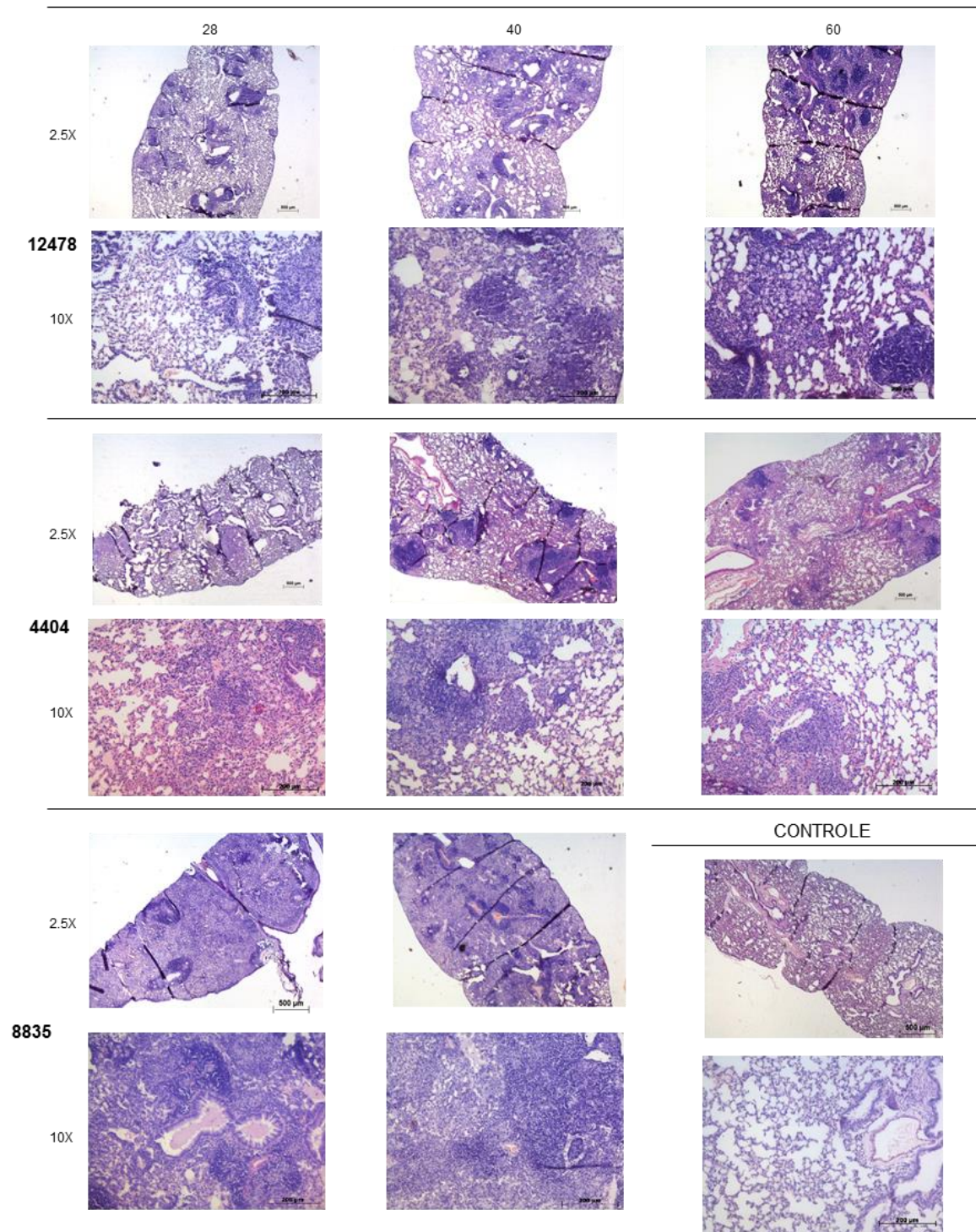
## 5.8. Avaliação da histopatologia do pulmão de animais infectados com cepas de Mkan

Para avaliar a histopatologia induzida por cepas de *M. kansasii* nos pulmões dos animais infectados, foram realizadas sessões dos pulmões que foram coradas por hematoxilina-eosina (HE) e Ziehl-Nielsen (ZN). O grupo controle foi constituído por animais não infectados.

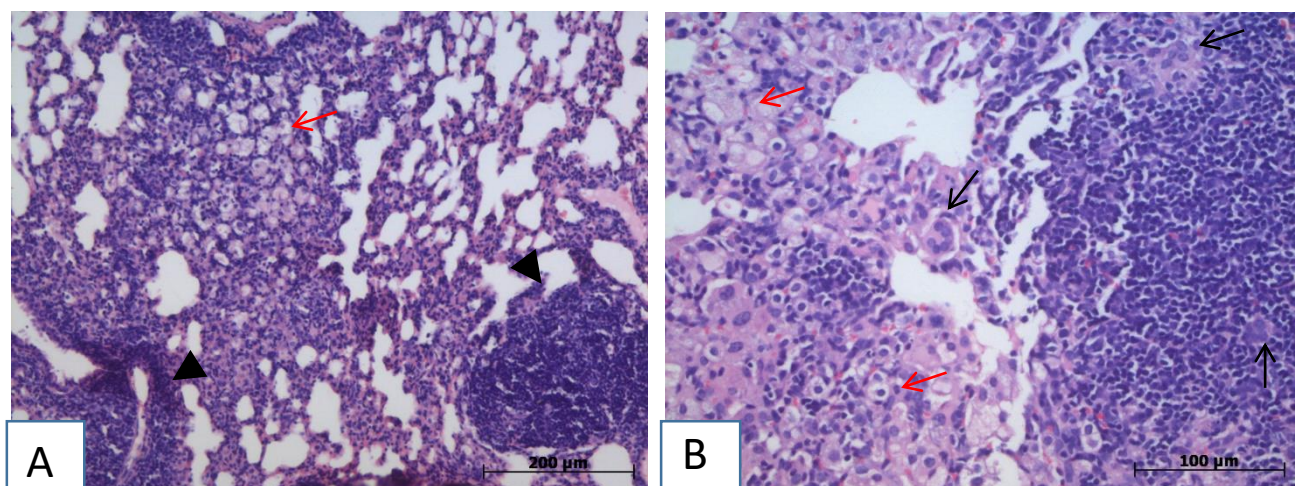
A cepa 8835, comparada com as demais cepas utilizadas, foi a que mais induziu patologia. Os pulmões dos animais infectados com a cepa 8835 apresentaram formação de infiltrado celular granulomatoso difuso, que tomava maior parte do parênquima pulmonar já no vigésimo oitavo dia de infecção, aumentando ainda mais no dia 40, o que pode ser observado nas imagens obtidas utilizando objetiva 2.5x (**Figura 18**). O infiltrado foi composto principalmente por macrófagos e linfócitos, sendo que os compactos conglomerados dos linfócitos foram vistos ao redor dos vasos e bronquíolos. As vias aéreas destes animais foram parcialmente obstruídas pelo exsudato seroso ou celular (**Figura 18**). Após 40 dias da infecção, os animais do grupo infectado

com cepa 8835 apresentaram características de estado moribundo e foram eutanasiados. Já as cepas 12478 e 4404 induziram formação dos granulomas compostos por macrófagos e linfócitos, que foram observados ao redor dos vasos e bronquíolos (**Figura 18**). Em todos os dias de observação, os animais infectados pela cepa 12478 apresentaram um número de granulomas aparentemente maior que nos animais infectados pela cepa 4404, e o tamanho dos granulomas cresceu no período entre dias 28 e 60. No dia 60 de infecção, foi observado aumento das áreas compostas pelos macrófagos espumosos, como resultado do acúmulo dos lipídeos nos vacúolos dessas células (**Figura 18** e **Figura 19**). Foram observadas também as células gigantes (macrófagos multinucleares) e os granulomas secundários, compactos e bem definidos, compostos por linfócitos (**Figura 19**).

## DIAS APÓS INFECÇÃO



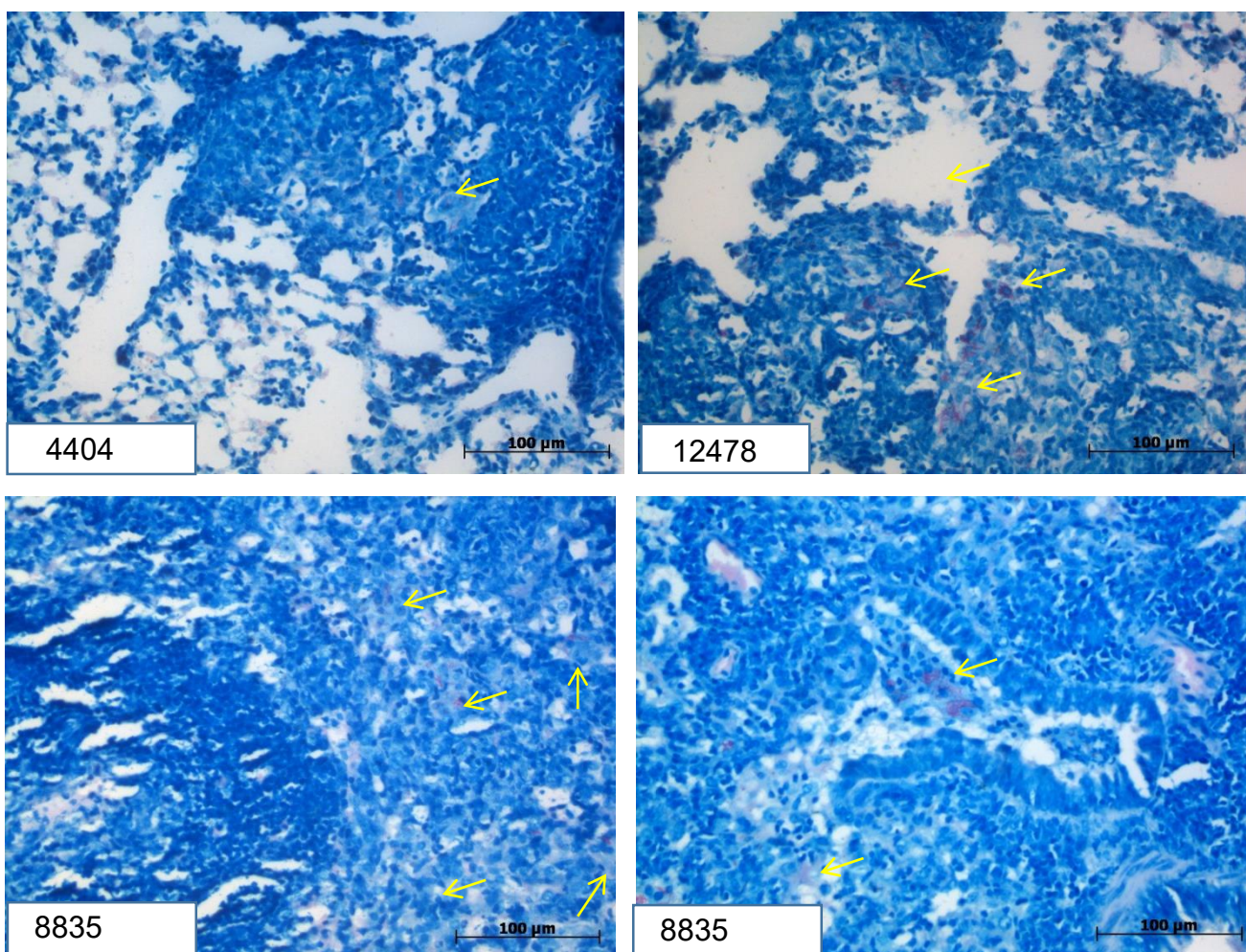
**Figura 18 - Histopatologia do pulmão de camundongos C57BL/6 infectados por *M. kansasii*.** O tecido do lóbulo superior do pulmão esquerdo de camundongos foi processado para análises histológicas em 28, 40 e 60 dias de infecção. O grupo controle foi formado por camundongos não infectados. As lâminas foram coradas com HE) e as imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan (Zeiss) por meio do câmara fotográfica e programa Axion Vision, utilizando as objetivas de 2,5x e 10x (as barras de escala correspondem à 500 µm e 200 µm, respectivamente).



**Figura 19 - Histopatologia do pulmão de camundongos C57BL/6 no dia 60 após infecção por cepa padrão 12478.** Os pulmões dos camundongos foram obtidos no dia 60 de infecção, processados para histologia, e as lâminas foram coradas pelo HE. As setas vermelhas (**A** e **B**) demonstram áreas dominadas pelos macrófagos espumosos. As cabeças de setas pretas apontam nos compactos granulomas compostos por linfócitos (**A**). As setas pretas demonstram as células gigantes (**B**). As barras de escala correspondem à 200 µm (**A**) e 100 µm (**B**).

Para visualizar as micobactérias, as lâminas foram coradas pelo método de Ziehl-Nielsen (**Figura 20**). Os bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) foram corados na cor vermelha. Nos pulmões dos animais infectados pela cepa 8835, o número de BAAR foi maior em comparação com demais cepas. As bactérias foram localizadas em macrófagos (**Figura 20**, setas amarelas). Alguns bronquíolos foram obstruídos pelo infiltrado celular com BAAR intracelulares.





**Figura 20 - Bacilos álcool-ácidos resistentes (BAAR) no pulmão de camundongos C57BL/6 infectados pelas cepas de *M. kansasii*.** Os pulmões dos camundongos foram obtidos no dia 40 de infecção, processados para histologia, e as lâminas foram coradas pelo método de ZN. Os BAAR estão sinalizados pelas setas amarelas. Os bacilos estão localizados em macrófagos. Alguns bronquíolos estão obstruídos pelo infiltrado celular com BAAR intracelulares (imagem direita inferior). As imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando objetiva 20x (as barras de escala correspondem à 100 µm.)

## 6. DISCUSSÃO

O número de casos de doença pulmonar causada por MNTs vem aumentando consideravelmente em todo Brasil (DA COSTA *et al.*, 2011). Em alguns estados, como no Estado do Rio de Janeiro, a espécie *Mycobacterium kansasii* está entre as causas mais comuns deste grupo de doenças (DE MELLO *et al.*, 2013), o que ressalta a importância de estudo dos isolados clínicos dessa micobactéria e sua virulência, que é uma medida da capacidade da bactéria causar infecção e progressão da doença.

Neste trabalho, nós caracterizamos a virulência de dez cepas de *Mycobacterium kansasii* disponibilizadas para estudo pelo Dr. Philip Suffys (Fiocruz, Rio de Janeiro). Nove dessas cepas foram isoladas de pacientes no Brasil com doença pulmonar não-tuberculosa e uma cepa, isolada em 1955 do paciente falecido (cepa *M. kansasii* 12478 Hauduroy, ATCC), foi utilizada como referência para comparação, pelo fato dela já ter sido genotipada e possuir alguns trabalhos sobre ela na literatura.

As bactérias foram cultivadas no meio Middlebrook Líquido (meio 7H9) e sólido (meio 7H10) e apresentaram características de crescimento típicas para Mkan. No meio sólido, as colônias de bactéria foram arredondadas, com a superfície rugosa, úmidas, e amareladas na presença de luz, comprovando ser fotocromógenas (POLLAK e BUHLER, 1955). Os bacilos apresentaram resistência a álcool e ácido durante a coloração pelo método de Ziehl-Nielsen, e sua morfologia foi típica para espécie Mkan, sendo que o comprimento do bacilo foi maior em comparação com Mtb.

Inicialmente, foi comparada a capacidade de adaptação (*fitness*) do crescimento de cada cepa bacteriana em meio Middlebrook 7H9 completo, durante dez dias. Nossos resultados demonstraram que a metade das cepas apresentou o crescimento similar a cepa 12478. Três cepas foram capazes de crescer significativamente mais rápido que a cepa de referência e duas cepas (3657 e 4404) tiveram crescimento baixo. Como a *fitness* de bactéria está avaliada no meio de cultura, *in vitro*, essa característica, isoladamente, não permite avaliar a virulência, mas pode ser utilizada como um dado complementar para caracterizar a capacidade de adaptação da bactéria.

O teste de infecção *in vitro*, utilizando macrófagos, nos permite analisar o contato inicial do patógeno com a célula hospedeira, sendo este teste importante pois permite comparar grande quantidade das cepas devido da sua praticidade (MAULÉN, 2011). Neste trabalho, foi avaliado o crescimento intracelular de 10 cepas diferentes. Os macrófagos RAW 264.7 foram infectados com baixa dose de infecção (MOI 1:1), permitindo avaliar melhor a capacidade da bactéria se reproduzir dentro de uma célula fagocítica em um ambiente hostil, sem alterar a viabilidade no macrófago (ZHANG *et al.*, 1998).

As cepas 1580, 8835, 8837, 8839 e 10953 mostraram maior capacidade da replicação intracelular quando comparadas à cepa padrão 12478. Comparando a capacidade de crescimento da população bacteriana em meio de cultura líquido com a capacidade de crescimento intracelular, podemos perceber que 3 cepas que apresentaram maior *fitness* (8837, 8839 e 10953) também foram capazes de crescer mais rápido em macrófagos.

Entretanto, algumas cepas com a taxa de *fitness* intermediária, como as cepas 1580 e 8835, demonstraram maior capacidade de crescimento intracelular, similar às cepas 8837, 8839 e 10953. De acordo com dados anteriores, alta capacidade da micobactéria crescer em macrófagos pode surgir um sinal de elevada virulência (KEANE *et al.*, 2000).

Outro fator que pode contribuir com a virulência da micobactéria é a sua capacidade de induzir a morte necrótica dos macrófagos infectados (ZHANG *et al.*, 1998).

O crescimento de Mkan em macrófagos murinos foi relacionado com a indução de morte por necrose ou apoptose. Já sabemos que bactérias mais virulentas são capazes de induzir mais necrose que bactérias avirulentas (KEANE *et al.*, 2000). Foi demonstrado que cepas de Mkan com alta capacidade de crescimento intracelular em macrófagos induzem à morte dos mesmos por necrose (SOHN *et al.*, 2010).

Analisando a citotoxicidade das cepas Mkan em culturas dos macrófagos infectados com dose elevada de bactéria (MOI 10:1 ou 50:1 bactéria/macrófago), percebemos que as cepas 8835, 8837, 8839 e 10953 foram mais citotóxicas, sendo que apresentaram maiores taxas de morte celular em dois testes utilizados para quantificar a morte necrótica dos macrófagos (teste de coloração pelo corante azul tripan e teste de liberação de lactato desidrogenase, LDH).

Importante, que essas cepas também apresentaram maiores taxas de crescimento em macrófagos, o que fortemente sugere a virulência elevada dessas micobactérias.

Outro fator que pode contribuir para o aumento da virulência micobacteriana é a capacidade de bactéria alterar a resposta imune, seja ela inata e/ou adaptativa. A indução nos macrófagos da produção das citocinas pró-inflamatórias, como as IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , pode contribuir com a imunidade protetora contra micobactéria, sendo a produção da citocina IL-10 um fator de imunossupressão (MURPHY, 2014). A produção dessas citocinas pelos macrófagos foi verificada no nosso modelo de infecção das células RAW 264.7.

A maioria das cepas de Mkan (cepas 1580, 4404, 7287, 8837, 8839 e 12478) foi capaz de induzir elevados níveis de secreção da IL-1 $\beta$ , sendo que quatro cepas (3657, 7439, 8835 e 10953) não induziram a produção dessa citocina pelos macrófagos. A secreção da IL-1 $\beta$  depende do processamento da pro-citocina pelas caspases IL-1 ou IL-11, cuja ativação nos macrófagos infectados pelas cepas de *M. kansasii* depende da ativação do inflamassoma NLRP3/ASC (CHEN *et al.*, 2012). Neste trabalho foi demonstrado que a ativação do inflamassoma por Mkan (foi utilizada cepa padrão 12478) é importante fator na proteção contra essa micobactéria. Os resultados obtidos em nossos experimentos, demonstram que algumas cepas de *M. kansasii*, diferentemente da cepa 12478, não induzem a produção da IL-1 $\beta$  pelos macrófagos, sugere-se que essas cepas não ativam o inflamassoma como estratégia de escapar contra a resposta protetora do hospedeiro. Entretanto, a confirmação dessa hipótese exige estudos adicionais.

A secreção da TNF- $\alpha$  também foi dosada em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados. Todas as cepas foram capazes de induzir a produção dessa citocina, sendo que 3 cepas (1580, 8835 e 10953) induziram significativamente mais citocina que a cepa 12478. Os níveis da TNF- $\alpha$  induzidos pelas cepas 8835 e 10953 (as mais virulentas de acordo com os testes *in vitro*) foram particularmente altos. A TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória importante para resposta imune contra micobactéria. Entretanto, altos níveis dessa citocina, e outras citocinas pró-inflamatórias no pulmão, podem contribuir com a exacerbação da inflamação e imunopatologia. Neste sentido, alta indução da TNF- $\alpha$  por algumas micobactérias pode contribuir para a progressão da doença,



sinalizando a virulência elevada. De acordo com esta hipótese, as cepas de *M. kansasii* que crescem mais rápido em macrófagos infectados induziram, maiores níveis de TNF- $\alpha$  e foram mais virulentas (SOHN *et al.*, 2010).

Interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória produzida por macrófagos e linfócitos que atua inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, assim como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Bactérias podem induzir a produção dessa citocina como forma de diminuição da resposta imune do hospedeiro, evitando assim sua eliminação. Essa citocina também tem a capacidade de modular a resposta imune o que é importante para evitar imunopatologia (MURPHY, 2014).

A dosagem da IL-10 no sobrenadante de cultura de macrófagos infectados por Mkan demonstrou que apenas as cepas 4404, 8837 e 8839 foram capazes de induzir a produção dessa citocina. Para cepas mais virulentas e que induzem altos níveis da produção das citocinas pró-inflamatórias, como as cepas 8837 e 8839, a capacidade de induzir IL-10 pode ajudar a equilibrar a inflamação, reduzindo o impacto na imunopatologia. Ao contrário, as cepas de alta virulência que induzem altos níveis da TNF- $\alpha$  (com as cepas 8835 e 10953), mas não induzem citocinas regulatórias, incluindo a IL-10, podem provocar maior imunopatologia.

O NO é uma substância produzida pelos macrófagos, decorrentes da ativação dos mesmos pelas micobactérias (BODGAN, 2001). Cepas que induzem a produção de grandes concentrações de NO no sobrenadante da cultura de infecção tendem a ser mais virulentas que as cepas que não induzem produção de NO em macrófagos. As cepas 1580, 8835, 8839 e 10953 induziram elevados níveis de NO, que comparados aos resultados dos testes anteriores, indicam maior virulência dessas cepas.

Análise de todos os nossos dados obtidos em testes *in vitro* permitiu discriminar as cepas de *M. kansasii* em 3 grupos, de acordo com sua virulência: grupo I, de alta virulência (cepas 8839, 10953, 8835 e 8837), destacando as cepas 8835 e 10953, que provavelmente podem ser mais competitivas *in vivo*; grupo II, de virulência intermediária (cepas 1580, 4404 e 7287); e grupo III, de baixa virulência (cepas 3657, 7439 e cepa padrão 12478).

Para validar o ranking de virulência sugerido, nós selecionamos 3 cepas (uma cepa de cada grupo do ranking de virulência): a cepa 8835 (grupo I), cepa 4404 (grupo II) e cepa padrão 12478 (grupo III).

Para podermos confirmar a taxa de virulência de cada uma das cepas, utilizamos um modelo de infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6 já estabelecido em nosso laboratório (Amaral *et al.*, 2011; Ribeiro *et al.*, 2014). Os animais foram infectados com alta dose de infecção ( $5 \times 10^4$ ), a fim de induzir um quadro patológico, podendo então ser analisados a morbidade e a mortalidade causada por essas cepas (SMITH, 2003).

Ao analisarmos o peso dos camundongos, a macropatologia e histopatologia do pulmão, o número de bactérias (CFU) presentes nos pulmões dos animais infectados, além da mortalidade, a cepa 8835 apresentou o maior nível de virulência em todos os testes realizados. Esta foi a única cepa que induziu a doença fatal, levando os animais ao estado moribundo já no dia 40 de infecção, quando foi realizada a eutanásia, para evitar o sofrimento animal. Essa cepa induziu a patologia extensa no pulmão através de infiltração difusa do parênquima pelos macrófagos e linfócitos (pneumonia granulomatosa), obstruindo parcialmente as vias respiratórias, o que pode ser a causa da morte.

Em trabalhos anteriores, a patologia pulmonar similar, apesar de ser muito menos extensa, foi observada somente nos camundongos “knock-out” deficientes na expressão do gene de IL-1R. Infecção intranasal pela cepa de *M. kansasii* ( $5 \times 10^4$  bacilo/animal) induziu infiltrado celular no pulmão, constituído principalmente por células mononucleares (macrófagos em sua maioria e também linfócitos), o que gerou uma inflamação intersticial difusa, agravada pela pleurite, o que, entretanto, não alterou a sobrevivência dos animais no período de 8 semanas pós infecção (WIELAND *et al.*, 2006b). Aparentemente, a cepa usada no referido trabalho foi menos virulenta que a cepa 8835.

Os animais infectados com a cepa de referência 12478 e cepa 4404 apresentaram menor virulência em comparação com a cepa 8835. Esses animais não apresentaram perda de peso corporal, ou outros sinais de morbidade, durante os 60 dias de infecção. Os pulmões apresentavam formação de granulomas, compostos por macrófagos e linfócitos, em volta dos vasos e bronquíolos, sem diferença óbvia no número dos granulomas. O pulmão aumentou de tamanho, houve também aumento da massa relativa pulmonar e do peso do pulmão nos animais de ambos os grupos. Entretanto, o peso médio de pulmão no grupo dos camundongos infectados pela cepa 12478 foi

significativamente maior em comparação com o grupo de cepa 4404 no dia 40 de infecção. Outra diferença foi observada na curva de crescimento de bactérias no pulmão. Apesar do perfil similar do crescimento dessas cepas no pulmão durante os primeiros 40 dias, no dia 60, o número de micobactérias recuperadas do pulmão foi cerca de 2 log maior nos animais infectados pela cepa 12478, demonstrando resistência dessas bactérias frente à resposta imune do hospedeiro, ao contrário da cepa 4404 que apresentou a tendência de eliminação.

Estes dados demonstram que a cepa 12478, que apresentou menor virulência em comparação com a cepa 4404 nos testes de infecção *in vitro*, foi mais competitiva *in vivo*, principalmente, na fase crônica da infecção, o que demonstra sua maior virulência.

Os dados obtidos neste trabalho demonstram uma significativa diferença em virulência dos isolados clínicos obtidos dos pacientes com doença pulmonar no Brasil, o que já foi observado em trabalho semelhante de pesquisadores da Coreia do Sul (SOHN *et al.*, 2010). Entretanto, nossos dados demonstram, pela primeira vez, um isolado clínico de *M. kansasii* que pode ser considerado hipervirulento, devido a sua capacidade de induzir uma doença pulmonar fatal, que provocou morte dos camundongos da linhagem C57BL/6, imunocompetentes e resistentes à infecção micobacteriana. Pelo menos mais um isolado de Mkan (cepa 10953), apresentou em testes *in vitro*, as propriedades associadas à virulência elevada similares a essas propriedades da cepa 8835, o que seria interessante confirmar em testes *in vivo*.

A base genética que determina as diferenças em virulência das diferentes cepas de Mkan ainda não foi estabelecida. A colaboração estabelecida com pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz visa realização da genotipagem e sequenciamento do genoma das cepas utilizadas neste trabalho. Estes dados devem aprofundar o nosso conhecimento sobre a relação entre genética do patógeno, suas características fenotípicas que determinam a virulência e patogenia da doença pulmonar causada por *M. kansasii*.

## 7. CONCLUSÕES

- Os isolados clínicos de *M. kansasii* obtidos dos pacientes com doença pulmonar no Brasil apresentam grande variedade na sua virulência.
- A maioria dos isolados clínicos apresentam maior grau de virulência em comparação com a cepa de *M. kansasii* padrão 12478 (ATCC) isolada do paciente em 1955.
- Avaliação da capacidade micobacteriana de crescimento intracelular em macrófagos e da indução da morte necrótica dessas células em testes *in vitro*, permitiu estabelecer o grau de virulência das cepas de *M. kansasii*, que foi confirmado em testes *in vivo* de infecção intratraqueal dos camundongos C57BL/6.
- A cepa 8835 apresentou a virulência elevada em testes *in vitro* e *in vivo* em comparação com demais cepas de *M. kansasii* testadas. Essa cepa pode ser considerada hipervirulenta, sendo capaz de induzir uma doença pulmonar fatal, associada a extensa pneumonia granulomatosa, que levou animais ao óbito após 40 dias de infecção.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

**AMARAL**, E. P.; KIPNIS, T. L.; CARVALHO, E. C. Q.; SILVA, W. D.; LEÃO, S. C.; LASUNSKAIA, E. B. (2011) Difference in virulence of *Mycobacterium avium* isolates sharing indistinguishable DNA fingerprint determined in murine model of lung infection. *PloS One*, v. 6, n. 6, p. e21673, 2011.

**AREND**, S. M., DE HAAS, P., LEYTEN, E., ROSENKRANDS, I., RIGOUTS, L., ANDERSEN, P., ... VAN SOOLINGEN, D. (2005) ESAT-6 and CFP-10 in clinical versus environmental isolates of *Mycobacterium kansasii*. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 191, n. 8, p.1301-1310, 2005.

**BALLS**, M.; CLOTHIER, R. H. (1992) Citotoxicity assays for intrinsic toxicity and irritancy. In *Vitro Methods for Toxicology* (ed. R.R. Watson), p.37-52,1992.

**BOGDAN**, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

**BOZZANO**, F.; MARRAS, F.; DE MARIA, A. (2014) Immunology of tuberculosis. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 6, n. 1, p. 2014027, 2014.

**BUTLER**, R. E.; BRODIN, P.; JANG, J.; JANG, M. S.; ROBERTSON, B. D.; GICQUEL, B.; STEWART, G. R. (2012) The balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence. *Plos One*, v. 7, n. 10, p. e47573, 2012.

**CASSIDY**, P. M.; HEDBERG, K.; SAULSON, A.; MCNELLY, E.; WINTHROP, K. L. (2009) Nontuberculous mycobacterial disease prevalence and risk factors: a changing epidemiology. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 12, p. e124-e129, 2009.

**CDC** - Centers for Disease Control and Prevention. Nontuberculous mycobacteria reported to the Public Health Laboratory Information System by state public health laboratories United States, 1993–1996 [http://www.cdc.gov/tb/Laboratory\\_Services/NontuberculousMycobacteria.pdf](http://www.cdc.gov/tb/Laboratory_Services/NontuberculousMycobacteria.pdf). (Acessado dia 16 de Janeiro de 2017).

**CHADHA**, A.; MEHTO, S.; SELVAKUMAR, A.; VASHISHTA, M.; KAMBLE, S. S.; POPLI, S.; RAMAN, R.; SINGH, Y.; NATARAJAN, K. (2015) Suppressive role of neddylation in dendritic cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberculosis*, v. 95, n. 5, p. 599-607, 2015.

**CHEN**, C. C.; TSAI, S. H.; LU, C. C.; HU, S. T.; WU, T. S.; HUANG, T. T. (2012) Activation of an NLRP3 inflammasome restricts *Mycobacterium kansasii* infection. *PloS One*, v. 7, n. 4, p. e36292, 2012.

**COWMAN**, S.; WILSON, R.; LOEBINGER, M. R. (2012) Opportunistic mycobacterial diseases. *Medicine*, v. 40, n. 6, p. 346-348, 2012.

**DA COSTA**, A. R.; LOPES, M. L.; FURLANETO, I. P.; DE SOUSA, M. S.; LIMA, K. V. (2010) Molecular identification of nontuberculous mycobacteria isolates in a Brazilian mycobacteria reference laboratory. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 68, n. 4, p. 390-394, 2010.

**DE MELLO**, K. G. C.; MELLO, F. C. Q.; BORGA L.; ROLLA, V.; DUARTE, R. S.; SAMPAIO, E. P.; HOLLAND, S. M.; PREVOTS, D. R.; DALCOLMO, M. P. (2013) Clinical and Therapeutic Features of Pulmonary Nontuberculous Mycobacterial Disease, Rio de Janeiro, Brazil. *Emerging Infectious Disease Journal*, v. 19, n. 3, p. 393-399, 2013.

**ESSER**, M. T.; MARCHESE, R. D.; KIERSTEAD, L. S.; TUSSEY, L. G.; WANG, F.; CHIRMULE, N.; WASHABAUGH, M. W. (2003) Memory T cells and vaccines. *Vaccine*, v. 21, n. 5, p. 419-430, 2003.

**FARIA**, S.; JOAO, I.; JORDAO, L. (2015) General Overview on Nontuberculous Mycobacteria, Biofilms, and Human Infection. *Journal of Pathogens*, v. 2015, ID 809014, 10 p.

**FLYNN**, J. L. (2006) Lessons from experimental *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbes and Infection*, v. 8, n. 4, p. 1179-1188, 2006.

**FORRELLAD**, M. A.; KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A.; SABIO, Y.; GARCÍA, J.; MORBIDON, H. R.; DE LA PAZ SANTANGELO, M.; CATALDI, A. A.; BIGI, F. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3-66, 2013.

**GRIFFITH**, D. E. (2007) Therapy of nontuberculous mycobacterial disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 20, n. 2, p. 198-203, 2007.

**HOEFSLOOT**, W., VAN INGEN, J., ANDREJAK, C., ÄNGEBY, K., BAURIAUD, R., BEMER, P., ... CHIMARA, E. (2013). The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTM-NET collaborative study. *European Respiratory Journal*, v.42, n.6, p. 1604-1613, 2013.

**JOHNSON**, M. M.; ODELL, J. A. (2014) Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections. *Journal of Thoracic Disease*, v. 6, n. 3, p. 210-220, 2014.

**JOHNSTON**, J. C.; CHIANG, L.; ELWOOD, K. (2017) *Mycobacterium kansasii*. *Microbiology Spectrum*, v. 5, n. 1, 2017.

**KANKYA**, C.; MUWONGE, A.; DJONNE, B. MUNYEME, M.; OPUDA-ASIBO, J.; SKJERVE, E.; OLOYA, J.; EDVARDSEN, V.; JOHANSEN, T. B. (2011) Isolation of non-tuberculous mycobacteria from pastoral ecosystems of Uganda: public health significance. *BMC Public Health*, v. 11, n. 1, p. 320, 2011.

**KEANE**, J.; REMOLD, H. G.; KORNFELD, H. (2000) Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 164, n. 4, p. 2016-2020, 2000.

**KHALEDI**, A.; BAHADOR, A.; ESMAEILI, D.; TAFAZOLI, A.; GHAZVINI, K.; MANSURY, D. (2016) Prevalence of nontuberculous mycobacteria isolated from

environmental samples in Iran: A meta-analysis. Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences, v. 21, 2016.

**KOIRALA, J.** (2017) *Mycobacterium kansasii*. <<http://emedicine.medscape.com/article/223230-overview>>. Acessado em 27 de março de 2017.

**KOZAKIEWICZ, L.; PHUAH, J.; FLYNN, J.; CHAN, J.** (2013) The role of B cells and humoral immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. Advances in Experimental Medicine and Biology, pp 225-250, 2013.

**KUMAR, S. K.; SINGH, P.; SINHA, S.** (2015) Naturally produced opsonizing antibodies restrict the survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages by augmenting phagosome maturation. Open Biology, v. 5, n. 12, p. 150171, 2015.

**LEITE, C. Q. F.; VIANA, B. H. J.; LEITE, S. R. A.; JUAREZ, E.** (1995) Incidence of *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria on pulmonary infections in araraquara-sp, 1993. Revista de Microbiologia, p. 101-105, 1995.

**LERNER, T. R.; BOREL, S.; GUTIERREZ, M. G.** (2015) The innate immune response in human tuberculosis. Cellular Microbiology, v. 17, n. 9, p. 1277-1285, 2015.

**LI, Y.; WANG, Y.; LIU, X.** (2012) The role of airway epithelial cells in response to mycobacteria infection. Clinical and Developmental Immunology, vol. 2012, Article ID 791392, 11 pages

**LIM, Y. J.; CHOI, H. H.; CHOI, J. A.; JEONG, J. A.; CHO, S. N.; LEE, J. H.; PARK, J. B.; KIM, H. J.; SONG, C. H.** (2013) *Mycobacterium kansasii*-induced death of murine macrophages involves endoplasmic reticulum stress responses mediated by reactive oxygen species generation or calpain activation. Apoptosis, v. 18, n. 2, p. 150-159, 2013.

**MARTINS, A. B.; MATOS, E. D.; LEMOS, A. C.** (2005) M. Infection with the *Mycobacterium avium* complex in patients without predisposing conditions: a case report and literature review. Brazilian Journal of Infectious Diseases, v. 9, n. 2, p. 173-179, 2005.

**MATVEYCHUK, A.; FUKS, L.; PRIESS, R.; HAHIM, I.; SHITRIT, D.** (2012) Clinical and radiological features of *Mycobacterium kansasii* and other NTM infections. Respiratory Medicine, v. 106, n. 10, p. 1472-1477, 2012.

**MAULÉN, N. P.** (2011) Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. Revista Médica de Chile, v. 139, n. 12, p. 1605-1610, 2011.

**MORIMOTO, K.; IWAI, K.; UCHIMURA, K.; OKUMURA, M.; YOSHIYAMA, T.; YOSHIMORI, K.; OGATA, H.; KURASHIMA, A.; GEMMA, A.; KUDOH, S.** (2014) A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated

prevalence in Japan. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 11, n. 1, p. 1-8, 2014.

**MURPHY**, K. (2014). *Imunobiologia de Janeway-8*. Artmed Editora, 2014.

**NIKI**, M.; **SUZUKAWA**, M.; **AKASHI**, S.; **NAGAI**, H.; **OHTA**, K.; **INOUE**, M.; **NIKI**, M.; **KANEKO**, Y.; **MORIMOTO**, K.; **KURASHIMA**, A.; **KITADA**, S.; **MATSUMOTO**, S.; **SUZUKI**, K.; **HOSHINO**, Y. (2015) Evaluation of humoral immunity to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens for correlation with clinical status and effective vaccine development. *Journal of immunology research*, v. 2015, 2015.

**ORME**, I. M.; **BASARABA**, R. J. (2014) The formation of the granuloma in tuberculosis infection. *Seminars in immunology*. Academic Press, p. 601-609, 2014.

**ORME**, I. M.; **ROBINSON**, R. T.; **COOPER**, A. M. (2015) The balance between protective and pathogenic immune responses in the TB-infected lung. *Nature Immunology*, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2015.

**PARK**, J. S.; **TAMAYO**, M. H.; **GONZALEZ-JUARRERO**, M.; **ORME**, I. M.; **ORDWAY**, D. J. (2006) Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 79, n. 1, p. 80-86, 2006.

**POLLAK**, A.; **BUHLER**, V. B. (1955) The cultural characteristics and animal pathogenicity of an atypical acid-fast organism which causes human disease. *American Review of Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, v. 71, n. 1, p. 74-87, 1955.

**POULIN**, R.; **COMBES**, C. (1999) The concept of virulence: interpretations and implications. *Parasitology Today*, v. 15, n. 12, p. 474-475, 1999.

**PREVOTS**, D. R.; **SHAW**, P. A.; **STRICKLAND**, D.; **JACKSON**, L. A.; **RAEBEL**, M. A.; **BLOSKY**, M. A.; **DE OCA**, R. M.; **SHEA**, Y. R.; **SEITZ**, A. E.; **HOLLAND**, S. M.; **OLIVIER**, K. N. (2010) Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 182, n. 7, p. 970-976, 2010.

**PREVOTS**, D. R.; **MARRAS**, T. K. (2015) Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clinics in Chest Medicine*, v. 36, n. 1, p. 13-34, 2015.

**RAMAKRISHNAN**, L. (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 12, n. 5, p. 352-366, 2012.

**RAO**, M.; **VALENTINI**, D.; **POIRET**, T.; **DODOO**, E.; **PARIDA**, S.; **ZUMLA**, A.; **BRIGHENTI**, S.; **MAEURER**, M. (2015) B in TB: B cells as mediators of clinically relevant immune responses in tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, v. 61, n. suppl 3, p. S225-S234, 2015.



**REED, J. M.; BRANIGAN, P. J.; BAMEZAI, A. (2008)** Interferon gamma enhances clonal expansion and survival of CD4+ T cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 28, n. 10, p. 611-622, 2008.

**REED, M. B.; DOMENECH, P.; MANCA, C.; SU, H.; BARCZAK, A. K.; KREISWIRTH, B. N.; KAPLAN, G.; BARRY, C.E. (2004)** A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature*, v. 431, n. 7004, p. 84-87, 2004.

**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. (2014)** *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 52, n. 7, p. 2615-2624, 2014.

**RICKETTS, W. M.; O'SHAUGHNESSY, T. C.; VANINGEN, J. (2014)** Human-to-human transmission of *Mycobacterium kansasii* or victims of a shared source? *European Respiratory Journal*, v. 44, n. 4, p. 1085-1087, 2014.

**RIENDEAU, C. J.; KORNFIELD, H. (2003)** THP-1 cell apoptosis in response to *Mycobacterial* infection. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 1, p. 254-259, 2003.

**ROMAGNOLI, A.; ETNA, M. P.; GIACOMINI, E.; PARDINI, M.; REMOLI, M. E.; CORAZZARI, M.; FALASCA, L.; GOLETTI, D.; GAFA, V.; SIMEONE, R.; DELOGU, G.; PIACENTINI, M.; BROSCHE, R.; FIMIA, G.M.; COCCIA, E. M. (2012)** ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy*, v. 8, n. 9, p. 1357-1370, 2012.

**RYU, Y. J.; KOH, W. J.; DALEY, C. L. (2016)** Diagnosis and Treatment of Nontuberculous *Mycobacterial* Lung Disease: Clinicians' Perspectives. *Tuberculosis and Respiratory Diseases (Seoul)*. v. 79, n. 2, p. 74-84, 2016.

**SADAPHAL, P.; RAO, J.; COMSTOCK, G. W.; BEG, M. F. (2008)** Image processing techniques for identifying *Mycobacterium tuberculosis* in Ziehl-Neelsen stains. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, v. 12, n. 5, p. 579-582, 2008.

**SEISCENTO, M.; BOMBARDA, S.; DE CARVALHO, A. C.; DE CAMPOS, J. R. M.; TEIXEIRA, L. (2005)** Derrame pleural por micobactéria não tuberculosa. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 5, p. 459-63, 2005.

**SHAO, Y.; CHEN, C.; SONG, H.; LI, G.; LIU, Q.; LI, Y.; ZHU, L.; MARTINEZ, L.; LU, W. (2015)** The epidemiology and geographic distribution of nontuberculous mycobacteria clinical isolates from sputum samples in the eastern region of China. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n. 3, p. e0003623, 2015.

**SMITH, I. (2003)** *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n. 3, p. 463-496, 2003.

**SOHN**, H.; KIM, K. W.; KANG, H. B.; WON, C. J.; KIM, W. S.; LEE, B.; KNOW, O.J.; KOH, W.J.; SHIN, S.J.; Kim, H. J. (2010). Induction of macrophage death by clinical strains of *Mycobacterium kansasii*. Microbial Pathogenesis, v. 48, n. 5, p. 160-167, 2010.

**SOUSA**, S.; BANDEIRA, M.; CARVALHO, P. A.; DUARTE, A. JORDAO, L. (2015) Nontuberculous mycobacteria pathogenesis and biofilm assembly. International Journal of Mycobacteriology, v. 4, n. 1, p. 36-43, 2015.

**STROBER**, W. (2015) Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability-APPENDIX 3B BASIC PROTOCOL. Current Protocols in Immunology A. B, v. 3. 2015.

**TAILLARD**, C., GREUB, G., WEBER, R., PFYFFER, G. E., BODMER, T., ZIMMERLI, S., ... BERNASCONI, E. (2003) Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss National Survey. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, n. 3, p.1240-1244, 2003.

**TAN**, B. H.; MEINKEN, C.; BASTIAN, M.; BRUNS, H.; LEGASPI, A.; OCHOA, M. T.; KRUTZIK, S. R.; BLOOM, B. R.; GANZ, T.; MODLIN, R. L.; STENGER, S. (2006) Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. The Journal of Immunology, v. 177, n. 3, p. 1864-1871, 2006.

**VANKAYALAPATI**, R.; BARNES, P. F. (2009) Innate and adaptive immune responses to human *Mycobacterium tuberculosis* infection. Tuberculosis, v. 89, p. S77-S80, 2009.

**WANG**, J.; MCINTOSH, F.; RADOMSKI, N.; DEWAR, K.; SIMEONE, R.; ENNINGA, J.; BROSCHE, R.; ROCHA, E. P.; VEYRIER, F. J.; BEHR, M. A.; (2015) Insights on the emergence of *Mycobacterium tuberculosis* from the analysis of *Mycobacterium kansasii*. Genome Biology and Evolution, v. 7, n. 3, p. 856-870, 2015.

**WIELAND**, C. W.; FLORQUIN, S.; PATER, J. M.; WEIJER, S.; VAN DER POLL, T. (2006b) CD4+ cells play a limited role in murine lung infection with *Mycobacterium kansasii*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, v. 34, n. 2, p. 167-173, (2006b).

**WIELAND**, C. W.; FLORQUIN, S.; PATER, J. M.; WEIJER, S.; VAN DER POLL, T. (2006a) Interleukin-1 contributes to an effective clearance of *Mycobacterium kansasii* from the respiratory tract. Microbes and Infection, v. 8, n. 9, p. 2409-2413, (2006a).

**WINSLOW**, G. M.; COOPER, A.; REILEY, W.; CHATTERJEE, M.; WOODLAND, D. L. (2008) Early T-cell responses in tuberculosis immunity. Immunological Reviews, v. 225, n. 1, p. 284-299, 2008.

**ZHANG**, M.; GONG, J.; LIN, Y.; BARNES, P. F. (1998). Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. Infection and Immunity, v. 66, n. 2, p. 794-799, 1998.

**ZHANG**, G. L.; **WANG**, Y. H.; **NI**, W.; **TENG**, H. L.; **LIN**, Z. B. (2002) Hepatoprotective role of *Ganoderma lucidum* polysaccharide against BCG-induced immune liver injury in mice. *World Journal of Gastroenterology*, v. 8, n. 4, p. 728-733, 2002.

**ZHANG**, M.; **ZHENG**, X.; **ZHANG**, J.; **ZHU**, Y.; **ZHU**, X.; **LIU**, H.; **ZENG**, M.; **GRANER**, M. W.; **ZHOU**, B.; **CHEN**, X. (2012) CD19<sup>+</sup> CD1d<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup> B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cellular Immunology*, v. 274, n. 1, p. 89-97, 2012.

## 9. ANEXO

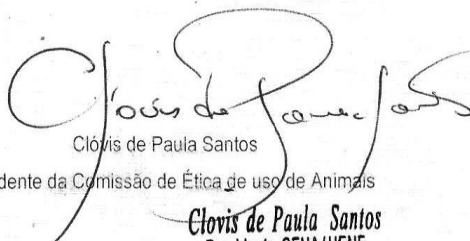


Reitoria  
Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

### CERTIFICADO

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

Campos dos Goytacazes, 28 de março de 2017.

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

Av. Alberto Lamego, 2000 - Parque Califórnia - Campos dos Goytacazes/ RJ - 28013-602  
Tel.: (22) 2739-7180 - Fax: (22) 2739-9178 - correio eletrônico: ceua@uenf.br

rio