

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ MMP-2, MMP-
9 E MMP-12 EM CÉLULAS INFECTADAS COM CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis E SEU IMPACTO NA VIRULÊNCIA DAS
BACTÉRIAS

ANDREZA LINHARES REZENDE

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

SETEMBRO - 2013

EXPRESSÃO DAS METALOPROTEINASES DE MATRIZ MMP-2, MMP-
9 E MMP-12 EM CÉLULAS INFECTADAS COM CEPAS DE
Mycobacterium tuberculosis E SEU IMPACTO NA VIRULÊNCIA DAS
BACTÉRIAS

ANDREZA LINHARES REZENDE

“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, com ênfase em Biologia Celular.”

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

SETEMBRO – 2013

“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, com ênfase em Biologia Celular.”

Aprovada em 03 de setembro de 2013.

Comissão examinadora:

Milton Masahiko Kanashiro – UENF
Doutor em Biociências e Biotecnologia

Elisangela Costa da Silva – UENF
Doutora em Ciências

Francisco Martins Teixeira – UFRJ
Doutor em Bioquímica e Imunologia

Elena Lassounskaia – UENF
Doutora em Ciências Médicas
Orientadora

“Em algum lugar, algo incrível espera para ser descoberto.”

Carl Sagan, 1934-1996

AGRADECIMENTOS

Agradeço principalmente à Deus por me capacitar e guiar nas escolhas das minhas decisões, permitindo que eu caminhe com passos firmes, segura porque sei que sempre Estas comigo.

À minha família, por me encorajar nos momentos de dúvidas, pela dedicação, compreensão e amor fazendo de mim uma pessoa mais forte e determinada a lutar pelos meus sonhos.

Agradeço também em especial à professora Dra. Elena Lassounskaia, minha orientadora, pela atenção dispensada nos momentos de dúvida, por confiar este trabalho a mim, contribuindo para meu crescimento científico.

Aos demais professores e técnicos do Laboratório de Biologia do Reconhecer pelo apoio profissional e por estarem sempre dispostos a esclarecer meus questionamentos. Assim como aos colegas do laboratório: Fabrício, Giliane, Gislaine, Marcelle, Pollyana, Sanderson, Sara, Simone, Thatiana e Viviane por compartilharem comigo seus conhecimentos, angústias, conquistas, pelo companheirismo, amizade e incentivo...

Ao professor Claudio Retamal e ao colega David Gitirana pela ajuda nas análises das zimografias

Às colegas Rachel e Maria Aparecida e ao Professor Eulógio (LSA), meu muito obrigada pela colaboração e paciência nos experimentos de imunistoquímica.

Aos membros da banca Prof^a Elisângela, Prof Milton, Prof Francisco e a Prof^a Alba (revisora) por aceitarem fazer parte deste momento tão importante.

SUMÁRIO

SUMÁRIO DE FIGURAS	iii
SUMÁRIO DE TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- Tuberculose	1
1.2- Imunopatologia da Tuberculose	3
1.3- Impacto da virulência da micobactéria na patogenia da tuberculose	7
1.4- Matriz extracelular e metaloproteinases de matriz	8
2- JUSTIFICATIVA	14
3- OBJETIVOS	15
3.1- Objetivo Geral	15
3.2- Objetivos Específicos	15
4- MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1- Cultura de células	16
4.2- Micobactérias	16
4.3- Animais	17
4.4- Infecção experimental dos animais	18
4.5- Anticorpos e reagentes	19
4.6- Zimografia	19

4.7- Imunoistoquímica	20
4.8- Medidas de biossegurança de nível III	21
4.9- Análises estatísticas	22
5- RESULTADOS	23
5.1- Avaliação da atividade de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, em células de pulmão <i>ex vivo</i> de camundongos infectados na fase aguda de infecção (28 dpi)	23
5.2- Avaliação da atividade de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, em células de pulmão <i>ex vivo</i> de camundongos infectados na fase crônica de infecção (120dpi)	25
5.3- Avaliação da atividade de metaloproteinase de matriz-12 em células <i>ex vivo</i> de pulmão de camundongos infectados durante as fases aguda (28 dpi) e crônica (120 dpi) de infecção	27
5.4- Avaliação da produção de metaloproteinase de matriz, MMP-2 e MMP-9, por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) infectados <i>in vitro</i> pelas diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i>	29
5.5- Análise imunoistoquímica da expressão de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, no pulmão de camundongos infectados por diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> na fase aguda (28 dpi)	31
6- DISCUSSÃO	38
7- CONCLUSÃO	43
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1 – Interação da <i>M. tuberculosis</i> (Mtb) com o sistema imunitário	4
Figura 2 – Citocinas envolvidas na imunidade contra micobactéria	6
Figura 3 – Estrutura das metaloproteinases de matriz 2 e 9	11
Figura 4 – Estrutura da metaloproteinase de matriz 12	12
Figura 5 – Papel das MMPs na progressão da formação de granulomas	13
Figura 6 – Análise zimográfica de MMP-2 no sobrenadante de cultura das células pulmonares, obtidas de camundongos na fase aguda de infecção por Mtb (28 dpi) e cultivadas <i>ex vivo</i> por 48h	24
Figura 7 – Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de cultura das células pulmonares, obtidas de camundongos na fase aguda de infecção por Mtb (28 dpi) e cultivadas <i>ex vivo</i> por 48h	25
Figura 8 – Análise zimográfica de MMP-2 no sobrenadante de células pulmonares obtidos de camundongos após 120 d p.i. com diferentes cepas Mtb	26
Figura 9 – Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de células pulmonares obtidos de camundongos após 120 d p.i. com diferentes cepas Mtb	27
Figura 10 – Análise zimográfica de MMP-12 no sobrenadante de culturas das células pulmonares obtidas de camundongos infectados por Mtb na fase aguda (28 dpi) ou fase crônica (120 dpi) da infecção	28
Figura 11 – Análise zimográfica de MMP-2 no sobrenadante de macrófagos BMDM infectados pelas cepas Mtb por 48h	30
Figura 12 – Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de macrófagos BMDM infectados pelas cepas Mtb por 48h	31
Figura 13 – Análise imunoistoquímica de expressão de MMP-2 (A-G) e MMP-9 (H-N) no pulmão de camundongos infectados por cepas de Mtb na fase aguda da infecção, 28 dpi	35

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1- Metaloproteinases de matriz, gelatinases e elastase	10
Tabela 2- Cepas micobacterianas com diferentes graus de virulência utilizadas neste trabalho	17
Tabela 3- Análise imunoistoquímica de imunolocalização de MMP-2 no pulmão de camundongos infectados por cepas Mtb, 28 dias após infecção (fase aguda)	36
Tabela 4- Análise imunoistoquímica de imunolocalização de MMP-9 no pulmão de camundongos infectados por cepas de Mtb, 28 dias após infecção (fase aguda)	37

ABREVIATURAS

AIDS – *Acquired Immunodeficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

APMA – *4-aminophenylmercuric acetate* (acetato 4-aminofenilmercúrico)

BAAR – Bacilo Ácido-Álcool Resistente

BCG – Bacilo Calmette-Guérin

BMDM – *Bone Marrow-Derived Macrophages* (Macrófagos Derivados de Medula Óssea)

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

CCL5 – *Chemokine (C-C motif) Ligand 5* (Ligante de Quimiocina Motivo 5)

CFU – *Colony-Forming Unit* (Unidade Formadora de Colônia)

CO₂ – Dióxido de Carbono

CSF – *cerebrospinal fluid* (fluido cerebroespinal)

CXCL10 – *Motif Chemokine 10* (Quimiocina Motivo 10)

DMEM-F12 – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium F-12* (Meio Dulbecco's Modificado F-12)

dpi – *days post infection* (dias após infecção)

HCl – Ácido Clorídrico

HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

IFN- γ – Interferon gamma

IGR1 – *Immune Reponsive Gene 1* (Gene Responsivo Imune 1)

IL – Interleucina

kDa – Kilodaltons

LAM – Lipoarabinomana

LJ – Meio Lowenstein-Jensen

MCP-1/CCL2 – *Monocyte chemoattractant protein-1* (proteína quimiotática de monócito-1), / *chemokine (C-C motif) ligand 2* (quimiocina motivo 2)

MEC – Matriz Extracelular

MMP – Metaloproteinase de Matriz

Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*

Mtbhsp60 – *Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 60* (Proteína de Choque Térmico *Mycobacterium tuberculosis* 60)

μl – Microlitros

NaCl – Cloreto de Sódio

NaN₃ – Azida Sódica

NO – Óxido Nítrico

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Salina Fosfatada Tamponada)

RPMI – meio Roswell Park Memorial Institute

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel* (Gel de Dodecil Sulfato de Sódio de Poliacrilamina)

SFB – Soro Fetal Bovino

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

TB – Tuberculose

Th – *T helper cells* (Linfócitos T auxiliares)

TIMPs – *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (Inibidor Tecidual de Metaloproteinases)

TLR – *Toll-like Receptor* (Receptor tipo Toll)

TNF-α – *Tumour Necrosis Factor α* (Fator de Necrose Tumoral α)

WT – *Wild type* (Tipo Selvagem)

RESUMO

Tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que continua matando 2 milhões de indivíduos anualmente. Durante a TB pulmonar, o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) induz a degradação da matriz extracelular pulmonar, que é mediada por enzimas metaloproteinases de matriz, MMPs, produzidas por macrófagos infectados. A degradação da matriz, que facilita o recrutamento de células inflamatórias e a formação de granulomas, favorece a reprodução inicial da micobactéria, sua disseminação no organismo hospedeiro e posterior transmissão para outros indivíduos. As cepas de Mtb mais virulentas induziram em animais infectados uma patologia mais severa e maior disseminação intra e extrapulmonar. Para verificar se a maior virulência dos isolados clínicos de Mtb está associada com sua capacidade de induzir maior expressão das gelatinases MMP-9 e MMP-2 e elastase MMP-12 nos macrófagos, nós avaliamos a produção dessas enzimas por macrófagos infectados *in vitro* ou por células pulmonares *ex vivo*. As culturas dos macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) e os camundongos C57BL/6 foram infectados com isolados clínicos de Mtb e *M. bovis* de graus de virulência diferentes ou pela cepa Mtb de referência, cepa H37Rv. A atividade de MMPs nos sobrenadantes das culturas dos macrófagos pulmonares e BMDM foi verificada através de zimografias das enzimas imunoprecipitadas. Além disso, a expressão e imunolocalização das gelatinases no pulmão infectado foram estudadas através dos testes de imunoistoquímica, IHC. Os resultados obtidos demonstram que macrófagos infectados *in vitro* com cepas mais virulentas expressam mais MMPs em comparação com células de animais controle (não infectados) ou infectados com cepas menos virulentas. Entretanto, em testes *ex vivo*, a correlação entre virulência e ativação das MMPs foi mais complexa. A cepa Mtb de referência H37Rv de virulência relativamente baixa, induziu nas células de pulmão altas concentrações de gelatinases, similares àquelas induzidas pelas cepas hipervirulentas. Os resultados demonstram que a atividade de MMPs é um dos fatores que contribui para a patogenia da TB, e todas as cepas patogênicas Mtb induzem produção dessas enzimas. Entretanto, outras habilidades intrínsecas de micobactéria, como maior crescimento intracelular, indução da morte necrótica de macrófagos e resistência a imunidade são determinantes para a severidade da patologia na tuberculose.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is an infectious disease that continues to kill 2 million people annually. During pulmonary TB, the bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) induces pulmonary extracellular matrix degradation, which is mediated by matrix metalloproteinase enzymes, MMPs, produced by the infected macrophages. The degradation of the matrix, which facilitates the recruitment of inflammatory cells and formation of granulomas, contributes to initial reproduction and dissemination of mycobacteria in the host organism and subsequent transmission to other individuals. The most virulent strains of Mtb have been demonstrated to induce more severe pathology in the infected animals and greater intra- and extrapulmonary dissemination. To verify if the higher virulence of clinical isolates of Mtb is associated with its ability to induce higher expression of gelatinases MMP-9 and MMP-2 and elastase MMP-12 in macrophages, we evaluated the production of these enzymes by macrophages and infected lung cells *in vitro* or *ex vivo*. The cultures of bone marrow-derived macrophages (BMDM) and C57BL / 6 mice were infected with clinical isolates of Mtb and *M. bovis* of different degrees of virulence or the reference Mtb strain, H37Rv. Activity of MMPs in culture supernatants of the BMDM cultures macrophages and lung cell cultures was verified by zymography analyses of immunoprecipitated enzymes. Furthermore, the expression and immunolocalization of gelatinases in the infected lung were studied by immunohistochemical tests, IHC. The results demonstrate that macrophages infected *in vitro* with highly virulent strains express and produce more MMPs more cells than the control animals (non infected cells) and those infected with less virulent strains. However, in the *ex vivo* tests, the correlation between virulence and activation of MMPs was more complex. The reference Mtb H37Rv strain of relatively low virulence, induced in lung cells high concentrations of gelatinases, similar to those induced by hypervirulents strains. The results demonstrate that the activity of MMPs is one of the factors that contributes to the pathogenesis of TB, and all pathogenic strains of Mtb induce production of these enzymes. However, other intrinsic abilities of mycobacteria, such as capacity to increased intracellular growth, induction of necrotic death of macrophages, resistance to immunity, determine severity of pathology in tuberculosis.

1 - INTRODUÇÃO

1.1- Tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pelas bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). A doença encontra-se em segundo lugar entre as doenças infecciosas com a maior taxa de mortalidade do mundo, perdendo apenas para a SIDA (AIDS). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a TB apresentou mundialmente em 2011, entre 8,5 – 9,2 milhões de casos, resultando em 1,2 – 1,5 milhões de mortes (incluindo mortes por TB em pacientes HIV- positivos (WHO, 2012).

De acordo com dados divulgados pelo Ministério da Saúde, no Brasil no ano de 2012 foram constatados 70.047 novos casos, representando um leve aumento em relação ao ano de 2011 que apresentou 69.245 novos casos. Desta forma, houve um aumento na taxa de incidência, que passou de 36,0 para 36,1 casos por 100 mil habitantes. A taxa de mortalidade em 2011 foi de 2,4/100 mil habitantes, e se manteve a mesma em 2012 (PORTAL DA SAÚDE, 2013). Na última década, o Brasil apresentou queda permanente na incidência da doença, como resultado da implantação em 2007 do Programa de Combate à Tuberculose.

Além do alto número de casos da TB na forma da doença ativa no mundo, os números de indivíduos infectados pela Mtb, mas sem manifestações clínicas da doença (forma latente da infecção), são ainda maiores, cerca de 2 bilhões de indivíduos, o que corresponde a 1/3 da população mundial. Cerca de 10% dos infectados desenvolverão TB durante sua vida, como resultado de falha da resposta imunitária antimicobacteriana que controla a bactéria em estado latente.

A vacina contra a tuberculose atualmente utilizada, denominada Bacillus Calmette Guérin (BCG), é uma cepa de *M. bovis* que foi atenuada pelos pesquisadores franceses Calmette e Guérin e pela primeira vez utilizada para vacinação de humanos em 1921. A vacina protege crianças contra formas mais severas da TB (meningite, TB miliar), porém, não impede que adultos desenvolvam a forma mais comum da doença, a tuberculose pulmonar. Além disso, a infecção natural com Mtb não protege o indivíduo contra uma reinfecção (KAUFMAN, 2001), demonstrando que as micobactérias tuberculosas podem superar a imunidade antimicobacteriana já desenvolvida no organismo hospedeiro. No início de 2013, foi lançado o resultado tão esperado do teste de eficácia da primeira vacina candidata contra TB, a vacina MVA85A, (TAMERIS *et al.*, 2013). Os dados de segurança da

vacina foram animadores, no entanto, a eficácia de proteção contra TB foi altamente decepcionante, apesar da alta indução da citocina protetora, interferon-gama (IFN- γ), nas crianças vacinadas. Estes dados reforçam a necessidade urgente da busca de novos biomarcadores, mais apropriados que o IFN- γ , para determinar a resposta imunitária protetora e, idealmente prever, a eficácia da vacina.

As bactérias do complexo *Mycobacterium tuberculosis* incluem as espécies: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, (incluindo BCG), *Mycobacterium africanum* e *Mycobacterium microti*. Estes organismos são aeróbios obrigatórios que crescem com mais sucesso em tecidos com alta concentração de oxigênio. O Mtb é uma bactéria intracelular facultativa que geralmente infecta fagócitos mononucleares e é de crescimento lento. Os bovinos são os hospedeiros mais comuns de *M. bovis*, mas a tuberculose bovina pode ser transmitida para humanos assim como para outros animais tais como suínos, bisões e cervos. A micobactéria não sobrevive quando exposta ao calor, a luz solar ou em ambientes secos, e não se replica fora do hospedeiro (ANGELA *et al.*, 2005).

Apesar das micobactérias serem gram-positivas, suas paredes celulares ricas em cera conferem a elas características únicas e assim são classificadas como bacilo álcool ácido resistentes (BAAR). A abundante parede celular de glicolípídeos, incluindo o lipoarabinomanana (LAM) e ácidos micólicos, é responsável pelas peculiaridades imunitárias, como a contribuição para a sobrevivência nos fagócitos do hospedeiro. Foi proposto que a escolha do receptor usado para entrar no macrófago (receptores de manose, receptores do complemento, receptores de proteína surfactante, CD14, e outros receptores de captura, ou *scavenger receptors*) influencia a resposta celular (COLLINS & KAUFMANN, 2001). A maioria destes receptores facilita a entrada intracelular de Mtb sem ativação adequada dos macrófagos. A ativação dos macrófagos pelas micobactérias depende da ligação dos componentes micobacterianos (ex. lipoproteínas da parede celular) com outra classe de receptores, os receptores de reconhecimento padrão (PRRs), tais como TLR2, que aciona cascatas de sinalização importantes para aumentar a atividade microbicida dos fagócitos (CREVEL *et al.*, 2002).

A TB afeta principalmente os pulmões, mas também pode afetar outros órgãos. A principal porta de entrada se dá por via aérea quando pessoas doentes com tuberculose pulmonar expõem a bactéria, como por exemplo, através da tosse. A tuberculose se desenvolve em pequena proporção de indivíduos, mas algumas

pessoas tem maior probabilidade de desenvolver a doença, como aquelas contaminadas com o vírus do HIV. Em geral, a tuberculose atinge indivíduos adultos em idade economicamente produtiva. Cerca de dois terços dos casos são estimados de ocorrer em pessoas de 15 – 59 anos (WHO, 2012).

1.2- Imunopatologia da Tuberculose

O pulmão é o local de infecção inicial onde a micobactéria se replica em macrófagos alveolares e se espalha para linfonodos de drenagem possibilitando a eventual disseminação da infecção para locais remotos no corpo. A tuberculose extrapulmonar corresponde a menos de 10% dos casos e afeta mais comumente o esqueleto, o sistema nervoso central e órgãos intra-abdominais. Por ser menos comum, a confirmação do diagnóstico bacteriológico da tuberculose extrapulmonar é mais difícil e procedimentos mais invasivos são requeridos para estabelecer o diagnóstico (DUNLAP *et al.*, 1999).

A resposta imunitária ao Mtb começa a partir da fagocitose da bactéria por macrófagos alveolares, que iniciam a inflamação local, produzindo citocinas e quimocinas pró-inflamatórias, e pelas células dendríticas, que são responsáveis pelo transporte dos antígenos micobacterianos aos linfonodos e apresentação aos linfócitos T. Após reconhecimento dos antígenos, os linfócitos T específicos, células T CD4⁺ e CD8⁺, migram para os pulmões e contribuem, junto com as células fagocíticas e linfócitos B, para a formação de granulomas primários, importantes para contenção bacteriana, mas que não erradicam a micobactéria do organismo completamente (ELKINGTON *et al.*, 2011) **(Figura 1)**.

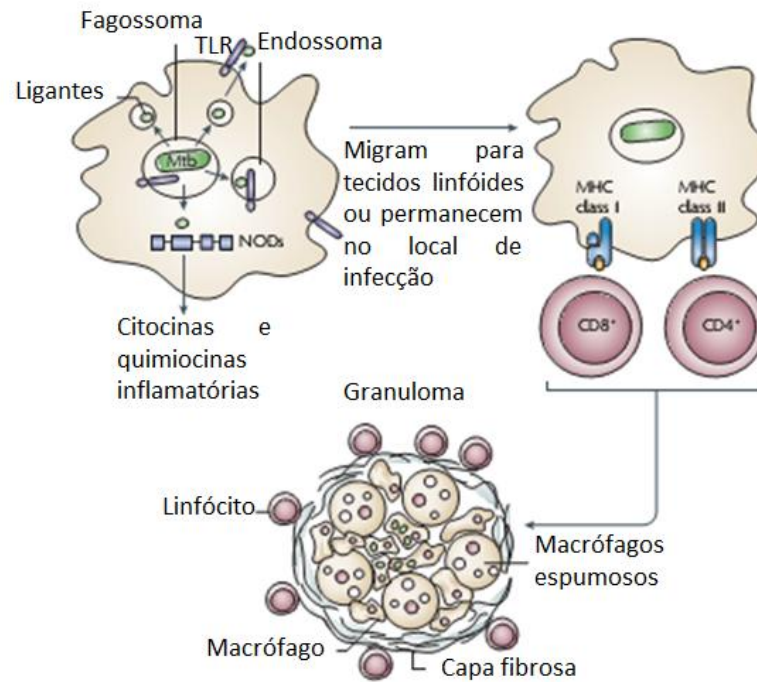


Figura 1: Interação da *M. tuberculosis* (Mtb) com o sistema imunitário (Modificada de HARDING & BOOM, *Regulation of antigen presentation by Mycobacterium tuberculosis: a role for Toll-like receptors*, 2010).

Os macrófagos no granuloma acumulam grandes quantidades de lipídeos micobacterianos através dos seus *scavenger receptors*, levando a transformação dos macrófagos em células espumosas ou *foamy cells* (**Figura 1**). A interação destes lipídeos com receptores nucleares específicos, como $PPAR\gamma$, *peroxisome proliferator-activated receptor* γ , leva a polarização alternativa dos macrófagos, promovendo um bloco da maturação de fagossoma com lisossomas por indução da interleucina-10 (IL-10) favorecendo a sobrevivência da Mtb (MAHAJAN *et al.*, 2012). A marca típica dos granulomas primários em pacientes humanos é o desenvolvimento de necrose caseosa intragranulomatosa central, devido ao acúmulo de material lipídico e as altas concentrações locais de citocinas pró-inflamatórias, como $TNF-\alpha$, o que não é típico para granulomas murinos, que normalmente são menos organizados (ELKINGTON *et al.*, 2011). A necrose intragranulomatosa foi observada somente nos camundongos infectados pelas cepas Mtb altamente virulentas (GIL *et al.*, 2006), demonstrando que as particularidades biológicas das cepas Mtb tem impacto na gravidade da patologia pulmonar induzida durante a tuberculose.

Em 90% dos casos de infecção em humanos, os granulomas cobertos com capa fibrótica e às vezes calcificados, permanecem no organismo do hospedeiro sem progressão para doença ativa. Entretanto, na maioria dos modelos murinos, a progressão lenta da patologia, na forma de doença crônica é observada. Os macrófagos espumosos acumulam em volta dos granulomas primários, ocupando grandes áreas (CÁCERES *et al.*, 2009). Essas células apresentam padrão de atividade alternativa (macrófagos M2), mantendo o nível da inflamação no pulmão relativamente baixo durante meses, o que favorece a persistência da bactéria intracelular em estado latente. A formação de granulomas secundários, compostos principalmente por linfócitos, também pode ser observada. Nas etapas terminais da doença, a maior parte do pulmão está comprometida como resultado da infiltração pelas células inflamatórias. Os macrófagos espumosos sofrem degradação, as bactérias voltam a crescer, causando uma reativação da inflamação, o que leva a morte do animal.

Foi sugerido (HUNTER, 2011) que a fase crônica avançada na tuberculose murina experimental é um modelo do início da reativação da tuberculose pós-primária nos humanos. Entretanto, existe uma grande diferença entre TB murina e TB humana nas consequências da reativação da doença. A reativação da inflamação em camundongos leva rapidamente a morte. No pulmão humano, a reativação leva a formação de cavidades como resultado da necrose e destruição do tecido pulmonar. Existem duas principais hipóteses em relação aos mecanismos de formação das cavidades. Acredita-se que a formação da cavidade é o resultado do crescimento de granulomas primários, com aumento da liquefação e caseação intragranulomatosa (DANNENBERG, 1984; YAMAMURA, 1958). Uma reação de hipersensibilidade em resposta ao excesso de antígeno bacilar que leva as células do hospedeiro a produzirem citocinas citotóxicas, radicais de oxigênio, enzimas hidrolíticas e metaloproteases de matriz (principalmente a colagenase MMP-1) que participam na degradação do tecido pulmonar (CHANG, 1996). Após a ruptura da parede bronquial, o tecido morto é eliminado em decorrência da tosse deixando as cavidades. Diferentemente dos humanos, os camundongos não produzem MMP-1 e a formação de cavidades não é típica. Outra hipótese é que a reativação da TB acontece na forma de pneumonia lipídica como resultado do acúmulo de macrófagos espumosos infectados, que carregam grandes quantidades de lipídeos e antígenos micobacterianos. Um destes antígenos- *cord factor* (trehalose 6,6- dimycolate, TDM)

é um fator que após contato com gotículas lipídicas torna-se muito tóxico, provocando necrose caseosa e acionando outros mecanismos, já descritos, que levam a formação das cavidades (HUNTER, 2011).

Fagócitos mononucleares possuem múltiplas funções na patofisiologia da tuberculose. Macrófagos alveolares são hospedeiros da bactéria intracelular, além de acessório celular para indução da resposta imunitária, células efetoras que levam a micobactéria à morte, e um alvo para linfócitos T citotóxicos (CTL). Células T CD4⁺ possuem um importante papel na resposta imunitária contra a micobactéria. Após o reconhecimento dos antígenos micobacterianos, essas células podem se diferenciar em linfócitos T auxiliares 1 (Th1) que secretam IFN- γ , um fator central na ativação das funções antimicobacterianas de macrófagos (WALLIS *et al.*, 1990) (**Figura 2**).

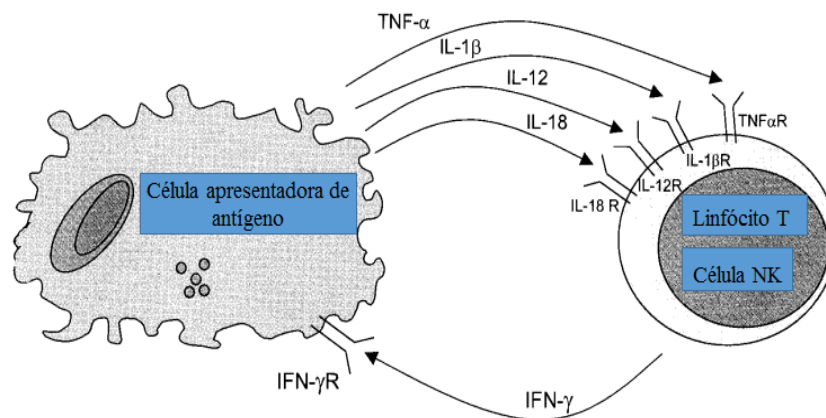


Figura 2: Citocinas envolvidas na imunidade contra micobactéria. (Modificada de CREVEL *et al.*, *Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis*, 2002).

A ativação de células da resposta imunitária inata como macrófagos e células dendríticas pelo Mtb é sinalizada por receptores de reconhecimento padrão na superfície celular e no citoplasma. Receptores tipo toll, TLR2 e TLR4, podem modular a resposta imunitária de linfócitos T através da regulação da expressão de citocinas pró ou antiinflamatórias dependendo do ligante. Acredita-se que a interação da proteína de choque térmico Mtbhsp60, estimuladora da produção de citocinas em macrófagos, com o TLR2 leva a uma predominância na produção de IL-10, citocina antiinflamatória, enquanto que a interação com o TLR4 estimula predominantemente a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (PARVEEN, 2013).

1.3- Impacto da virulência da micobactéria na patogenia da tuberculose

Virulência pode ser definida como a capacidade de um micro-organismo de provocar um processo patológico no macro-organismo, a doença, escapando das defesas do hospedeiro (SILVER *et al.*, 1998). A virulência micobacteriana é tradicionalmente determinada com base nos índices de mortalidade e morbidade nos modelos animais, onde é avaliado o percentual de animais (por exemplo, camundongos) infectados que morrem e o tempo que este animal leva para morrer; a quantificação do número mínimo de bactérias capaz de induzir a doença, assim como o número de bactérias e mudanças histopatológicas encontradas no hospedeiro após a infecção inicial e no decorrer do período da doença (SMITH, 2003). A utilização dos modelos animais de infecção é importante para estudos de mecanismos e fatores que determinam maior virulência de algumas cepas de Mtb, como cepas Mtb de genótipo Beijing.

As diferenças genéticas entre as linhagens de micobactérias determinam a variação na virulência bacteriana e diferenças na resposta imunitária induzida no organismo do hospedeiro infectado, o que determina diferenças na patologia e gravidade da doença. As cepas do genótipo Beijing, originadas da China, pertencem a sublinhagem 2 de seis sublinhagens filogenéticas de *M. tuberculosis* identificadas atualmente (GAGNEUX *et al.*, 2006), mostraram-se mais virulentas em modelos murinos de infecção quando comparadas com as cepas de outros genótipos (LÓPEZ *et al.*, 2003). Além disso, as cepas Beijing, apresentaram maior patogenicidade em pacientes com TB, provocando uma progressão mais rápida da infecção tuberculosa para doença ativa (HANEKOM *et al.*, 2007). Estes dados sugerem que as cepas da família genética Beijing são mais competitivas em comparação com outras famílias genéticas de Mtb, o que pode explicar sua maior dispersão no mundo e aumento da sua prevalência em algumas regiões, como África do Sul, países da antiga União Soviética, incluindo a Rússia, Vietnã, Indonésia e, recentemente, Peru (IWAMOTO *et al.*, 2012) e Moçambique (VIEGAS *et al.*, 2011).

1.4- Matriz extracelular e metaloproteinases de matriz

Todas as células nos tecidos tem contato próximo com a matriz extracelular (MEC). A MEC é bem conhecida por sua habilidade de fornecer suporte estrutural para órgãos e tecidos, para camadas celulares na forma de membranas basais, e para células individuais como substrato para migração (HYNES, 2009). A MEC consiste de proteínas, como colágeno, fibronectina e vitronectina e vários componentes não protéicos, dentre eles a hialurona. As proteínas são compostas de muitos domínios que são frequentemente repetidos em uma mesma molécula ou apresentam ligações filogenéticas com domínios de outras proteínas. A natureza multifuncional das proteínas da MEC é um reflexo direto de sua arquitetura modular (HOENESTER & ENGEL, 2002).

A carga negativa de muitas das moléculas da MEC, em particular dos proteoglicanos, e a ampla área que ela ocupa nos tecidos, fornece grande potencial para interações com outras moléculas carregadas, como fatores de crescimento e quimiocinas, influenciando assim a concentração local ou a acessibilidade desses fatores. Como uma estrutura insolúvel altamente organizada, a MEC pode, de modo espacialmente padronizado e regulado, fazer parte e entregar múltiplos sinais complexos para leucócitos que afetam seus comportamentos em tecidos inflamados (HYNES, 2009).

A migração de leucócitos aos locais de inflamação requer a interação de componentes da matriz com mediadores da resposta imunitária que fornecerão sinais necessários para adesão leucocitária e sua ativação. Moléculas como as proteoglicanas tem papel importante na modificação do comportamento de células do estroma e do sistema imunitário em pulmões com inflamação. As proteoglicanas também contribuem para emigração de leucócitos em tecidos através de interações com citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (GILL *et al.*, 2010).

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma família de endopeptidases zinco dependentes que degradam componentes da matriz extracelular como colágeno, gelatina, mielina, laminina, fibronectina e elastina (GIBBS *et al.*, 1999; SANG & DOUGLAS, 1996). Mais de 25 membros da família foram descritos. Estas enzimas estão classificadas em quatro subclasses principais que se relacionam a especificidade de seu substrato: collagenases, estromelisinases, gelatinases e metaloproteinases tipo membrana (MT-MMP) (HAUTAMAKI *et al.*, 1997).

Estruturalmente, MMPs são enzimas de multi-domínios. Todas elas possuem três domínios em comum: o domínio catalítico, o pré-domínio N-terminal e o pró-domínio. O domínio catalítico possui um íon zinco no sítio ativo, que é essencial para a atividade proteolítica. O pré-domínio é um sinal de peptídeo que ativa a secreção e é clivado assim que a MMP recém sintetizada viaja para a superfície da célula. O pró-domínio contém um único resíduo de cisteína junto a uma sequência conservada inibitória, a qual está coordenada com o íon zinco catalítico e assim mantém a enzima em forma latente. Alguns domínios adicionais são ligados a estrutura comum a várias MMPs (MASTROIANNI *et al.*, 2007) **(Figuras 3 e 4)**.

MMPs são geralmente secretadas como precursores inativos (pró-enzimas ou zimogênios) por uma variedade de tipos celulares, incluindo leucócitos, células epiteliais, neurais e células tumorais. Estas enzimas são ativadas após a remoção do pró-domínio no espaço extracelular ou pericelular em resposta a vários indutores como citocinas, fatores de crescimento, agentes químicos e substâncias fisiológicas, por exemplo, íons metálicos, espécies reativas de oxigênio e hormônios (STEEN *et al.*, 2002; NAGASE, 1997).

In vivo MMPs são inibidas por seus inibidores naturais – inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs), que se ligam à MMP formando complexos não-covalentes, e por α -macroglobulina (GOMES *et al.*, 1997). Assim, a remodelação da MEC é o resultado da carga local das proteases ativadas, ou seja, o saldo líquido entre as enzimas e inibidores.

Foi demonstrado que os leucócitos mononucleares produzem MMPs junto com os TIMPs (OPDENAKKER *et al.*, 2001). Diferentemente dos mononucleares, os neutrófilos produzem algumas MMPs (MMP9, MMP8) constitutivamente, mas não produzem MMP2 e TIMPs. MMPs de neutrófilos estão estocadas em grânulos especializados, denominados grânulos gelatinase, mobilizados rapidamente quando neutrófilos estabelecem contato com endotélio ativado (secreta mediadores inflamatórios). Portanto, liberação de gelatinase dos grânulos é essencial para migração dos neutrófilos através das membranas basais (BORREGAARD & COWLAND, 1997).

O balanço entre MMP e TIMP regula a atividade enzimática em condições fisiológicas. Uma expressão excessiva ou inapropriada de MMP e/ou uma diminuição na produção de TIMP pode contribuir para diferentes condições patológicas, incluindo inflamação, ferimentos, invasão de células cancerígenas e

doenças infecciosas (CAUWE *et al.*, 2007; YOON *et al.*, 2003; ELKINGTON *et al.*, 2005). Em particular, MMPs tem papel importante na resposta imunitária normal contra infecção degradando a MEC para migração de leucócitos e modelando a atividade de citocinas, quimiocinas e defensinas. Portanto, a secreção desbalanceada entre MMP e TIMP após a infecção tem sido envolvida no dano tecidual, disseminação microbiana e associada a imunopatologia. O envolvimento patogénico de MMPs tem sido descrito em várias doenças infecciosas, incluindo infecção por micobactéria, meningite bacteriana, choque endotóxico, hepatite B e na infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV) (ELKINGTON & FRIEDLAND, 2005).

Duas gelatinases, MMP-2 e MMP-9, tem a habilidade de degradar o colágeno nativo tipo IV nas membranas basais e o colágeno tipo I que já está parcialmente desnaturado (gelatina). Tanto células inflamatórias circulantes, como residentes, tem a capacidade de sintetizar MMP-9, enquanto a MMP-2 é constitutivamente expressa principalmente por fibroblastos e células endoteliais em baixas concentrações (GIBBS *et al.*, 1999). Em geral, as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ aumentam a expressão de MMP-2 e de MMP-9, enquanto a citocina antiinflamatória IFN- β reduz as expressões destas enzimas e aumenta a expressão dos inibidores, TIMP-1 e -2 (BEN-HUR *et al.*, 2006) (**Tabela 1**).

Enzima	Nome	Latente/ativa (KDa)	Substrato fisiológico principal	Principais células produtoras
MMP-2	Gelatinase A	72/66	Colágenos I, III, IV, V, VII, X, XI, XIV; gelatinas, Agg, FN, PG, EI, Pg, VN, LM, inibidor de proteinase a1, proTNF- α , proMMP-1, 9, 13	Fibroblastos, células endoteliais, condrócitos, leucócitos, células dendríticas, queratinócitos, células da glia, osteoblastos, odontoblastos e células tumorais
MMP-9	Gelatinase B	92/86	Gelatinas, colágenos IV, V, VII, X, XIV; MBP, EI, FN, Agg, Pg, proTNF- α , CXCL5, CXCL6, angiotensina-1, substância P, inibidor de proteinase a1, VN	Células mononucleares, neutrófilos, condrócitos, células da glia, osteoclastos, células dendríticas, células endometriais, queratinócitos, odontoblastos e células tumorais
MMP-12	Elatase de macrófago	54/45/22	Colágenos I, IV; Agg, EI, PG, caseína, FN, gelatina, FG, inibidor de proteinase a1, VN	Células endoteliais, macrófagos, astrócitos, condrócitos, osteoclastos e células dendríticas

Tabela 1: Metaloproteinases de matriz, gelatinases e elastase.

A MMP-9 ou gelatinase B, tem papel essencial em doenças infecciosas. A enzima que possui 92kDa, cliva o colágeno tipo IV, principal componente da base de membranas nos vasos, alvéolos, etc., permitindo a migração leucocitária para o local da infecção. Em baixas concentrações, citocinas agem localmente por mecanismos tanto autócrinos, como parácrinos, mas caso suas concentrações aumentem elas parecem exercer efeitos endócrinos em locais distantes. Levando em consideração que a indução de MMP-9 em pacientes com tuberculose não é restrita ao local da infecção, pode-se assumir que o nível aumentado de MMP-9 também será visível na circulação, presumivelmente como resultado do estímulo de leucócitos circulantes liberados por citocinas de macrófagos ativados (HRABEC *et al.*, 2002).

A MMP-2 ou gelatinase A, é secretada na pró-forma inativa: quando ela é convertida para a forma ativa de 62kDa ela é capaz de degradar colágeno tipo IV e V, laminina e elastina. Em células intactas, a MMP-2 é ativada na superfície celular em um processo envolvendo a interação do componente C-terminal através de um mecanismo de ativação da membrana plasmática (MURPHY *et al.*, 1992; WARD *et al.*, 1994; OVERALL & SODEK, 1990). A exposição de monócitos a citocina IFN- γ pode levar a indução da atividade proteolítica da MMP-2, que por sua vez pode aumentar a capacidade invasiva de células do sistema imunitário (GALBOIZ *et al.*, 2002). Ela difere das demais MMPs pelo fato de seu domínio catalítico conter inserções ricas em cisteínas que se assemelham a regiões ligantes de colágeno de repetições tipo II na fibronectina (KLEIN & BISCHOFF, 2011).



Figura 3: Estrutura das metaloproteinases de matriz 2 e 9. (Modificada de PARKS *et al.*, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*, 2004)

A metaloelastase de macrófago 12 ou MMP-12, uma pró-enzima de 54kDa, que é ativada através da clivagem proteolítica nas formas ativas de 45 e 22kDa, está mais relacionada a resposta Th2 (controle da infecção), pois está envolvida na migração celular, reparação e remodelamento tecidual. Ela também tem papel na inflamação das vias aéreas por estimular a migração de células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, para locais de inflamação e no remodelamento por

degradar elastina do pulmão através de sua atividade enzimática (CHURG *et al.*, 2003).

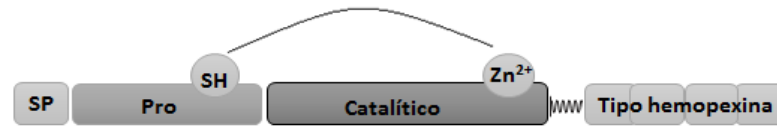


Figura 4: Estrutura da metaloproteinase de matriz 12. (Modificada de PARKS *et al.*, *Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity*, 2004)

A importância da produção e ativação das MMPs por células pulmonares durante a tuberculose e seu impacto na patologia estão sobre intensa pesquisa. Foi demonstrado que a MMP-9 juntamente com a proteína quimiotática de monócitos-1, a MCP-1, tem papel importante no recrutamento de macrófagos para os pulmões durante o desenvolvimento de granulomas. Além disso, a degradação da MEC por MMP-9 e MMP-2 é um fator importante que facilita o escape das bactérias extracelulares, liberadas por macrófagos necróticos, para corrente sanguínea e disseminação para órgãos extrapulmonares (TAYLOR *et al.*, 2006). Elevadas concentrações de MMP-9 foram encontradas no fluido cerebrospinal (CSF) e no tecido cerebral na meningite tuberculosa, que foram correlacionadas com a neuropatologia local e morte (HARRIS *et al.*, 2007). Foi sugerido que as gelatinases, que degradam o colágeno do tipo IV, podem contribuir para a perda de integridade da membrana basal em torno dos vasos sanguíneos e sob a camada de mesotélio da pleura, facilitando a disseminação hematogênica da bactéria e levando ao acúmulo de líquido no espaço pleural causando a tuberculose pleural (SHEEN *et al.*, 2009).

Além disso, várias evidências implicam a atividade das MMPs na destruição do tecido pulmonar, levando à formação das cavidades. As cepas de Mtb virulentas induzem a expressão e a produção da MMP-1 (colagenase intersticial) por macrófagos humanos que, diferentemente das outras MMPs, pode contribuir para a degradação da rede fibrilar do colágeno do pulmão, efetivamente destruindo a matriz pulmonar (**Figura 5**).

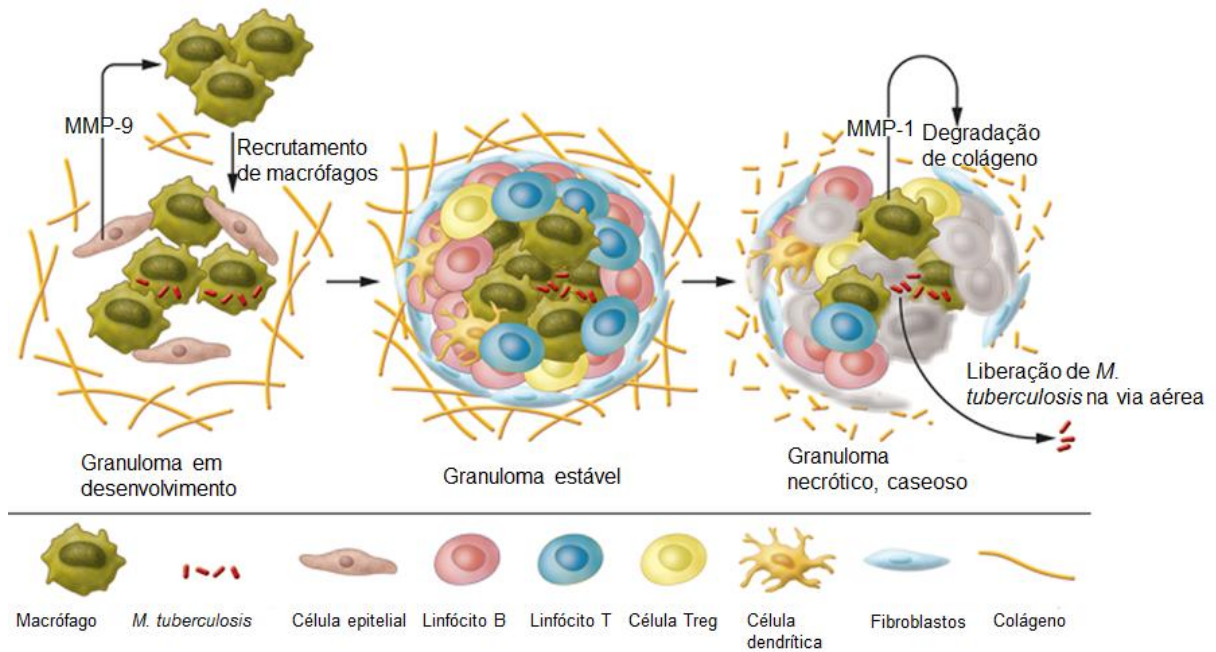


Figura 5: Papel das MMPs na progressão da formação do granuloma (Modificada de SALGAME, *MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers*, 2011)

Provavelmente devido a ausência de um homólogo funcional da MMP-1 nos camundongos, estes animais não desenvolvem cavidades na tuberculose experimental (ELKINGTON *et al.*, 2011).

Estes trabalhos demonstram a importância do papel das MMPs na patologia relacionada a tuberculose. Entretanto, o impacto da virulência bacteriana, que pode variar entre diferentes cepas de *Mtb*, na indução das MMPs e seu papel na severidade da patologia induzida ainda não foram estabelecidos.

2 – JUSTIFICATIVA

Metaloproteinases de matriz (MMPs) tem papel importante na imunidade inata e adaptativa, afetando a resposta imunitária diretamente através da ativação ou desativação proteolítica das citocinas e quimiocinas e participação no recrutamento de leucócitos para locais onde haja inflamação. Logo, a função de MMP no processo de uma doença infecciosa deve ser investigada para determinar se estas enzimas estão envolvidas na patogênese da doença. O papel de MMP na patogenia da tuberculose (disseminação extrapulmonar de micobactérias, formação de granulomas e cavidades no pulmão) foi bem estabelecido. Entretanto, a relação entre virulência de cepas de Mtb e a ativação de MMP durante a infecção micobacteriana ainda não foi bem investigada.

As cepas Mtb mais virulentas provocam no modelo experimental de camundongos uma doença mais grave de progressão rápida, diferentemente das cepas menos virulentas, que provocam uma doença crônica, de progressão lenta. Os modelos de TB de progressão rápida e lenta já foram estabelecidos no nosso laboratório. A verificação da produção de MMP nas diferentes fases da doença provocada por Mtb e sua contribuição à patologia está entre os objetivos deste trabalho. Este estudo deve contribuir para o esclarecimento dos mecanismos de patogenia provocados por micobactérias de virulência elevada e a possibilidade do uso de MMP como alvo de intervenção terapêutica utilizando inibidores de MMP.

3 - OBJETIVOS

3.1- Objetivo Geral

Avaliar o papel das metaloproteinases de matriz (MMP-2, MMP-9 e MMP-12) em camundongos infectados com cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) com diferentes graus de virulência.

3.2- Objetivos Específicos

- Selecionar diferentes cepas de *Mtb*, com genótipos diferentes, de acordo com sua virulência;
- Infectar camundongos C57BL/6 com cepas de *Mtb* com diferentes graus de virulência;
- Quantificar as MMPs produzidas pelas células do pulmão (*ex vivo*) dos camundongos infectados com cepas de *Mtb* com graus de virulência diferentes;
- Quantificar as MMPs produzidas por macrófagos derivados de medula óssea (*in vitro*) infectados com cepas de *Mtb* com diferentes graus de virulência;
- Avaliar a formação de granulomas e particularidades de histopatologia em camundongos infectados com cepas de *Mtb* com diferentes graus de virulência;
- Avaliar a ativação de MMP *in situ* no pulmão dos camundongos infectados, utilizando métodos imunistoquímicos.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- Cultura de células

Neste trabalho, para infecção foram utilizados macrófagos diferenciados a partir de medula óssea obtidos de camundongos C57BL/6.

Macrófagos foram obtidos de medula óssea (BMDM – bone marrow derived macrophages) do fêmur de camundongos C57BL/6. As células de medula óssea foram incubadas *overnight* em meio DMEM-F12 completo e as células não-aderentes foram coletadas e transferidas para outro frasco para cultivo em meio de diferenciação de macrófagos. As células foram cultivadas em meio DMEM- F12, contendo 10% de SFB, 20% de meio de cultura da linhagem celular L929 (fonte de M-CSF), na presença de 0,005% de gentamicina, durante 7 dias.

Para infecção com micobactéria nos ensaios realizados, as células foram plaqueadas *overnight* antes dos experimentos, sendo deixadas em meio sem soro SFB, para que componentes do soro não influenciassem as atividades de MMP-12, MMP-9 e de MMP-2.

4.2- Micobactérias

Nos experimentos foram utilizadas cepas Mtb da coleção dos isolados clínicos dos pacientes com TB do Brasil e Moçambique e cepas *M. bovis*, obtidas de bovinos com TB, já caracterizadas nos trabalhos anteriores (LASUNSKAIA *et al.*, 2010, ANDRADE *et al.*, 2012, RIBEIRO, 2013) e mantidas no Laboratório de Biologia do Reconhecer congeladas a -70°C. As cepas foram descongeladas e cultivadas em 5mL de meio Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit, MI), acrescido de 0,05% Tween 80 e 10% de suplemento albumina, dextrose, catalase (ADC) (BD Sparks, MD). No meio de cultura de *M. bovis* foi acrescentado piruvato de sódio na concentração final de 0,4%. As culturas foram crescidas até a fase mid-log em estufa (CELLSTAR EQUIPAMENT) à 37°C e 5% de CO₂ por 7dias com agitação diária. O monitoramento do crescimento foi feito por mensuração de densidade óptica (DO) através de espectrofotometria (HITACHI – modelo U-1100) (DO 600nm).

Após 7 dias de cultivo, as culturas em suspensão foram agitadas no vórtex (BIOMATIC) e sonicadas em banho ultrassom (Ultrasonic Maxi Cleaner 800-

UNIQUE) por 1min para separação dos grumos de micobactéria. O ajuste de concentração de micobactérias utilizadas nos experimentos foi feito através de leitura prévia de 1mL de meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 em espectrofotômetro a 600nm, seguido de diluição das culturas obedecendo-se o critério de relação da densidade óptica *versus* número de bacilos (DO 0,066 x 2×10^7 bacilos/mL- para as cepas de *M. bovis* e DO 0,100 x 2×10^7 bacilos/mL) para cepas de *M. tuberculosis*.

Tabela 2- Cepas micobacterianas com diferentes graus de virulência utilizadas neste trabalho

Grupo	Virulência (determinada no modelo de infecção dos camundongos, Ribeiro SM, 2007)	Cepas
1	hipervirulência	MP287 <i>M.bovis</i>
2	elevada	B2 <i>M. bovis</i> M299 Mtb 2172 1777 1471
3	intermediária	Zt264 Mtb Zt272 M467
4	relativamente baixa	H37Rv Mtb M442

4.3- Animais

Os camundongos C57BL/6 foram adquiridos de fornecedores credenciados (Biotério USP, IBC) e mantidos em microisoladores (estantes ventiladas) no biotério de biossegurança reforçada, NB3, do Biotério Central da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF) em ambiente climatizado com temperatura controlada 25°C. Em cada gaiola ficam no máximo 05 animais da mesma idade e

gênero para minimizar o estresse. Os animais receberam ração autoclavada e água filtrada em bebedouros.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética de Pesquisa em Animais de Laboratório e de Biossegurança do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB) da Universidade Estadual do Norte Fluminense. Protocolo nº 198 do ano de 2012.

4.4- Infecção experimental dos animais

Os camundongos C57BL/6 WT com idade entre 8 a 10 semanas foram anestesiados com uma mistura de Anazedan – xilazina (15mg/kg - Vetbrands) e Dopalen – ketamina (110mg/kg - Vetbrands), sendo diluídos em solução salina estéril e aplicados, em temperatura ambiente, um volume de 90 μ L via intraperitoneal. Em seguida, os animais anestesiados foram submetidos a injeção intratraqueal de bactéria. Após uma pequena incisão da pele, a traquéia foi exposta para receber 60 μ L da suspensão bacteriana (10^2 bacilos) através de injeção intratraqueal utilizando seringa para injeções da insulina de 1mL. Os animais controles receberam 60 μ L de PBS estéril. Após a injeção, a pele foi suturada com um ponto de sutura utilizando linha cirúrgica estéril.

Os animais foram mantidos durante 120 dias após a infecção sob observação, registrando comportamento e sinais de doença (perda de apetite, agitação ou letargia). Após 28 e 120 dias, os animais infectados foram eutanasiados por inalação de CO₂. Para testes histológicos, os lóbulos superiores direito dos pulmões dos camundongos infectados pelas diferentes cepas micobacterianas e dos animais não infectados (controle) foram retirados e transferidos para solução de formol a 10% para posterior análise. Para coleta de células pulmonares, os lóbulos pulmonares restantes foram retirados, acondicionados em meio RPMI (Gibco), pesados, cortados em pequenos fragmentos e transferidos em um tubo de digestão contendo enzima (Colagenase 3 μ g/mL e DNAse 1 μ g/mL em meio RPMI) para cada amostra e, em seguida, incubados a 37°C, sob agitação constante, durante 50 minutos. O tecido foi dissociado com auxílio de seringa e agulha e posteriormente peneirado em cell strainer, 40 μ m (BD Bioscience) a fim de separar as células da matriz tecidual. Foi adicionado tampão de lise para eritrócitos e após 4 minutos foi adicionada uma solução de tampão fosfato salino (PBS) com 10% de soro fetal bovino (SFB). As

amostras celulares foram centrifugadas por 5 minutos a 1200rpm e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI com 10% de SFB e 0,005% de gentamicina, contadas na câmara de Newbauer e plaqueadas em placas de 6 poços a 3×10^6 células por poço, e mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C. A coleta do sobrenadante foi feita 48h após o plaqueamento para avaliação da atividade enzimática. O sobrenadante de cultura coletado foi filtrado utilizando *Spin-X* estéril de 0,22µm (Corning, NY), aliqotado e congelado a -70°C.

4.5- Anticorpos e reagentes

Anticorpos anti-MMP-9 (MMP-9 c-20, IgG de cabra SC-6840), anti-MMP-2 (MMP-2 h-76, IgG de coelho SC-10736), anti-MMP-12 (MMP-12 m-19, IgG de cabra SC-8839) e a proteína A/G plus agarose (reagente de imunoprecipitação SC-2003) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology.

4.6- Zimografia

Os ensaios de zimografia foram executados para determinar a atividade gelatinase das metaloproteinases (MMP-12, MMP-9 e MMP-2). Os sobrenadantes das culturas celulares foram submetidos a imunoprecipitação com anticorpos anti-MMP-2, anti-MMP-9 ou anti-MMP-12 e analisados por zimografia. Na preparação das amostras, foram utilizados 15µL da proteína A/G Plus Agarose (Santa Cruz Biotechnology, CA) que foi lavada com tampão de ligação/lavagem, 200µL (PBS 0,1M pH 7,0, NaCl 0,15M, EDTA 0,5mM), centrifugada (CENTRIFUGE 5415R - Eppendorf) por 10 minutos a 11.000rpm, e o sedimento da agarose foi ressuspensão em 15µL do anticorpo de interesse (MMP-2, -9 ou -12) e incubado por 2 horas em agitação em temperatura ambiente. As amostras dos sobrenadantes, 250µL, foram adicionadas ao sistema e incubadas *overnight* a 4°C, em agitação. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 11.000rpm por 10 minutos, o sobrenadante é descartado e adiciona-se tampão de amostra sem β-mercaptoetanol. O gel de poliacrilamida [H₂O destilada; Bis 30%; 1,5 Tris/0,5 Tris (gel de empacotamento); 10% SDS; 10% APS; Temed] foi utilizado para eletroforese na concentração de 8% para MMP-2 e -9 e a 10% para MMP-12 com 0,1% de gelatina. Após a corrida, o gel foi lavado três vezes com tampão de lavagem (Tris-HCL 50mM

pH 7,5 e Triton x100 2,5%) e posteriormente incubado com tampão de incubação (Tris-HCL 50mM pH 7,5, Triton x100 1%, CaCl₂ 10mM, NaCl 150mM e NaN₃ 10⁻¹mg/mL) e deixado por 48 horas na estufa a 37°C e 5% de CO₂ para que ocorra a ação gelatinolítica de MMPs. Depois, o gel foi corado por 1 hora com o corante Coomassie Blue R-250 0,05%, em seguida, descorado com uma solução composta de 40% de metanol e 10% de ácido acético e, finalmente, foi feita a análise densitométrica das bandas correspondentes a lise da gelatina pela enzima ativa e pela pró-enzima de cada uma das metaloproteinases de matriz. As imagens dos géis foram obtidas com o auxílio do Molecular Imager Gel Doc XR with Image Lab Software. As análises densitométricas da intensidade das bandas foram obtidas com o software Image J para Windows (NIH, Bethesda, MD). Foi verificada a relação da atividade entre proteína ativa e a pró-enzima.

4.7- Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi realizada no Laboratório de Sanidade Animal (LSA) localizado no Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

Seções de 4µm dos pulmões de camundongos infectados com *M tuberculosis* inclusas em parafina, contendo lesões teciduais, foram obtidas e colhidas em lâminas histológicas silanizadas (Silano, Sigma-Aldrich, MO, USA). Para desparafinização, as amostras foram incubadas em estufa por 1 hora, mergulhadas em 2 banhos de xilol (10 minutos cada) e reidratadação em 3 banhos em álcool absoluto, 2 banhos em álcool 90%, 2 banhos em álcool 80% e 10 banhos em água deionizada, cada um destes banhos com duração de 1 minuto. A seguir, as amostras foram levadas a banho-maria em tampão de citrato (2,1g de ácido cítrico, 1L de água deionizada pH 6,0) a 96°C por 30 minutos, para recuperação antigênica, e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada por 5 minutos e em solução de Tris HCl também por 5 minutos. As lâminas foram então cuidadosamente enxutas com papel toalha, os cortes envolvidos circularmente com Dako pen® (Dako, CA, USA), e os espécimes foram tratados por 30 minutos em solução para bloqueio [85mL de metanol (Quimex) e 15mL de peróxido de hidrogênio (Vetec, RJ, Brasil)] de peroxidase endógena. As lâminas foram lavadas novamente em água deionizada e

Tris HCl durante 5 minutos cada. O bloqueio de ligações inespecíficas [Trisma-NaCl (Vetec, RJ, Brasil) com 1% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA – Sigma-Aldrich, MO, USA)] e 1% de leite em pó desnatado (Molico™ - Nestlé, SP, Brasil) foi feito por 1 hora. As seções foram lavadas em água deionizada e solução Tris HCl por 5 minutos cada e incubadas com os anticorpos anti-MMP-2 ou anti-MMP-9 com diluição em PBS de 1:100 e 1:50, respectivamente, a 4°C em câmara úmida *overnight* (18 horas). No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com solução Tris HCl por 5 minutos e incubadas com anticorpo secundário biotinizado (LSAB System-HRP, Dako) por 30 minutos, seguida de nova lavagem. As lâminas foram incubadas com a segunda solução de streptavidina-HRP por mais 30 minutos, lavadas e reveladas com *Kit* cromógeno DAB (Dako, CA, USA). Em seguida, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, desidratadas em 1 banho de álcool 80%, 2 banhos em álcool 95%, 3 banhos em álcool absoluto, 1 banho em solução de álcool absoluto com xilol, mais 2 banhos de xilol. Cada um destes banhos com duração de 1 minuto, e as lâminas foram finalmente montadas com Permount® (Sigma-Aldrich, MO, USA).

4.8- Medidas de biossegurança de nível III

Todos os procedimentos foram executados adotando as medidas de biossegurança necessárias para manipulação adequada de agentes biológicos de classe de risco III no qual *M. tuberculosis* está classificado (Manual de Biossegurança do Ministério da Saúde, 2010). Foram adotadas medidas de contenção primária; uso de técnicas de manipulação adequadas e utilização de equipamentos de proteção individual, assim como medidas de contenção secundária; uso dos equipamentos e instalações apropriadas. Todos os procedimentos de infecção e manipulação de animais, células e materiais infectados, foram realizados na sala de experimentação do Biotério de Biossegurança reforçada, de acesso restrito, em cabines de biossegurança -capelas de fluxo laminar de nível II-BII, utilizando os equipamentos de proteção individual necessários para a manipulação deste patógeno (jaleco de mangas compridas, jaleco descartável, luvas, máscara N-95, touca, sapatos fechados e pró-pés). As instalações do biotério possuem um sistema de ventilação que confere a sala de criação e experimentação uma pressão negativa em relação as salas adjacentes.

São utilizados filtros HEPA certificados para garantir a purificação do ar em circulação, antes de ser liberado no ambiente externo à sala. Todo o material de descarte produzido durante o trabalho, juntamente com todo material contaminado, foram acondicionados em sacos apropriados para autoclave, lacrados por dentro da cabine de biossegurança e seguidos para descontaminação em autoclave, instalado por dentro da unidade. A descontaminação foi realizada em 40 minutos a 120°C à 1atm.

4.9- Análises estatísticas

As análises estatísticas foram apresentadas como média do desvio padrão e teste t não pareado bilateral ou one-way ANOVA e o teste de Bonferroni ou Turkey como Post test foram utilizados para comparações, utilizando o software GraphPad Prism versão 4.

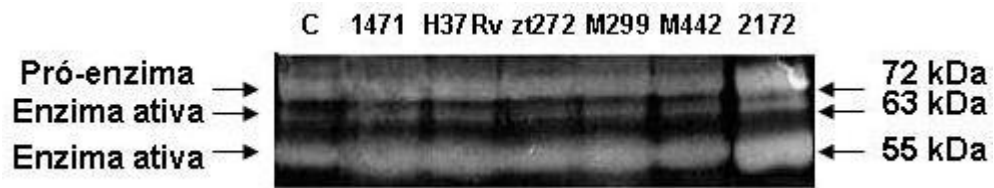
5- RESULTADOS

5.1- Avaliação da atividade de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, em células de pulmão *ex vivo* de camundongos infectados na fase aguda de infecção (28 dpi)

A fim de verificar os níveis das atividades gelatinolíticas das MMPs secretadas pelas células de pulmão de camundongos infectados com cepas de Mtb com diferentes graus de virulência após a infecção dos animais por um período de 28 dias, que corresponde a fase aguda da doença. As células foram plaqueadas e seus sobrenadantes coletados para realização dos ensaios de zimografia em gel com gelatina. As duas proteínas, MMP-2 e MMP-9, foram imunoprecipitadas a partir do sobrenadante das células pulmonares cultivadas *ex vivo*, utilizando-se os anticorpos específicos, anti-MMP-2 (**Figura 6**) e anti-MMP-9 (**Figura 7**). Os complexos imunoprecipitados foram submetidos à eletroforese em gel com gelatina para verificar sua degradação pelas diferentes formas da enzima. Uma vez que a degradação do substrato (gelatina) não é tão restrita nas condições experimentais utilizadas, a imunoprecipitação foi necessária para identificar quais enzimas são responsáveis pela formação das bandas de pró-enzima e enzima ativa que ao exercerem a atividade gelatinolítica promovem a degradação do gel. A eletroforese das proteínas permite discriminar a pró-enzima e enzima ativa, sendo que, uma vez ativada, a MMP sofre auto-clivagens do polipeptídeo que formam fragmentos de diferentes pesos moleculares, gerando respectivas bandas no gel. A zimografia permite avaliar atividade da MMP como uma relação da enzima ativada com a pró-enzima baseada na densitometria das respectivas bandas.

A infecção dos camundongos pelas diferentes cepas de Mtb aumentou a produção da MMP-2 ativa pelas células pulmonares na fase aguda da infecção, 28 dpi, o que foi observado como aumento na densidade das bandas da enzima ativa nas amostras infectadas pelas cepas de micobactéria comparadas com a amostra controle (**Figura 6A**). As cepas Beijing mais virulentas (M299, 1471, 2172) e a cepa H37Rv foram capazes de aumentar a produção da MMP-2 ativa um pouco mais do que cepas Beijing menos virulentas (M442, Zt272), apesar da diferença não ter sido significativa (**Figura 6B**).

A



B

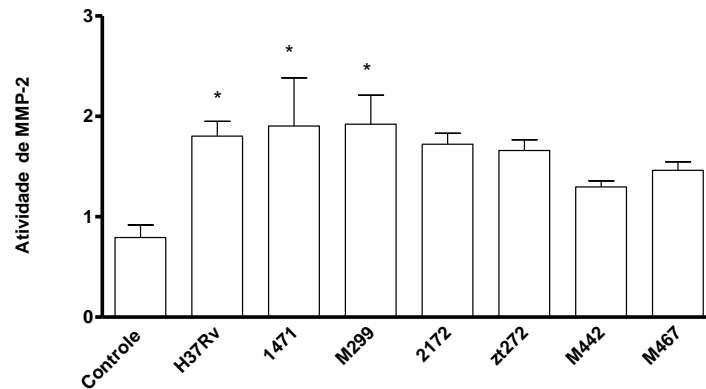


Figura 6: Análise zimográfica de MMP-2 no sobrenadante de cultura das células pulmonares, obtidas de camundongos na fase aguda de infecção por *Mtb* (28 dpi) e cultivadas *ex vivo* por 48h. (A) Imagens dos géis representativos (n=3): C- Controle (animais não infectados). **(B)** Quantificação da atividade de MMP-2. Os resultados estão apresentados como relação entre bandas correspondentes a enzima ativa e banda da pró-enzima, média dos valores \pm DP de quantificação densitométrica de três géis, obtidos em três experimentos. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$.

A produção de MMP-9 ativa pelas células pulmonares dos camundongos infectados também foi maior em comparação com as células do pulmão não infectado (**Figura 7**).

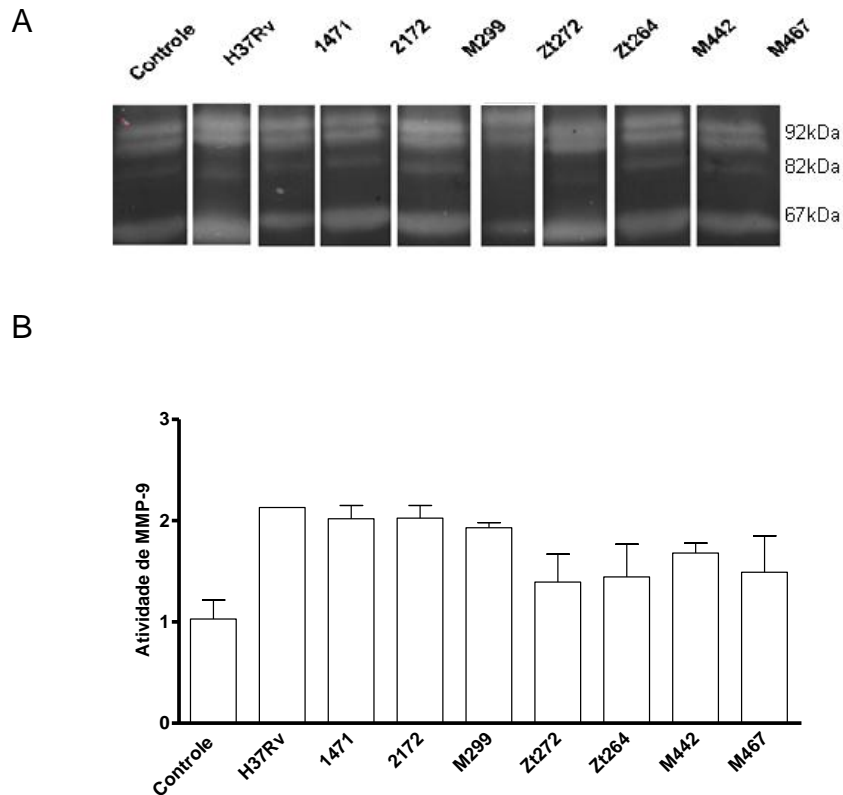


Figura 7: Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de cultura das células pulmonares obtidas de camundongos na fase aguda de infecção por Mtb (28 dpi). (A) Imagem do gel representativo (n=2): Controle (animais não infectados). **(B)** Quantificação da atividade de MMP-2. Os resultados estão apresentados como relação entre bandas da enzima ativa e banda da pró-enzima, média dos valores \pm DP de quantificação densitométrica de dois géis, obtidos em dois experimentos.

A quantificação da relação entre forma ativa da enzima e pró-enzima demonstrou que a atividade da MMP-9 induzida pelas cepas H37Rv, 1471 e M299 foi um pouco maior em comparação com outras cepas, entretanto, a diferença não foi estatisticamente significativa, $p > 0.05$ (**Figura 7A-B**).

5.2- Avaliação da atividade de metaloproteínas de matriz, MMP-2 e MMP-9, em células de pulmão *ex vivo* de camundongos infectados durante a fase crônica de infecção (120dp.i.)

Após a fase aguda, que culmina com a formação de granulomas, os camundongos C57BL/6 infectados com Mtb em baixa dose de infecção (100 bacilli) são capazes de controlar a infecção. Os macrófagos ativados pelo IFN- γ inibem a proliferação das micobactérias que, por sua vez, entram em estado de dormência. Entretanto, uma lenta progressão da patologia pulmonar, como o acúmulo de

macrófagos espumosos, a formação de granulomas secundários e o desenvolvimento da fibrose podem ser observados. No trabalho anterior do nosso grupo (ANDRADE, 2012) foi demonstrado que as cepas mais virulentas (cepa Mtb Beijing 1471, cepa *M. bovis* B2) induzem a progressão mais rápida da patologia crônica que as cepas menos virulentas (cepa Mtb Beijing Zt272 e cepa H37Rv).

Para verificar se a produção de MMPs pelas células do pulmão contribui para a progressão da patologia na fase crônica, nós comparamos níveis da atividade relativa de MMP-2 e MMP-9 produzidas pelas células dos animais infectados e dos não infectados, 120 dpi. Foram analisados animais infectados pelas cepas mais virulentas- cepas Mtb Beijing 1471 e cepa *M. bovis* B2 e cepas menos virulentas- cepas Mtb Beijing Zt272, cepa Mtb EIA 1777 e cepa Mtb de referência H37Rv.

Os resultados da comparação demonstram um pequeno aumento na atividade da MMP-2 (**Figura 8**) e MMP-9 (**Figura 9**) secretadas pelas células do pulmão de camundongos infectados pelas cepas mais virulentas. Entretanto, as diferenças observadas nestes experimentos não atingiram nível de importância significativa.

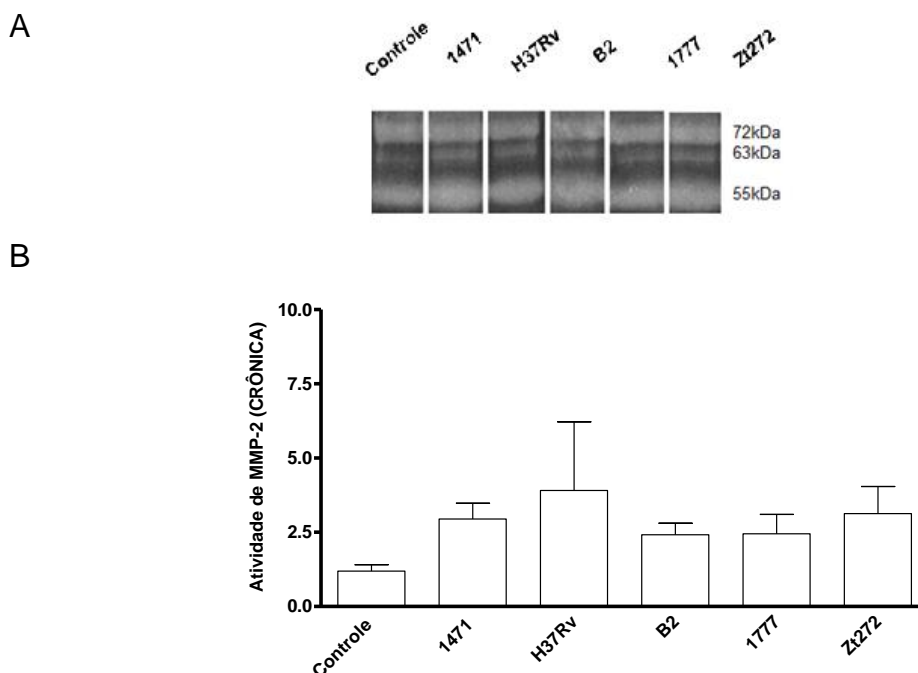


Figura 8: Análise zimográfica de MMP-2 do sobrenadante de células pulmonares obtidos de camundongos após 120 dpi com diferentes cepas Mtb. (A) Imagem representativa de três experimentos: Controle (animais não infectados). **(B)** Quantificação de relação entre as bandas da enzima ativa e pró-enzima. Média + DP (n=3).

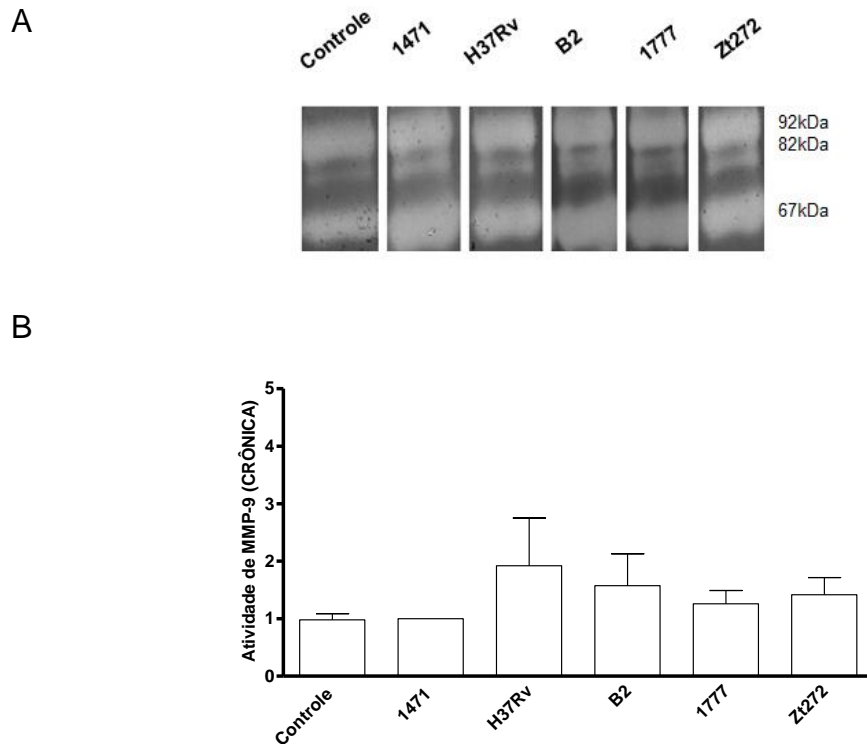


Figura 9: Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de células pulmonares obtido de camundongos após 120 dpi com diferentes cepas Mtb.. (A) Imagem representativa de dois experimentos: Controle (animais não infectados). **(B)** Quantificação de relação entre as bandas da enzima ativa e pró-enzima. Média + DP (n=2).

Os dados zimográficos obtidos na fase crônica não nos permitem afirmar que houve alteração significativa na relação de enzimas ativas com pró-enzimas quando comparados com resultados obtidos na fase aguda.

5.3- Avaliação da atividade de metaloproteinase de matriz-12 em células *ex vivo* de pulmão de camundongos infectados durante as fases aguda (28 dpi) e crônica (120 dpi) de infecção

A MMP-12 é uma elastase que está relacionada com a infecção crônica da tuberculose, pois foi demonstrado que macrófagos ativados alternativamente (macrófagos M2) tem como característica um aumento na expressão desta enzima, além do fato de esta enzima ser encontrada em estágios tardios de infecção. O acúmulo dos lipídeos nos macrófagos do pulmão, que leva a formação de macrófagos espumosos, é um dos fatores que induz a ativação alternativa dessas células na fase crônica da infecção por Mtb, reduzindo a capacidade do hospedeiro em manter a latência da bactéria (KAHNERT *et al.*, 2006).

Para verificar a diferença na produção da elastase ativa MMP-12 por células pulmonares nas fases aguda e crônica da infecção *in vivo*, realizamos uma análise zimográfica dos sobrenadantes de cultura das células do pulmão obtidas dos camundongos infectados pelas cepas Beijing mais virulentas.

Os resultados apresentados na **Figura 10** demonstram que a atividade da MMP-12 induzida pelas cepas M299 e 2172 foi significativamente maior na fase crônica da doença que na fase aguda. Interessante que a cepa 1471 foi capaz de induzir a atividade da MMP-12 já na fase aguda da doença, que foi mantida na fase crônica. Um maior nível de atividade da elastase induzida pela cepa 1471 pode contribuir para severidade da patologia induzida por essa bactéria ainda na fase aguda.

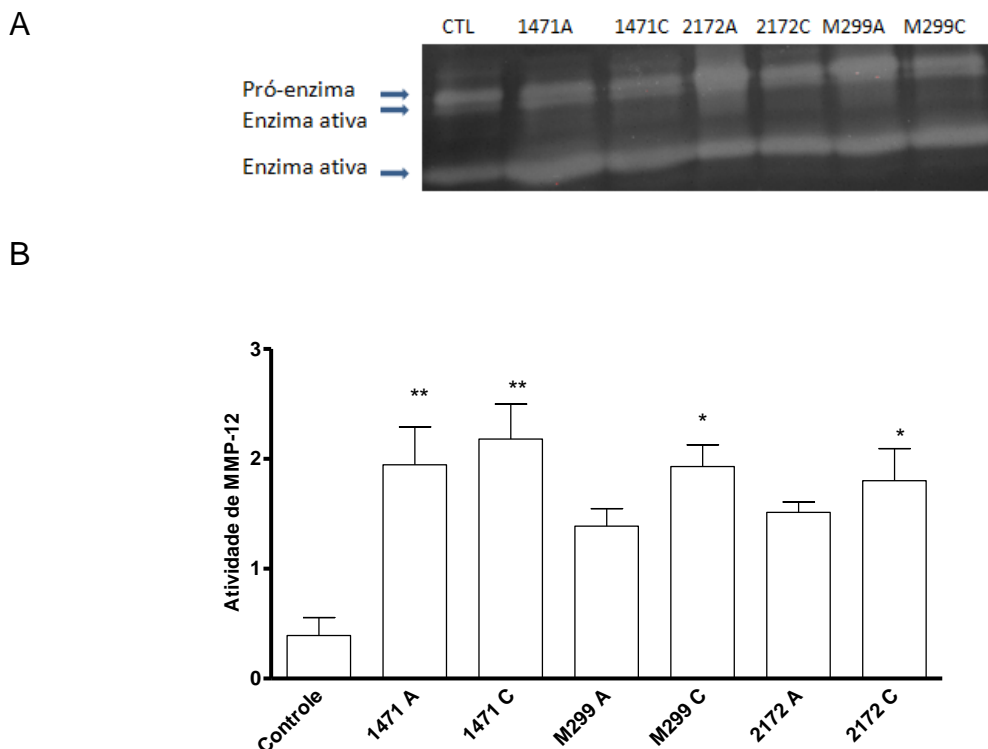


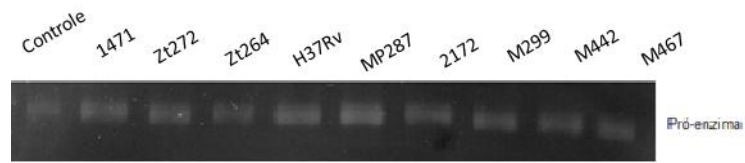
Figura 10: Análise zimográfica de MMP-12 no sobrenadante das culturas das células pulmonares obtidos de camundongos infectados por *Mtb* na fase aguda (28 dpi) ou fase crônica (120 dpi) da infecção. (A) Imagem do gel representativo (n=3): CTL- Controle; 1471A- cepa 1471, fase aguda; 1471C- cepa 1471, fase crônica; 2172A- cepa 2172, fase aguda, 2172C- cepa 2172, fase crônica; 299A: cepa M299, fase aguda; 299C- cepa M299- fase crônica. **(B)** Quantificação da atividade de MMP-12. Os resultados estão apresentados como relação entre as bandas correspondentes a enzima ativa e a banda da pró-enzima. A média dos valores ± DP de quantificação densitométrica dos três géis, obtidos em três experimentos (n=3). Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

5.4- Avaliação da produção de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, por macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) infectados *in vitro* pelas diferentes cepas de Mtb

Para verificar a capacidade das cepas de Mtb com diferentes graus de virulência em induzir a expressão e produção de gelatinases pelos macrófagos, realizamos experimentos de infecção *in vitro* na proporção de infecção 10:1 bactéria/macrófago.

Como demonstra a **Figura 11**, a infecção por Mtb induziu maior expressão da MMP-2 nos macrófagos cultivados. Nestes experimentos com BMDM foi observado um padrão da atividade gelatinolítica da MMP-2 e MMP-9 (**Figura 12**) diferente em comparação com o observado em experimentos com células do pulmão. Não foi observada a clivagem da pró-enzima com formação dos fragmentos proteolíticos relativos a enzima ativa. Entretanto, as pró-enzimas de MMPs em estudo presentes nas diferentes amostras, apresentavam diferentes capacidades de clivagem da gelatina. As cepas mais virulentas (cepa *M. bovis* MP287, cepas Mtb Beijing 1471, 2172, M299 e cepa H37Rv) produziram mais MMP-2 (**Figura 11B**) e MMP-9 (**Figura 12B**), que cepas menos virulentas (cepas Mtb Beijing Zt272, Zt264, M442, M467).

A



B

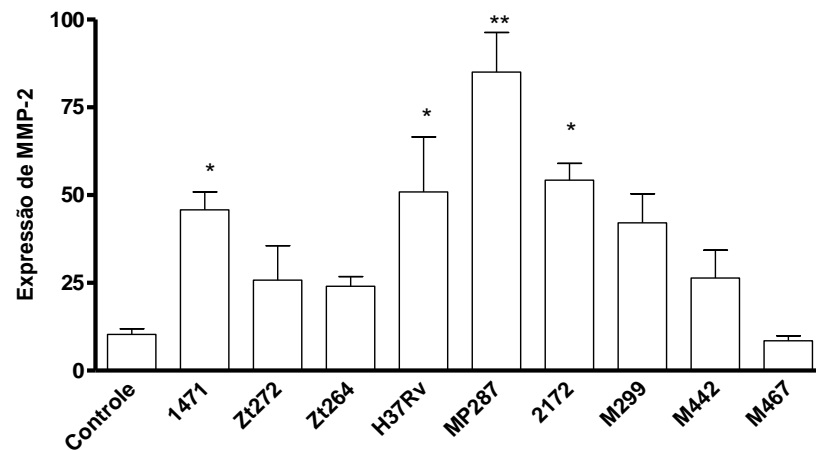
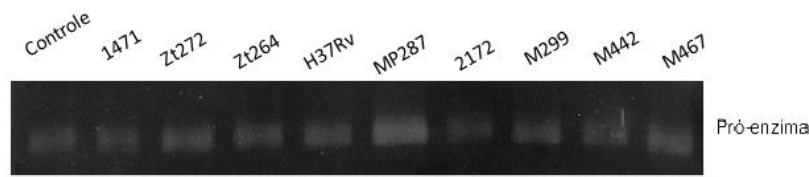


Figura 11: Análise zimográfica de MMP-2 no sobrenadante de macrófagos BMDM infectados pelas cepas Mtb por 48h. As células foram infectadas por *M. tuberculosis* na proporção 10:1 (bactérias/células). **(A)** Imagem do gel representativo. **(B)** Quantificação da atividade gelatinolítica da pró-enzima MMP-2. Média + DP, (n=3). Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

A



B

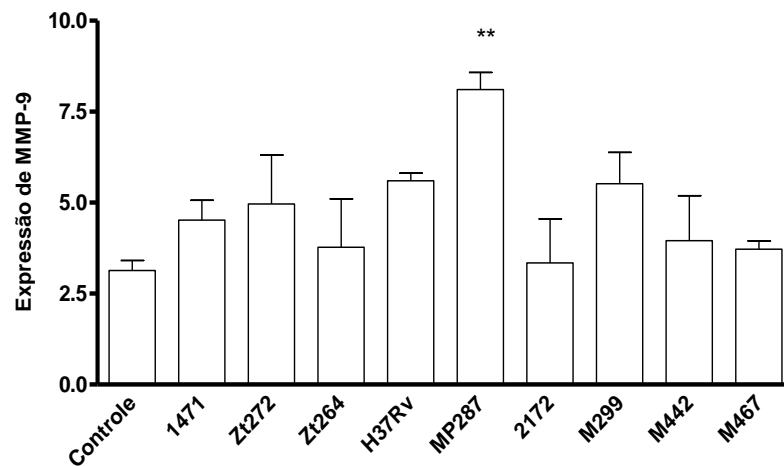


Figura 12: Análise zimográfica de MMP-9 no sobrenadante de macrófagos BMDM infectados pelas cepas Mtb por 48h. As células foram infectadas por *M. tuberculosis* na proporção 10:1 (bactérias/células). **(A)** Imagem do gel representativo. **(B)** Quantificação da atividade gelatinolítica da pró-enzima MMP-2. Média + DP, (n=3). Diferença significativa em relação ao controle ** p < 0.01.

5.5- Análise imunoistoquímica da expressão de metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, no pulmão de camundongos infectados por diferentes cepas de Mtb na fase aguda (28 dpi)

O procedimento de marcação tecidual através de imunoistoquímica permite comparar o padrão de distribuição das metaloproteinases de matriz, MMP-2 e MMP-9, nos tecidos pulmonares infectados pelas cepas de Mtb com diferentes graus de virulência. Além da marcação das enzimas, o procedimento imunoistológico inclui a contracoloração dos tecidos pela hematoxilina eosina, permitindo a observação das lesões patológicas e sua co-localização com as MMPs.

Neste trabalho, nós avaliamos a expressão da MMP-2 e da MMP-9 nos pulmões de camundongos não infectados e infectados com cepas de Mtb em estudo de graus de diferentes graus de virulência.

Nos pulmões dos animais controle (não-infectados) foi detectada uma baixa expressão de MMP-2 (**Figura 13G, Tabela 3**) e MMP-9 (**Figura 13N, Tabela 4**) principalmente pelas células epiteliais alveolares e alguns macrófagos alveolares.

A análise dos pulmões dos camundongos infectados foi feita no final da fase aguda de infecção (28 dpi). Essa fase coincide com o desenvolvimento no organismo do hospedeiro da resposta imunitária adaptativa que leva a contenção da bactéria. Foram observados três diferentes padrões da patologia do pulmão, determinados pela virulência da bactéria. As cepas de Mtb Beijing mais virulentas (cepas 1471, M299 e 2172) induziram lesões patológicas mais severas (padrão I), na forma de pneumonia piogranulomatosa, com elementos de infiltração granulomatosa típica (macrófagos e linfócitos) e intensa infiltração pelos neutrófilos, não típica para patogenia da tuberculose induzida pela baixa dose de infecção (**Figura 13A-B e H-I**).

Nestas amostras, a marcação com MMP-2 pareceu mais intensa e mais amplamente distribuída (**Figura 13A-B, Tabela 3**) do que a marcação com MMP-9 (**Figura 13H-I, Tabela 4**). As áreas de pneumonia granulomatosa (infiltrado mononuclear) foram fortemente marcadas pela anti-MMP-2, e a marcação pela anti-MMP-9 foi menos intensa. Diferentemente das áreas compostas por células mononucleares, as áreas de alveolite neutrofílica (alvéolos com neutrófilos, na maioria, apoptóticos) foram MMP-2-negativos (**Figura 13A-B**, setas pretas) e fracamente marcadas pelo anticorpo anti-MMP-9.

As células mais marcadas positivamente foram as células inflamatórias, especialmente macrófagos, células epiteliais e o exsudato celular, em ambos os anticorpos. Quanto às estruturas de granulomas e aos infiltrados neutrofílicos, não são observadas marcações expressivas. Acredita-se que isto se deve ao fato de que as células inflamatórias, especialmente os neutrófilos que apenas liberam MMP-9 presente em seus grânulos, terem liberado as enzimas em questão no processo de migração para o local da inflamação e ao chegarem se ocuparam em liberar mediadores inflamatórios que não MMPs.

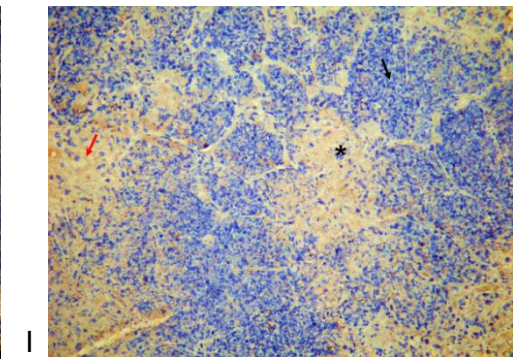
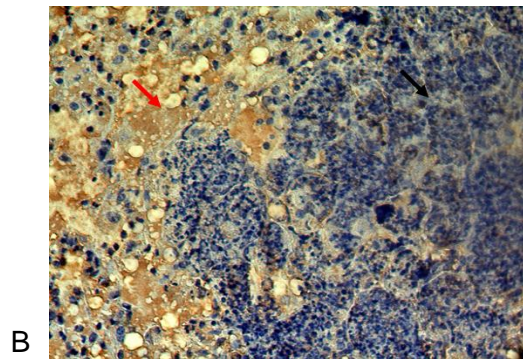
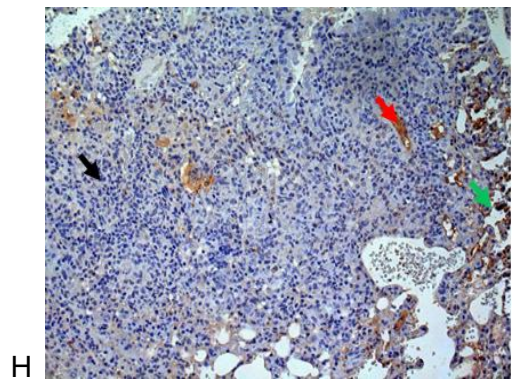
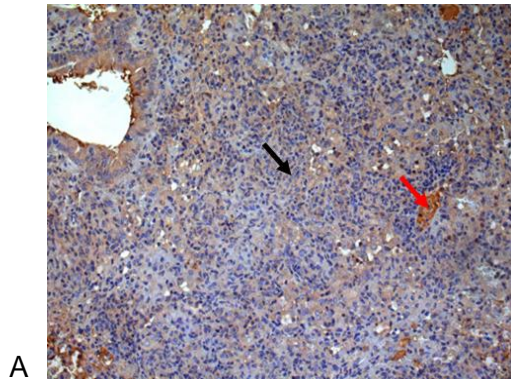
As imagens denominadas padrão patológico I, se referem aos pulmões de camundongos infectados com cepas hipervirulentas, como M299, 1471 e 2172 (imagens A, B, H e I). Nelas vemos grandes áreas de granulomas estabelecidos e áreas de infiltração neutrofílica. O padrão patológico II (**Figura 13C-D e J-K**) se refere a pulmões infectados com cepas de virulência intermediária (M467, Zt272 e Zt264). Estas amostras possuem múltiplos granulomas (localização perivascular e peribronqueal), em crescimento, que se coalescem. O crescimento é promovido por células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos, que migram ao local da infecção, ocupando novos alvéolos em volta dos granulomas já existentes. Como demonstra a **Figura 13 (Figura 13C- D)**, as áreas alveolares em volta do granuloma (isto é, as células epiteliais das paredes alveolares e macrófagos), são fortemente marcadas pelo anti-MMP-2, diferentemente da área de granuloma que está marcada relativamente menos. O mesmo pode ser observado em relação de MMP-9 (**Figura 13J-K**). O exsudato seroso alveolar, observado em algumas áreas (setas vermelhas) está marcado pelo anti-MMP-2 e anti-MMP-9.

Enquanto que no padrão patológico III, englobam pulmões de camundongos infectados com cepas de relativamente baixa virulência, como a cepa padrão H37Rv, e a cepa M442 (**Figura 13E-F e L-M**). Pulmões infectados com estas cepas apresentam pequenas formações de granulomas perivascular ou peribronquiolar. Interessante que, apesar de apresentar a patologia similar, a marcação para MMPs está mais pronunciada no pulmão infectado pela cepa H37Rv (em comparação com o infectado pela cepa M442 (**Figura 13F e M**)). Nas amostras relacionadas a cepa H37Rv (**Figura 13E e L**), pode ser observada uma marcação de células de granuloma (principalmente de macrófagos) para MMP-2 e MMP-9, assim como amplas áreas de alvéolos em volta de granulomas que também estão fortemente marcadas. A marcação do pulmão infectado pela cepa M442 (**Figura 13F e M**) tem caráter similar, mas a intensidade de marcação é muito menor.

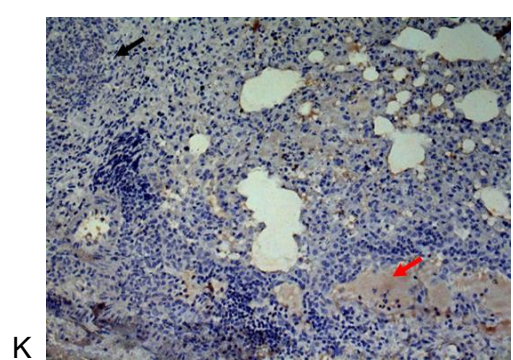
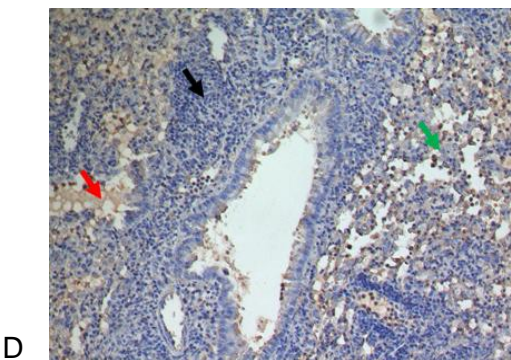
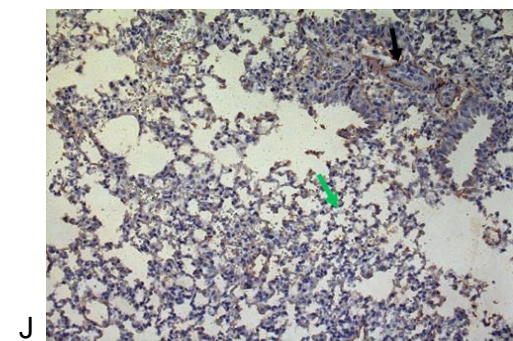
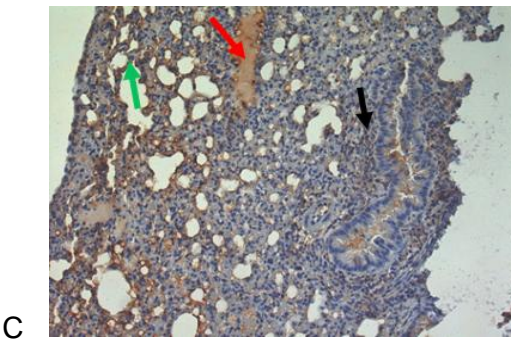
MMP-2

MMP-9

Padrão patológico I



Padrão patológico II



MMP-2

MMP-9

Padrão patológico III

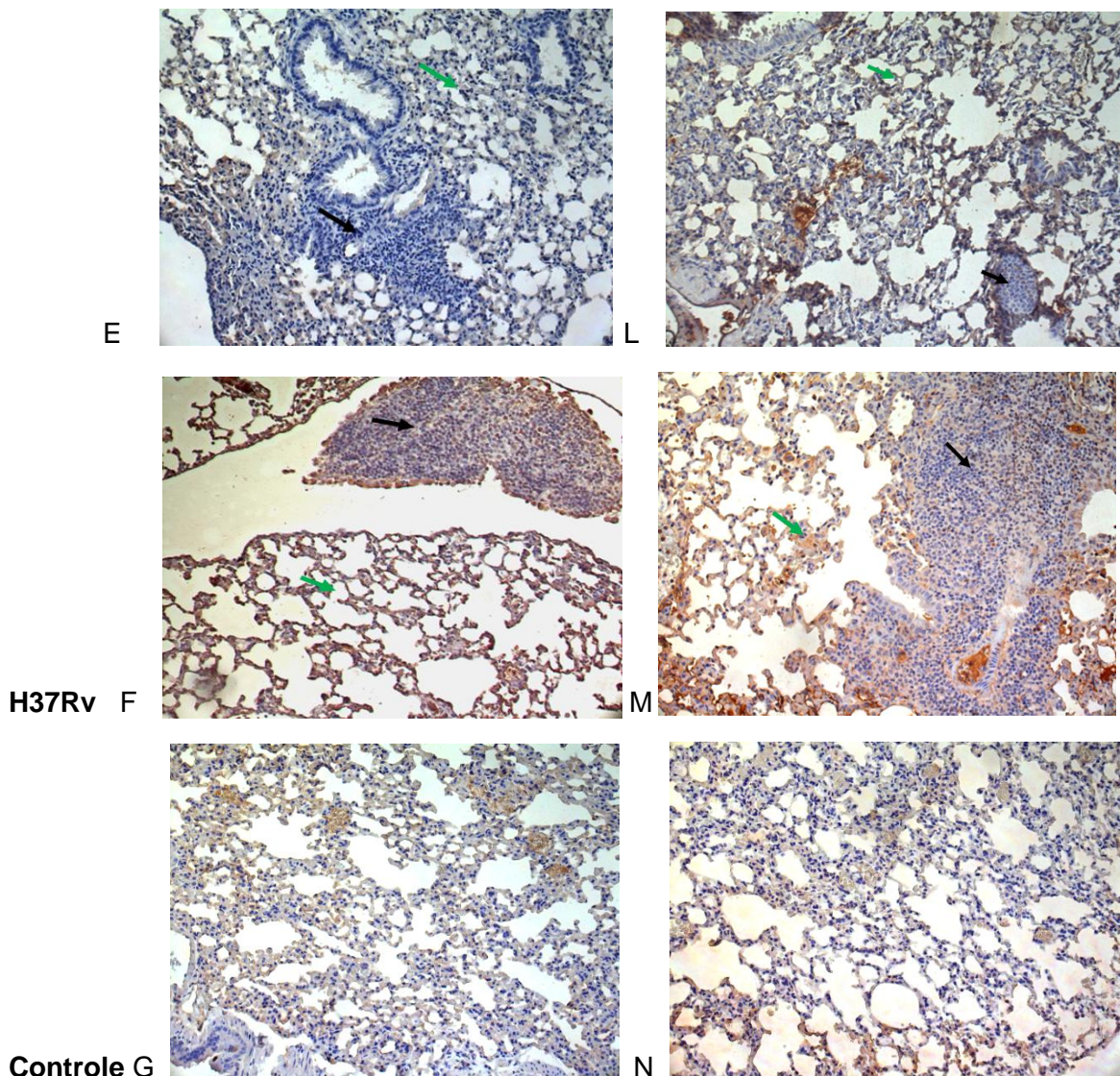


Figura 13- Análise imunoistoquímica de expressão de MMP-2 (A-G) e MMP-9 (H-N) no pulmão de camundongos infectados por cepas de Mtb na fase aguda da infecção, 28 dpi Padrões de patologia: (A-B e H-I) padrão I, de patologia severa, induzida por cepas de virulência alta (cepas 1471, M299, 2172); (C-D e J-K) padrão II, de patologia moderada, induzida por cepas de virulência intermediária (cepas M467, Zt264, Zt272); (E-F e L-M) padrão III, de patologia branda, induzida por cepas de virulência relativamente baixa (cepas M442 e H37Rv). (G e N). Controle- pulmão de camundongos não infectados. Setas vermelhas indicam áreas de edema, setas pretas indicam granulomas formados e setas verdes indicam células inflamatórias migrando, asterisco refere-se a área de necrose.

Tabela 3 – Análise imunoistoquímica de imunolocalização de MMP-2 no pulmão de camundongos infectados por cepas Mtb, 28 dias após infecção (fase aguda)

	Cepas de virulência elevada			Cepas de virulência intermediária			Cepas de baixa virulência		Animal não infectado
	1471	M299	2172	M467	Zt264	Zt272	M442	H37Rv	Controle
Células epiteliais bronqueolares	2	2	2	1	1	0	0	0	0
Células epiteliais alveolares	3	2	3	2	3	2	2	2	1
Macrófagos alveolares	3	3	2	2	1	1	1	1	0
Vasos (membrana basal, células endoteliais)	2	3	2	1	1	0	1	1	0
Granulomas									
Infiltrado linfocitário	0	0	0	0	0	0	0	0	---
Infiltrado de macrófagos	2	2	2	1	2	1	1	2	---
Pneumonia tuberculosa									
Edema alveolar	2	2	2	2	2	2	---	---	---
Áreas granulomatosas	2-3	2-3	2-3	2	---	---	---	---	---
Alveolite neutrofílica	0	0	0	---	---	---	---	---	---
Exsudato celular intrabronqueolar	2	2	2-3	1	---	---	---	---	---
Áreas de necrose	1	1	1	---	---	---	---	---	---

A intensidade da marcação imunoistoquímica: 0, não houve reação; 1, marcação fraca ou suave; 2, marcação moderada; 3, marcação intensa ou forte.

Tabela 4 – Análise imunoistoquímica de imunolocalização de MMP-9 no pulmão de camundongos infectados por cepas de Mtb, 28 dias após infecção (fase aguda)

	Cepas de virulência elevada			Cepas de virulência intermediária			Cepas de baixa virulência		Animal não infectado
	1471	M299	2172	M467	Zt264	Zt272	M442	H37Rv	Controle
Células epiteliais bronqueolares	0	0	0	0	1	0	2	1	1
Células epiteliais alveolares	1	1	1	2	1	1	1	2	1
Macrófagos alveolares	2	2	2	1	1	1	0	1	0
Vasos (membrana basal, células endoteliais)	1	1	2	1	2	1	2	2	1
Granulomas									
Infiltrado linfocitário	0	1	1	0	0	0	0	0	---
Infiltrado de macrófagos	1	1	1	1	1	1	1	1	---
Pneumonia tuberculosa									
Edema alveolar	2	3	2	3	1	1	---	---	---
Áreas granulomatosas	1	0	0	1	0	1	---	---	---
Alveolite neutrofílica	1	1	1	---	---	---	---	---	---
Exsudato celular intra-bronqueolar	2	1	1	---	---	---	---	---	---
Áreas de necrose	1	1	1	---	---	---	---	---	---

A intensidade da marcação por imunoistoquímica foi graduada assim: 0, não houve reação; 1, marcação fraca ou suave; 2, marcação moderada; 3, marcação intensa ou forte.

6 – DISCUSSÃO

A infecção com *M. tuberculosis* leva a extensiva patologia pulmonar com a formação de granuloma, que serve para limitar a disseminação da bactéria, porém também fornece um ambiente apropriado para sua persistência. As MMPs são responsáveis pela degradação da matriz extracelular e remodelamento tecidual e são produzidas por diversas células (macrófagos, células epiteliais, fibroblastos) durante a infecção por Mtb, contribuindo com a patologia induzida pela micobactéria (IZZO *et al.*, 2004).

Neste estudo investigamos a relação entre a produção das MMP-2, MMP-9 (gelatinases) e MMP-12 (elastase) nos pulmões de camundongos infectados por cepas patogênicas de Mtb de diferentes graus de virulência, associando o nível de atividade da MMP com a gravidade da patologia induzida.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a virulência de diferentes isolados clínicos de Mtb e de *M. bovis*, utilizando modelos de infecção *in vivo* e *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 2012, LASUNSKAIA *et al.*, 2010), demonstrando significativa variação na virulência entre cepas micobacterianas, incluindo aquelas que pertencem a mesma família genética, como cepas Mtb da família Beijing. Foram encontradas cepas sendo consideradas hipervirulentas (cepas Mtb Beijing 1471, M299, 2172, cepa *M. bovis* MP287): aquelas que provocam morte dos animais infectados no final da fase aguda da infecção (período de 30-40 dias pós infecção com baixa dose de infecção de 100 bacilli); cepas de virulência intermediária (cepas Mtb Beijing M479, Zt272, Zt264, cepa *M. bovis* B2): aquelas que causam a morte dos animais na fase crônica da infecção, no período de 120-200 dpi, e cepas de virulência relativamente baixa (cepa de referência H37Rv e cepa Mtb Beijing M442): as cepas que não alteram a viabilidade dos camundongos durante pelo menos 1 ano após a infecção.

O tecido pulmonar consiste de vários tipos celulares, como células dos epitélios bronquiolar e alveolar, fibroblastos e outras células intersticiais que expressam MMPs. Após a infecção com Mtb, grandes quantidades de leucócitos migram para o pulmão, que também produzem MMPs. Portanto, os dados zimográficos referentes aos sobrenadantes das culturas celulares pulmonares refletem um total de secreção de MMP de diferentes células pulmonares. As células do pulmão cultivadas *in vitro*, produzem também várias citocinas e outros

mediadores pró-inflamatórios, que induzem a ativação das MMPs através da autoclivagem proteolítica da pró-enzima com a formação de fragmentos polipeptídicos da enzima ativa. A zimografia de MMPs secretadas pelas células do pulmão permite visualizar bandas referentes às diferentes formas de MMP e avaliar sua atividade gelatinolítica. Diferentemente da cultura de células do pulmão obtidas do camundongo C57BL/6 infectado, a infecção dos macrófagos de medula óssea (BMDM C57BL/6) *in vitro* induz a secreção de MMP-2 e MMP-9 na forma de pró-enzima, mas a clivagem que leva a formação da enzima ativa não é observada. O que demonstra a importância dos fatores produzidos pelas outras células para ativação completa das MMPs. Para ativar metaloproteinases de matriz no meio de cultura *in vitro*, foi sugerido utilização de um estimulador APMA (acetato 4-aminofenilmercúrico), que ativa MMPs clivando uma ligação Asn80-Tyr81 da proenzima (MARRERO *et al.*, 2002; NAGASE *et al.*, 1992)

Os resultados da análise de produção das MMPs pelas células do pulmão *ex vivo* utilizando ensaios de zimografia nos permite concluir que a infecção dos camundongos pela Mtb aumenta a produção de MMP-2, MMP-9 e MMP-12 no pulmão e induz ativação dessas enzimas. A maior atividade de MMPs nos sobrenadantes das culturas pulmonares dos animais infectados versus não infectados foi observada como um aumento na relação entre enzimas ativas e seus respectivos zimogênios.

A comparação entre as cepas Mtb de graus de virulência diferentes demonstrou que entre cepas pertencentes a família genética Beijing, as cepas mais virulentas foram capazes de induzir uma ativação de MMP-2 e MMP-9 um pouco maior em valores relativos, quando comparadas com as cepas menos virulentas. Entretanto, a cepa Mtb H37Rv, de virulência relativamente baixa, foi capaz de induzir altos níveis de enzimas ativas também. Estes resultados obtidos *ex vivo* demonstram a produção de MMPs por uma proporção de células isoladas dos pulmões dos camundongos infectados, o que reflete parcialmente a situação *in vivo*. As cepas mais virulentas foram capazes de crescer mais rápido no pulmão e induzir maior recrutamento das células inflamatórias ao local da infecção, promovendo formação de amplas áreas da pneumonia tuberculosa nos camundongos. Podemos sugerir que o maior grau de infiltração do pulmão pelas células inflamatórias, macrófagos e neutrófilos que produzem MMPs, proporciona maiores valores absolutos dessas enzimas nos pulmões destes animais. Neste sentido, a diferença

entre cepas mais virulentas e menos virulentas pode ser muito maior. Nos experimentos futuros, pretendemos quantificar as MMPs nos homogenados dos pulmões, comparando concentrações e valores brutos (por grama de tecido) das enzimas produzidas.

Diferentemente de MMP-2 e MMP-9, cuja atividade foi maior na fase aguda da infecção, a produção da elastase MMP-12 ativa pelas células do pulmão foi maior na fase crônica da tuberculose experimental. A cepa Mtb hipervirulenta (cepa Beijing 1471), diferentemente das outras cepas Beijing de virulência elevada, foi capaz de ativar a elastase já na fase aguda de infecção, o que pode contribuir a patogenicidade dessa cepa. A produção de MMP-12 pelos macrófagos é um marcador da ativação alternativa dessas células (KAHNERT *et al.*, 2006), o que pode diminuir efeitos microbicidas e promover reativação da infecção na fase crônica. Além disso, a atividade da MMP-12 foi demonstrada ser capaz de promover fibrose do pulmão e fígado durante infecções crônicas (MADALA *et al.*, 2010). O papel da ativação da MMP-12 na fase aguda da infecção micobacteriana ainda deve ser estudado.

Várias evidências mostram o papel das metaloproteinases de matriz na patologia pulmonar durante a tuberculose. Entretanto, poucos trabalhos demonstram a localização das células produtoras de MMPs no pulmão durante a infecção por Mtb. Neste estudo, nós utilizamos métodos imunoistoquímicos para ensaio de imunolocalização destas células e seus produtos.

A análise imunoistoquímica do pulmão, utilizando anticorpos contra MMPs, demonstrou que maiores quantidades de MMP-2 e MMP-9 são produzidas pelas células do epitélio alveolar, macrófagos alveolares e monócitos recrutados para o local da infecção, contribuindo para o crescimento do granuloma. Estes dados estão de acordo com relatos já publicados que demonstraram a indução seletiva da MMP-9 em macrófagos infectados e células epiteliais vizinhas, contribuindo com a formação de granulomas no modelo de infecção das larvas de peixe-zebra (*zebrafish*) pela *M. marinum* (VOLKMAN *et al.*, 2010). Entretanto, as células na área central do granuloma expressam menos MMPs em comparação com as áreas periféricas que estão em crescimento granulomatoso, sugerindo um mecanismo de regulação negativa da expressão de MMPs nas células já recrutadas para inibir sua migração. Este fenômeno deve ser estudado melhor, pois alguns trabalhos

demonstram marcação de granulomas com MMP-9 em pacientes com TB (PRICE *et al.*, 2003 SHEEN *et al.*, 2009).

Como uma das características das MMPs é a ativação enzimática através de subsequentes clivagens, nos ensaios de imunistoquímica nós não pudemos confirmar qual forma da enzima estava marcada no tecido, podendo ser a pró-enzima e/ou a enzima ativa. Entretanto, um ambiente altamente inflamatório nas áreas das lesões tuberculosas favorece a ativação dos zimogênios produzidos pelas células, e nossos dados de zimografias confirmam presença das formas ativas de MMPs no pulmão.

Estudos mostram que neutrófilos não expressam MMP-2, mas produzem MMP-9 e MMP-8 constitutivamente, estocando as MMPs em grânulos (OPDENAKKER *et al.*, 2001). A degranulação com liberação das MMPs é utilizada para auxiliá-los na migração, permitindo ultrapassar as membranas basais endoteliais e bronquiais. Em nosso modelo de infecção, as cepas mais virulentas induzem o recrutamento reforçado de neutrófilos, o que agrava a patologia pulmonar provocando alveolite neutrofílica. Surpreendentemente, as áreas da alveolite geralmente não foram marcadas para MMP-9, sugerindo que a maior parte do estoque da enzima já foi liberada pelos neutrófilos durante a migração. O acúmulo de neutrófilos e a morte necrótica dessas células, que leva a liberação desorganizada do conteúdo dos seus grânulos compostos de moléculas extremamente proteolíticas e oxidantes, contribui para formação de áreas necróticas observadas no pulmão destes animais, favorecendo a disseminação da bactéria.

A expressão tanto de MMP-2 como de MMP-9 foi detectada em todas as amostras de tecido pulmonar. Inclusive uma fraca marcação foi observada nas amostras de pulmão não infectado (controle), corroborando aos dados obtidos nas análises zimográficas. Surpreendentemente, cepas consideradas menos virulentas, como H37Rv, Zt264 e M467, também apresentam uma marcação considerável tanto para MMP-2 como para MMP-9.

Dados obtidos neste trabalho demonstram, que a produção de MMP-2 e MMP-9 pelas células do epitélio alveolar e macrófagos alveolares, aumentada pela Mtb, é um fator importante para o recrutamento de células inflamatórias e para a formação de granulomas. Todas as cepas patogênicas, independente do seu grau de virulência, induzem a produção de MMPs nas células do hospedeiro. A virulência

da bactéria determina a capacidade da bactéria em induzir sua reprodução em macrófagos, o que por sua vez, determina o tamanho dos infiltrados granulomatosos no pulmão, aumentando o volume de MMPs produzidas.

Um maior nível de produção de MMPs em nossos experimentos com cepas mais virulentas pode contribuir para patologia severa observada, promovendo a) crescimento de infiltrados inflamatórios através do recrutamento acelerado das células, b) indução do exsudato líquido seroso, levando à formação de edema alveolar, através do aumento da permeabilização de capilares pelas MMPs, c) indução do exsudato celular intrabronqueolar que pode facilitar a disseminação da bactéria no pulmão e posterior saída do organismo. Ambos os tipos dos exsudatos foram marcados para MMP-2 e MMP-9 nas nossas amostras de imunoistoquímica.

O próximo passo no estudo do papel das MMPs na patologia tuberculosa é a utilização de inibidores específicos das diferentes MMPs para tratamento dos camundongos infectados, o que pode abrir caminho para o estabelecimento de novos métodos de tratamento da tuberculose.

7 - CONCLUSÃO

1. A infecção causada pela Mtb aumenta a produção de MMP-2, MMP-9 e MMP-12 pelas células do pulmão e induz ativação dessas enzimas;

2. As cepas de Mtb do genótipo Beijing mais virulentas apresentaram somente um pequeno aumento na indução de MMP-2 e MMP-9 em valores relativos, quando comparadas com as cepas menos virulentas. Entretanto, em valores absolutos, a produção das MMPs no pulmão dos camundongos infectados pelas cepas mais virulentas pode ser muito maior devido a maior infiltração do pulmão pelas células inflamatórias produtoras de MMPs;

3. A cepa Mtb de referência H37Rv, de virulência relativamente baixa, induz alta produção de MMP-2 e MMP-9 pelas células do pulmão. Entretanto, em valores absolutos, a produção das MMPs no pulmão pode não ser alta devido a baixa infiltração no pulmão pelas células inflamatórias, produtoras de MMPs, observadas nestes animais;

4. A produção da elastase MMP-12 ativada pelas células do pulmão é maior na fase crônica da tuberculose experimental. A cepa Mtb hipervirulenta (cepa Beijing 1471), diferentemente das outras cepas Beijing de virulência elevada, foi capaz de ativar a elastase já na fase aguda de infecção, o que pode contribuir para patogenicidade dessa cepa;

5. A análise imunoistoquímica do pulmão, utilizando anticorpos contra MMPs, demonstrou que maiores quantidades de MMP-2 e MMP-9 são produzidas pelas células do epitélio alveolar, macrófagos alveolares e monócitos recrutados para o local de infecção, contribuindo para o crescimento do granuloma. As células dos granulomas já formados expressam menos MMPs;

6. Um maior nível de produção das MMPs nos pulmões dos animais infectados pelas cepas mais virulentas pode contribuir para a severidade da patologia observada, promovendo a) exsudato do líquido seroso e edema alveolar através do aumento da permeabilização de capilares pelas MMPs, b) exsudato

celular intrabronqueolar que pode facilitar a disseminação de bactéria no pulmão e evacuação para fora do organismo;

7. As cepas mais virulentas induzem o recrutamento reforçado de neutrófilos que agrava a patologia pulmonar, provocando alveolite neutrofílica. Apesar de não expressar MMP-2, os neutrófilos armazenam grandes volumes da MMP-9 e outras enzimas em seus grânulos, que são liberados durante a diapedese para permitir extravasamento e migração dos neutrófilos aos tecidos infectados. O acúmulo de neutrófilos e a morte necrótica dessas células, que leva a liberação desorganizada do conteúdo dos seus grânulos compostos de moléculas extremamente proteolíticas e oxidantes, contribui para a formação de áreas necróticas no pulmão e para a disseminação da bactéria;

8. A produção das MMP-2 e MMP-9 pelas células do epitélio alveolar e macrófagos alveolares induzida pela Mtb é um fator importante para o recrutamento das células inflamatórias e formação de granulomas. Todas as membranas basais (dos vasos e bronquíolos) são fortemente marcadas pelas anti-MMP-2 e MMP-9.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE MR, AMARAL EP, RIBEIRO SC, ALMEIDA FM, PERES TV, LANES V, D'IMPÉRIO MR, LASUNSKAIA EB (2012) Pathogenic *Mycobacterium bovis* strains differ in their ability to modulate the proinflammatory activation phenotype of macrophages. *BMC Microbiology*, 12:166-178
- ANDRADE MRM (2011) Perfil da ativação clássica ou alternativa dos macrófagos e seu impacto na patogenia da tuberculose. Tese (doutorado em Biociências e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 98p.
- ANGELA DP, GIUSEPPINA C, TONY FV, BIJO B, FATMIRA S, GIUSEPPINA T (2005) Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in milk using polymerase chain reaction (PCR). *Food Control – Elsevier*, 17:776-780
- BEN-HUR T, BEN-YOSEF Y, MIZRACHI-KOL R, BEN-MENACHEM O, MILLER A (2006) Cytokine-mediated modulation of MMPs and TIMPs in multipotential neural precursor cells. *Journal of Neuroimmunology*, 175:12-18
- BORREGAARD N & COWLAND JB (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89:3503-3521
- CÁCERES N, TAPIA G, OJANGUREN I, ALTARE F, GIL O, PINTO S, VILAPLANA C, CARDONA PJ (2009) Evolution of foamy macrophages in the pulmonary granulomas of experimental tuberculosis models. *Tuberculosis*, 89:175-82
- CAUWE B, STEEN PEV, OPDENAKKER G (2007) The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42:113-185
- CHANG JC, WYSOCKI A, TCHOU-WONG KM, MOSKOWITZ N, ZHANG Y, ROM WN (1996) Effect of *Mycobacterium tuberculosis* and its components on macrophages and the release of matrix metalloproteinases. *Thorax*, 51:306-311
- CHURG A, WANG RD, TAI H, WANG X, XIE C, DAI J, SHAPIRO SD, WRIGHT JL (2003) Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am. J. of Respir. And Crit. Care Med.*, 167:1083-1089

- COLLINS H, KAUFMANN SHE (2001) The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology*, 103:1-9
- CREVEL R, OTTENHOFF THM, MEER JWM (2002) Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 15:294-309
- DANNENBERG AM (1984) Chemical and enzymatic host factors in resistance to tuberculosis. *The mycobacteria*, 1:721-760
- DUNLAP NE, BASS J, FUJIWARA P, HOPEWELL P, HORSBURGH CR, SALFINGER M, SIMONE PM (1999) Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. *Am J Respir Crit Care Med*, 161:1376-1395
- ELKINGTON PT, D'ARMIENTO J, FRIEDLAND JS (2011) Tuberculosis Immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction. *Science Translational Medicine*, 3:1-4
- ELKINGTON PTG, FRIEDLAND JS (2005) Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax*, 61:259-266
- ELKINGTON PTG, O'KANE CM, FRIEDLAND JS (2005) The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 142:12-20
- GAGNEUX S, DERIEMER K, VAN T, MAEDA MK, JONG BC, NARAYANAN S, NICOL M, NIEMANN S, KREMER K, GUTIERREZ MC, HILTY M, HOPEWELL PC, SMALL PM (2005) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*, 8:2869-2873
- GALBOIZ Y, SHAPIRO S, LAHAT N, MILLER A (2002) Modulation of monocytes matrix metalloproteinase-2, MT1-MMP and TIMP-2 by interferon-g and -h: implications to multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 131: 191-200
- GIBBS DF, SHANLEY TP, WARNER RL, MURPHY HS, VARANI J, JOHNSON KJ (1999) Role of matrix metalloproteinases in models of macrophage-dependent acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20:1145-1154
- GIL O, GUIRADO E, GORDILLO S, DIAZ J, TAPIA G, VILAPLANA C, ARIZA A, AUSINA V, CARDONA PJ (2006) Intragranulomatous necrosis in lungs of mice infected by aerosol with *Mycobacterium tuberculosis* is related to bacterial load rather than to any one cytokine or T cell type. *Microbes Infect.*, 8:628-36

GILL S, WIGHT TN, FREVERT CW (2010) Proteoglycans: key regulators of pulmonary inflammation and the innate immune response to lung infection. *The Anatomical Record*, 293:968-981

GOMEZ DE, ALONSO DF, YOSHIJI H, THORGEIRSSON UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell Biol.* 74:111-122

HANEKOM M, VAN DER SPUY GD, STREICHER E, NDABAMBI SL, MCEVOY CRE, KIDD M, BEYERS N, VICTOR TC, HELDEN PD, WARREN RM (2007) A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. *J Clin Microbiol.*, 45:1483-1490

HARDING CV, BOOM WH (2010) Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. *Nature Reviews Microbiology*, 8:296-307

HARRIS JE, NUTTALL RK, ELKINGTON PT, GREEN JA, HORNCastle DE, GRAEBER MB, EDWARDS DR, FRIEDLAND JS (2007) Monocyte-astrocyte networks regulate matrix metalloproteinase gene expression and secretion in central nervous system tuberculosis *in vitro* and *in vivo*. *J Immunol*, 178:1199-1207

HAUTAMAKI RD, KOBAYASHI DK, SENIOR RM, SHAPIRO SD (1997) Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science Mag*, 277:2002-2004

HOENESTER E & ENGEL J (2002) Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins Erhard Hohenester, Jürgen Engel - *Matrix Biology* 21:115-128

HRABEC E, STREK M, ZIEBA M, KWIATKOWSKA S, HRABEC Z (2002) Circulation level of matrix metalloproteinase-9 is correlated with disease severity in tuberculosis patients. *Int J Tuberc Lung Dis*, 8:713-719

HUNTER RL (2011) Pathology of post primary tuberculosis of the lung: An illustrated critical review. *Tuberculosis* 91:497-509

HYNES, RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326:1216-1219

IWAMOTO T, GRANDJEAN L, ARIKAWA K, NAKANISHI N, CAVIEDES L, CORONEL J, SHEEN P, WADA T, TAYPE CA, SHAW MA, MOORE DA, GILMAN RH (2012) Genetic diversity and transmission characteristics of Beijing family strains of *Mycobacterium tuberculosis* in Peru. *PLoS One*, 7:1-9

IZZO AA, IZZO LS, KASIMOS J, MAJKA S (2004) A matrix metalloproteinase inhibitor promotes granuloma formation during the early phase of *Mycobacterium tuberculosis* pulmonary infection. *Tuberculosis – Elsevier*, 84:387-396

KAHNERT A, SEILER P, STEIN M, BANDERMANN S, HAHNKE K, MOLLENKOPF H, KAUFMANN SHE (2006) Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.*, 36:631-647

KAUFMANN SHE (2001) How can immunology contribute to the control of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 1:20-30

KLEIN T & BISCHOFF R (2011) Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteinases. *Amino acids*, 41:271-290

LASUNSKAIA EB, RIBEIRO SC, MANICHEVA O, GOMES LL, PHILIP NS, MOKROUSOV I, FERRAZOLI L, ANDRADE MR, KRITSKI A, OTTEN T, KIPNIS TL, SILVA WD, VISHNEVSKY B, OLIVEIRA MM, GOMES HM, BAPTISTA IF, NARSKAYA O (2010) Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. *Microbes and Infection*, 12:467-475

LÓPEZ B, AGUILAR D, OROZCO H, BURGER M, ESPITIA C, RITACCOV, BARRERA L, KREMERK, HERNANDEZ-PANDO R, HUYGEN K, VAN SOOLINGEN D (2003) A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol*, 133:30-37

MADALA SK, PESCE JT, RAMALINGAM TR, WILSON MS, MINNICOZZI S, CHEEVER AW, THOMPSON RW, MENTINK-KANE MM, WYNN TA (2010) Matrix metalloproteinase 12-deficiency augments extracellular matrix degrading metalloproteinases and attenuates IL-13-dependent fibrosis. *J Immunol*.184:3955-3963.

MAHAJAN S, DKHAR HK, CHANDRA V, DAVE S, NANDURI R, JANMEJA AK, AGREWALA JN, GUPTA P (2012) *Mycobacterium tuberculosis* modulates macrophage lipid-sensing nuclear receptors PPAR γ and TR4 for survival. *J Immunol.*, 188:5593-603

MARRERO CAR, STEWARD J, SHAFER WM, ROMAN J (2004) The down-regulation of cathepsin G in THP-1 monocytes after infection with *Mycobacterium tuberculosis* is associated with increased intracellular survival of bacilli. *Infection and Immunity*, 72:5712-5721

MASTROIANNI CM, LIUZZI GM (2007) Matrix metalloproteinase dysregulation in HIV infection: implications for therapeutic strategies. *TRENDS in Molecular Medicine*, 13:449-459

MURPHY G, WILLENBROCK F, WARD RV, COCKETT MI, EATON D, DOCHERTY AJP (1992) The C-terminal domain of 72 kDa gelatinase A is not required for catalysis, but is essential for membrane activation and modulates interactions with tissue inhibitors of metalloproteinases. *J Biochem.*, 283:637-641

NAGASE H (1997) Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol. Chem.*, 378:151-160

NAGASE H, SUZUKI K, MORODOMI T, ENGHILD JJ, SALVESEN G (1992) Activation mechanisms of the precursors of matrix metalloproteinases 1, 2 and 3. *Matrix Suppl.*, 1:237-244

OPDENAKKER G, STEEN PEV, DUBOIS B, NELISSEN I, COILLIE E, MASURE S, PROOST P, VAN DAMME J (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.*, 69: 851-859

OVERALL, CM & SODEK, J (1990) Concanavalin A Produces a Matrix-degradative Phenotype in Human Fibroblasts: induction and endogenous activation of collagenase, 72kDa gelatinase and pump-1 is accompanied by the suppression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinases. *Journal of Biological Chemistry*, 265: 21141-21151

PARKS WC, WILSON CL, BOADO YSL (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4:617-629

PARVEEN N, VARMAN R, NAIR S, DAS G, GHOSH S, MUKHOPADHYAY S (2013) Endocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* heat protein 60 is required to induce interleukin-10 production in macrophages. *The Journal of Biol Chem*, 1:1-40

PORTAL DA SAÚDE. Site do Ministério da Saúde, acessado em 15 de agosto de 2013, disponível em <http://www.saude.gov.br>

PRICE NM, GILMAN RH, UDDIN J, RECAVARREN S, FRIEDLAND JS (2003) Unopposed Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Human Tuberculous Granuloma and the Role of TNF--Dependent Monocyte Networks. *J Immunol*, 171:5579-5586

RIBEIRO SM (2007) Associação dos genótipos de *Mycobacterium tuberculosis* prevalentes no Brasil com grau de virulência e resposta dos macrófagos a bactéria. Dissertação (mestrado em Biociências e Biotecnologia). Campos dos Goytacazes-RJ, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 80p.

SALGAME P (2011) MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyes. *Journal of Clinical Investigation*, 121:1686-1688

SANG QA & DOUGLAS DA (1996) Computacional sequence analysis of matrix metalloproteinases. *Journal of Protein Chemistry*, 15:137-160

SHEEN P, O'KANE CM, CHAUDHARY K, TOVAR M, SANTILLAN C, SOSA J, CAVIEDES L, GILMAN RH, STAMP G, FRIEDLAND JS (2009) High MMP-9 activity characterizes pleural tuberculosis correlating with granuloma formation. *Eur. Respir. J*, 33:134-141

SILVER RF, LI Q, ELLNER JJ (1998) Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infection and Immunity*, 66:1190-1199

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

STEEN PEV, DUBOIS B, NELISSEN I, RUDD PM, DWEK RA, OPDENAKKER G (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 6:375-536

TAMERIS MD, HATHERILL M, LANDRY BS, SCRIBA TJ, SNOWDEN MA, LOCKHART S, SHEA JE, MCCLAIN JB, HUSSEY GD, HANEKOM WA, MAHOMED H, MCSHANE H (2013) Safety and efficacy of MVA85A, a new tuberculosis vaccine, in infants previously vaccinated with BCG: a randomised, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet*, 381:1021-1028

TAYLOR JL, HATTLE JM, DREITZ SA, TROUDT JM, IZZO LS, BASARABA RJ, ORME IM, MATRISIAN LM, IZZO AA (2006) Role for matrix metalloproteinase 9 in granuloma formation during pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*, 74:6135-614

VIEGAS SO, MACHADO A, GROENHEIT R, GHEBREMICHAEL S, PENNHAG A, GUDO PS, CUNA Z, MIOTTO P, HILL V, MARRUFO T, CIRILLO DM, RASTOGI N, KÄLLENIUS G, KOIVULA T (2010) Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Mozambique. *BMC Microbiol.*, 10:1-8

VOLKMAN HE, POZOS TC, ZHENG J, DAVIA JM, RAWLS JF, RAMAKRISHNAN L (2010) Tuberculous granuloma induction via interaction of bacterial secreted protein with host epithelium. *Science*, 327:466-469

WALLIS RS, TAHMASSEB AM, ELLNER JJ (1990) Induction of interleukin 1 and tumor necrosis factor by mycobacterial proteins: The monocyte Western blot (*Mycobacterium tuberculosis*). *Proc Natl Acad Sci*, 87:3348-3352

WARD RV, ATKINSON SJ, REYNOLDS JJ, MURPHY G (1994) Cell surface-mediated activation of progelatinase A: demonstration of the involvement of the C-terminal domain of progelatinase A in cell surface binding and activation of progelatinase A by primary fibroblasts. *Biochemistry J*, 304:263-269

WHO, 2012. Global Tuberculosis Report. World Health Organization, Geneva

YAMAMURA (1958). The pathogenesis of tuberculous cavities. *Adv Tuberc Res*, 9:13-37

YOON SO, PARK SJ, YUN CH, CHUNG AS (2003) Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J. Biochem Mol. Biol.*, 36:128-137