

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS DE PACIENTES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E DA RESPOSTA IMUNE INATA INDUZIDA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

YASMIN VIANA MARTINS

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

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

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS DE PACIENTES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E DA RESPOSTA IMUNE INATA INDUZIDA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

YASMIN VIANA MARTINS

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Elisangela Costa da Silva

Coorientador: Dr. Fabrício Moreira Almeida

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

FEVEREIRO – 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

M386

Martins, Yasmin Viana.

CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS DE PACIENTES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E DA RESPOSTA IMUNE INATA INDUZIDA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS / Yasmin Viana Martins. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2022.

87 f. : il.

Inclui bibliografia.

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

Orientadora: Elisangela Costa da Silva.

Coorientador: Fabrício Moreira Almeida.

1. *M. tuberculosis*. 2. virulência. 3. resposta imunitária. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

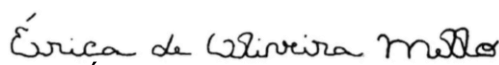
CDD - 570


CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DE CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* ISOLADAS DE PACIENTES DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO E DA RESPOSTA IMUNE INATA INDUZIDA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS

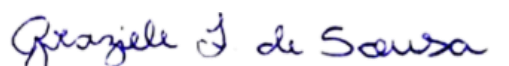
Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia


Aprovada em 24/02/2022


Banca examinadora:


Dr^a Érica de Oliveira Mello – UENF
(Doutora em Biociências e Biotecnologia)


Dr^a Élena Lassounskaia – UENF
(PhD em Imunologia)


Dr^a Grazielle Fonseca de Sousa – NUPEM
(Doutora em Biociências e Biotecnologia)


Dr. Fabrício Moreira Almeida – UENF
(Doutor em Biociências e Biotecnologia)
CO-ORIENTADOR


Dr^a Elisângela Costa da Silva – UENF
(Doutora em Biologia Parasitária)
ORIENTADORA

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia do Reconhecer, do Centro de Biociências e Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob coorientação do Dr. Fabrício Moreira Almeida e orientação da Prof^a. Dr^a. Elisangela Costa da Silva, em colaboração com Programa Acadêmico de Tuberculose, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Apoio:

- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.
- Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- FAPERJ- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
- CNPq- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, aos meus amados pais, Rildo e Rosângela, e aos meus companheiros de laboratório.

AGRADECIMENTOS

Em mais um ciclo que se encerra em minha vida, me sinto privilegiada por ser cercada de pessoas especiais e queridas que me ajudaram a chegar até aqui. Sou muito grata por todos que me ajudaram de alguma forma e que me encorajaram a nunca desistir dos meus sonhos. A todos, o meu mais sincero OBRIGADA!

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter me sustentado até aqui, ter me dado coragem e ter me fortalecido nas horas difíceis e por me ajudar a prosseguir quando até eu mesma não acreditava em mim. Agradeço também pelas pessoas incríveis que Ele colocou em meu caminho, que me ajudaram e me encorajaram a vencer todos os obstáculos que tive que enfrentar.

A UENF, por todos esses anos de aprendizagem e conhecimento adquirido, e por ter me proporcionado muitos amigos e ter me transformado como pessoa e profissional.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a. Elisangela Silva, por todo conhecimento transmitido. Agradeço por me aceitar e ter me inserido no grupo de pesquisa do LBR. Pela orientação durante o mestrado e por me ajudar em todo o processo da minha monografia. E por todas as oportunidades de aprendizado e crescimento.

Ao meu coorientador, Dr Fabrício Almeida, por ter me aceitado como aluna e por todo apoio e incentivo durante o mestrado. Agradeço pela correção da minha dissertação e pelos momentos divertidos.

A minha colaboradora, Dr^a Thatiana Ventura (Thati), por toda sua dedicação, ensinamento, incentivo, paciência, parceria e por todo o seu tempo e trabalho dedicados a mim. Agradeço por tudo que fez para o meu crescimento pessoal e profissional e por ter tornado essa dissertação possível. Agradeço também pela confiança em mim depositada, pelos conselhos e por fazer mais do que estava ao seu alcance. Você foi essencial em todo esse processo. OBRIGADA!

A professora Dr^a. Elena Lassounskaia, por ter aceitado a parceria nesse projeto e por todo o ensinamento, colaboração, correção e ajuda ofertada durante esse árduo processo.

As professoras Dr^a Érica Oliveira Mello, Dr^a Maria Armanda Monteiro da Silva Vieira e Dr^a. Elena Lassounskaia por terem aceitado participar da minha banca de defesa de Dissertação de mestrado e por suas contribuições importantes. E ao Dr. Deivid França Freitas, pela revisão da dissertação.

Aos meus amigos do Therapy: Vinícius Mussi, Sanderson Calixto, Camila Couto, Guilherme Sales e Ana Clara Soares, por cada momento compartilhado, por toda a ajuda, incentivo e força que me deram durante esse processo. Sou muito grata a Deus por ter me inserido nesse grupo incrível, onde um ajuda o outro.

Aos colaboradores, Dr. Afrânio Kritski e Dr. Philip Suffys por terem cedido as cepas e por toda contribuição científica.

Ao corpo técnico e administrativo do LBR, as técnicas Verônica, Rita e Núbia. Agradeço também aos colegas de laboratório do LBR.

Aos meus amigos da graduação, em especial, Sarah, Davi, Juliana, Izabelli, Patrícia, que me apoiaram, me ajudaram e me encorajaram a chegar até aqui. Sem eles seria tudo mais difícil, obrigada pelas inúmeras ajudas, tanto nas matérias quanto no psicológico.

A minha mãe, Rosangela, por sempre estar ao meu lado durante todo esse percurso, por ter me dado apoio nas horas difíceis e por sempre me encorajar e acreditar em min. Obrigada pelos inúmeros abraços de consolos, incansáveis orações e por seu amor incondicional.

Ao meu pai, Rildo, que sempre me apoiou e me ajudou nessa caminhada, pelas inúmeras vezes que me levou ou buscou na UENF, por todo seu amor e dedicação.

Aos meus familiares e amigos, que oraram e torceram por mim, em especial, meu pastor, Luís e minha avó, Joceli (*in memoriam*) por toda sua preocupação, dedicação e amor para comigo.

Aos meus amigos: Joyce, Andresa, Brenda, Jéssica, Thuany, Monique, Laís e Ana Laura, obrigado pelos inúmeros momentos compartilhados, pelo incentivo e força durante essa caminhada e por terem me fortalecido com palavras e orações.

A FAPERJ, pela concessão da bolsa de Pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 A tuberculose.....	18
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
1.3 Resposta imune contra micobacteria e imunopatologia da tuberculose ..	25
1.4 Virulência micobacteriana.....	34
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 Objetivo geral.....	38
2.2 Objetivos específicos.....	38
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 Cultura Celular.....	39
3.2 Obtenção e preparo da cultura estoque e do cultivo micobacteriano.....	40
3.3 Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9.....	41
3.4 Infecção dos macrófagos com as cepas de Mtb.....	41
3.5 Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano.....	42
3.6 Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por isolados clínicos de Mtb.....	42
3.7 Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados.....	43

3.8 Obtenção do <i>ranking</i> de virulência entre os isolados clínicos estudados.....	44
3.9 Relacionar os dados clínicos dos pacientes com os dados de virulência	45
3.10 Sequenciamento Genômico Completo – WGS.....	45
3.11 Forma de análise dos resultados.....	46
3.12 Biossegurança.....	46
3.13 Modelo de estudo.....	47
4 RESULTADOS.....	48
4.1 Caracterização dos isolados clínicos.....	48
4.2 Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9.....	49
4.3 Quantificação e avaliação do crescimento intracelular de Mtb em macrófagos infectados.....	51
4.4 Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb.....	53
4.5 Quantificação de mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por diferentes cepas de Mtb.....	58
4.5.1 Produção da Interleucina 1 β (IL-1 β).....	59
4.5.2 Produção do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α).....	60
4.5.3 Produção da Interleucina 10 (IL-10).....	61
4.5.4 Produção de NO.....	62
4.6 Quantificação do <i>ranking</i> de virulência entre os isolados clínicos de Mtb estudados.....	63
4.7 Sequenciamento e caracterização das cepas do estudo.....	64
5 DISCUSSÃO.....	65
6 CONCLUSÕES.....	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

- Figura 1.** Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana..... 23
- Figura 2.** Sequência de eventos que ocorrem após a infecção por Mtb e a progressão da doença..... 26
- Figura 3.** Representação esquemática da constituição, organização e estruturação do granuloma na TB..... 31
- Figura 4.** Patogênese da Tuberculose, resumo da resposta imune inata e adaptativa na tuberculose..... 34

METODOLOGIA

- Figura 5.** Fluxograma da sequência experimental utilizada..... 48

RESULTADOS

- Figura 6.** Avaliação da curva de crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (A) e a razão das médias da curva de crescimento micobacteriano (B)..... 50
- Figura 7.** Avaliação do crescimento intracelular das cepas de *M. tuberculosis* em macrófagos RAW 264.7..... 53
- Figura 8.** Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 50:1 utilizando o método de coloração por azul de tripan..... 54

Figura 9. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1 utilizando o método de coloração por azul de tripan.....	55
Figura 10. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 50:1 pelo teste de LDH.....	57
Figura 11. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1 pelo teste de LDH.....	58
Figura 12. Análise da produção da citocina IL-1 β pelos macrófagos J774A.1 infectados por cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1.....	60
Figura 13. Análise da produção da citocina TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1.....	61
Figura 14. Análise da produção da citocina IL-10 pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1.....	62
Figura 15. Análise da produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i> na proporção 10:1.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar que foram utilizadas neste trabalho.....	49
Tabela 2. Avaliação da taxa de virulência das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, em relação a cepa padrão H37Rv, através de testes de infecção <i>in vitro</i> , utilizando macrófagos RAW264.7.....	64
Tabela 3. Sequenciamento e caracterização das cepas do estudo.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA – Teste de dosagem de adenosina deaminase
- ADC – Suplemento de albumina, dextrose, catalase
- AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
- APC – Célula apresentadora de antígenos
- BAAR – Bacilos álcool-ácidos resistentes
- BCG – Bacilo Calmette-Guérin
- BK – Bacilo de Koch
- CDs – Células dendríticas
- CEVAs – Células epiteliais das vias aéreas
- CFU – Unidade formadora de colônias
- CFP-10 – Proteína antigênica secretada MTSA-10
- CLR – Receptor de lectina do tipo C
- COVID-19 – doença do coronavírus
- DAMPs – Padrões moleculares associados a danos
- DIM – Dimicoceratos de tiocerol
- DMEM-F12 – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- D.O – Densidade ótica
- DR – Repetições diretas
- DTH – Reação de hipersensibilidade tardia
- EAI – Estirpe do Leste Africano-Indiano
- ESAT-6 – Alvo Antigênico Precoce Secretado de 6 kDa
- ESX-1 – Sistema de Secreção 1
- FOXP3 – Fator de proteína de caixa de forquilha P3
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- H₂O₂ – Peróxido de oxigênio
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.
- IFN- γ – Interferon γ
- IGRA – Teste Interferon- γ Release Assays
- IL – Interleucina

- IL-1 β – Interleucina 1 beta
- ILTB – Infecção latente de tuberculose
- LAM – Lipoarabinomanana
- LAM – Estirpe latino-americana-mediterrânea
- LDH – Lactato desidrogenase
- LJ – Meio Lowenstein Jensen
- 12-LOX - 12-lipoxigenase
- LSP – Polimorfismo em grandes sequências
- LTB4 – Leucotrieno B4
- MAs – Macrófagos alveolares
- MAC – Complexo *M. avium*
- MDR-TB – Tuberculose multidroga resistente
- MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
- MMP – Metaloproteinase de matriz
- MNT – Micobactérias não tuberculosas
- MOI – Multiplicidade de infecção
- Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- MTBC – Complexo *Mycobacterium tuberculosis*
- NETs – Armadilhas extracelulares de neutrófilos
- NKG2D – Receptor 2A tipo lectina de célula Natural Killer
- NK – Célula natural killer
- NLRP3 – Família NLR, domínio pirina contendo 3
- NO – Óxido nítrico
- iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
- NKp – Proteína de Célula Natural Killer
- OADC – Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase
- OMS – Organização mundial de saúde
- PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógenos
- PBS – Tampão fosfato de sódio
- PGE2 – Prostaglandina E2
- PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
- RIPK – Serina/treonina-proteína quinase de interação com o receptor

- RNI – Intermediário reativo do nitrogênio
- ROI – Intermediário reativo do oxigênio
- ROS – Espécies reativas do oxigênio
- SARS-CoV2 – Coronavírus 2, da síndrome respiratória aguda grave
- SFB – Soro fetal bovino
- SINAN – Sistema de Informação de Agravos de Notificação
- SUS – Sistema Único de Saúde
- TB – Tuberculose
- TCD4+ – Linfócitos T auxiliares
- TCD8+ – Linfócitos T citolíticos
- TDM – trealose dimicolato
- TDO – Tratamento Diretamente Observado
- TGF- β – Fator de crescimento tumoral- β
- Th – célula T helper
- TLRs – receptores de Toll-Like
- Treg – Células T regulatórias
- XDR-TB – Tuberculose extensivamente resistente a fármacos
- Xpert MTB / RIF - teste rápido molecular para tuberculose

RESUMO

A tuberculose (TB) é um problema grave de saúde pública mundial, com elevada taxa de mortalidade, sendo a principal causa de óbitos por um único agente infeccioso, em situações não pandêmicas. O aparecimento de cepas *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) resistentes aos fármacos disponíveis ameaçam o controle da TB e favorece a transmissibilidade desta doença. A infecção por Mtb acomete principalmente os pulmões, sendo a forma mais comum de tuberculose. A tuberculose pulmonar apresenta diversos perfis de dano tecidual pulmonar ao longo do processo infeccioso, podendo apresentar formas leves a graves, com acometimento importante do tecido pulmonar. A heterogeneidade no desenvolvimento da doença pode estar relacionada a virulência da cepa de Mtb, aos fatores genéticos do indivíduo infectado ou, a combinação da resposta patógeno-hospedeiro no curso do processo infeccioso. Acredita-se que o perfil de virulência da cepa infectante pode contribuir na severidade da TB e, conseqüentemente no desfecho clínico desfavorável. Caracterizar a virulência de isolados clínicos de Mtb circulantes em determinada região, possibilita compreender melhor a patogenicidade das cepas de Mtb circulantes. O presente trabalho teve por objetivo caracterizar cepas de Mtb, isoladas de pacientes atendidos no município de Duque de Caxias e Rio de Janeiro, no período de 2016 a 2019, com relação ao perfil de virulência micobacteriana e o caráter da resposta dos macrófagos infectados pela micobactéria, em condições *in vitro*. Para tal, foi avaliado a virulência de 5 isolados clínicos de Mtb obtidos dos pacientes com TB pulmonar grave (1 cepa), TB pulmonar moderada (2 cepas) e TB pulmonar não grave (2 cepas) em comparação à cepa laboratorial de referência H37Rv, através dos principais parâmetros: as taxas de crescimento intracelular em macrófagos RAW 264.7 e em cultura no meio líquido 7H9, e a capacidade de indução de morte celular necrótica nos macrófagos infectados (citotoxicidade). Além disso, avaliamos o perfil de ativação dos macrófagos pelo Mtb, através da análise da produção de mediadores pró e anti-inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β e IL10). Os resultados demonstraram que a cepa 2201/16 (TB grave) exibiu alto nível de crescimento em macrófagos e foi capaz de induzir morte por necrose em células infectadas em MOI (Multiplicidade de infecção) 10:1, sendo considerada altamente virulenta. As cepas 1909/17 e 2203/16 (TB moderada) exibiram níveis intermediários de crescimento em macrófagos e de indução de morte por necrose em células infectadas em MOI 10:1, sendo consideradas virulentas. As três cepas obtiveram crescimento, indução de morte celular e de citocinas pró-inflamatórias superiores a cepa padrão H37Rv. Em contrapartida, as cepas 1879/16 e 2351/17 demonstraram baixo crescimento intracelular e baixa toxicidade em culturas de macrófagos infectados em alta dose de infecção, MOI 50:1, em comparação a H37Rv, sugerindo baixa virulência. Esses resultados podem sugerir uma associação entre o grau de virulência da cepa infectante com a severidade da doença no hospedeiro.

Palavras-chave: *M. tuberculosis*, virulência, resposta imunitária

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a serious public health problem worldwide, with a high mortality rate, being the main cause of death by a single infectious agent, in non-pandemic situations. The emergence of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) strains resistant to available drugs threatens the control of TB and favors the transmissibility of this disease. Mtb infection mainly affects the lungs, being the most common form of tuberculosis. Pulmonary tuberculosis presents different profiles of lung tissue damage throughout the infectious process, and may present mild to severe forms, with significant involvement of lung tissue. The heterogeneity in the development of the disease may be related to the virulence of the Mtb strain, the genetic factors of the infected individual or the combination of the pathogen-host response in the course of the infectious process. It is believed that the virulence profile of the infecting strain may contribute to the severity of TB and, consequently, to the unfavorable clinical outcome. Characterizing the virulence of clinical isolates of circulating Mtb in a given region makes it possible to better understand the pathogenicity of circulating Mtb strains. The present study aimed to characterize Mtb strains isolated from patients treated in the municipality of Duque de Caxias and Rio de Janeiro, from 2016 to 2019, in relation to the mycobacterial virulence profile and the character of the response of macrophages infected by the mycobacteria, under in vitro conditions. To this end, the virulence of 5 clinical isolates of Mtb obtained from patients with severe pulmonary TB (1 strain), moderate pulmonary TB (2 strains) and non-severe pulmonary TB (2 strains) was evaluated in comparison with the laboratory reference strain H37Rv, through the main parameters: intracellular growth rates in RAW 264.7 macrophages and in culture in 7H9 liquid medium, and the ability to induce necrotic cell death in infected macrophages (cytotoxicity). Furthermore, we evaluated the activation profile of macrophages by Mtb, by analyzing the production of pro- and anti-inflammatory mediators (NO, TNF- α , IL-1 β and IL10). The results showed that strain 2201/16 (severe TB) exhibited a high level of growth in macrophages and was able to induce death by necrosis in infected cells at MOI (Multiplicity of Infection) 10:1, being considered highly virulent. Strains 1909/17 and 2203/16 (moderate TB) exhibited intermediate levels of macrophage growth and induction of death by necrosis in infected cells at MOI 10:1, being considered virulent. The three strains obtained growth, cell death induction and pro-inflammatory cytokines superior to the standard strain H37Rv. In contrast, strains 1879/16 and 2351/17 showed low intracellular growth and low toxicity in cultures of infected macrophages at a high infection dose, MOI 50:1, compared to H37Rv, suggesting low virulence. These results may suggest an association between the degree of virulence of the infecting strain and the severity of the disease in the host.

Keywords: *M. tuberculosis*, virulence, immune response.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A tuberculose

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, transmitida pelo ar e causada principalmente pelo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), o bacilo de Koch (BK) (GUPTA *et al.*, 2018). É um problema grave de saúde pública mundial desde 1993, apresentando elevada taxa de morbi/mortalidade, sendo em 2020 a segunda principal causa de morte por único agente de infecção, devido à pandemia de COVID-19 (WHO, 2021). Sua principal forma é a tuberculose pulmonar, porém a TB pode atingir outros órgãos vitais do organismo, tais como rins, ossos e meninges, caracterizando a forma extrapulmonar da TB. A TB extrapulmonar está presente em indivíduos HIV-positivo e na maioria das vezes é pleural, linfática, raquidiana ou urogenital (NOGUEIRA *et al.*, 2012; JILANI *et al.*, 2021).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 1/4 da população mundial está infectada por Mtb, contudo 90% destes permanecem em estado latente de infecção e não desenvolvem a forma ativa da TB (HUNTER, 2020). A TB tem maior probabilidade de acometer indivíduos portadores de HIV/AIDS, subnutridos, diabéticos, usuários de tabaco e álcool. A coinfeção TB/HIV tem um relevante impacto na mortalidade da doença, devido ao fato de pessoas portadoras do vírus terem um risco aumentando em 26 vezes de desenvolver a forma ativa da TB em comparação com os não portadores, resultando na rápida progressão tanto da TB como da imunodepressão causada pelo HIV (BASTOS *et al.*, 2018).

Em 2020, segundo a OMS, foram estimados 10 milhões de casos incidentes de TB e 1,5 milhão de mortos pela doença, dentre os quais 214.000 indivíduos foram de HIV-positivos (WHO, 2021). O Brasil está entre os vinte e dois países com maior número de casos anuais de TB, ocupando a 20ª posição. No ano de 2020, o país notificou 66.819 novos casos de TB, com cerca de 4,5 mil óbitos em decorrência da mesma em 2019. O Rio de Janeiro, Amazonas e Acre são os estados brasileiros com maiores coeficientes de incidência de TB

(acima de 51 casos/100 mil habitantes) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021), sendo que a Região Metropolitana do Rio de Janeiro, no ano de 2018, apresentou a maior incidência, com 90 casos/100 mil habitantes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO TUBERCULOSE, 2020).

A incidência de TB no estado do Rio de Janeiro é aproximadamente duas vezes superior à do Brasil, segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) e do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). No ano de 2019, o estado do Rio de Janeiro notificou 15.725 novos casos de tuberculose, onde a Região Metropolitana I, que abriga grande parte da carga de TB do estado, teve proporção de 81,26% dos casos. No ano anterior, o Estado registrou a maior taxa de mortalidade (4,3/100 mil habitantes), conferindo o primeiro lugar em mortalidade no país (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO TUBERCULOSE, 2021).

Devido a pandemia de COVID-19 pelo SARS-CoV2, alterações importantes nos indicadores epidemiológicos e operacionais da TB no ano de 2020 foram evidenciados. Foi observado, no Brasil, uma redução de 16 % no total de notificações de novos casos de TB e de 14% no diagnóstico, quando comparado aos dados epidemiológicos de 2019 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021). Ademais, a OMS estima que poderá ocorrer 6,3 milhões de casos adicionais e 1,4 milhões de mortes adicionais por TB, entre os anos de 2020 e 2025, por consequência na dificuldade do atendimento e diagnóstico de TB durante a pandemia da COVID-19, (OMS, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A infecção por *Mtb* resulta em um espectro de manifestações patológicas, incluindo as formas leves (focal, tuberculoma ou infiltrativa) e formas destrutivas (fibrocavernosa ou cavernosa) (DINARDO *et al.*, 2021). O principal sintoma é a tosse, que pode ser seca ou produtiva, com presença de sangue, além de apresentar o comprometimento da saúde do paciente, com febre baixa e sudorese noturna, falta de apetite, emagrecimento e dor torácica. O raio-X clássico do pulmão revela a TB por imagens cavitacionais, atelectasias, infiltrado inflamatório difuso com aspecto “algodonoso” ou nódulos localizados que sugerem doença ativa. (MARTINO *et al.*, 2019).

A heterogeneidade clínica da TB pulmonar e extrapulmonar está relacionada com uma complexa interação de fatores do indivíduo infectado (suscetibilidade, mecanismos imunes desencadeados e variações gênicas que codificam ou regulam a resposta imune), do grau de virulência da cepa infectante e dos fatores ambientais. Onde as características patológicas da TB parecem ser determinadas pelas interações patógeno-hospedeiro (CHANDRASEKARAN *et al.*, 2017; HUNTER, 2020).

O rápido diagnóstico e início do tratamento são de extrema importância para aumentar as chances de cura do paciente, bem como, reduzir atrasos e falhas no tratamento. O exame bacteriológico é o mais eficaz no diagnóstico da micobactéria e são divididos basicamente em direto e de cultura (FERRI *et al.*, 2014). O Ministério da Saúde e a OMS recomendam que o teste de cultura seja utilizado em todos os casos suspeito de tuberculose, pois consegue confirmar a viabilidade dos bacilos, com elevada sensibilidade e especificidade. Também são utilizados o teste de dosagem de adenosina deaminase (ADA), a radiografia do tórax, o teste tuberculínico, a baciloscopia de escarro, o teste Interferon- γ Release Assays (IGRA), utilizado para o diagnóstico de tuberculose latente e testes moleculares (Xpert MTB / RIF), para diagnóstico de resistência (SILVA *et al.*, 2021).

O Ministério da Saúde e a OMS preconizam seis meses de terapia padrão para a TB sensível, em regime de Tratamento Diretamente Observado (TDO). São utilizados 4 fármacos de primeira linha, em duas fases, uma intensiva e outra de manutenção. A rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol, são utilizados por 2 meses, seguidos por mais 4 meses de tratamento com isoniazida e rifampicina (WHO, 2021). Quando realizado adequadamente, o tratamento padrão da TB é a melhor forma de prevenir o surgimento e disseminação da TB resistente. Além disso, o tratamento pode variar de acordo com a idade do indivíduo e com a presença de outras infecções associadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

O abandono precoce do tratamento ou o uso indevido dos medicamentos pode levar ao aparecimento de cepas de Mtb resistentes aos fármacos disponíveis, ameaçando o controle da TB e favorecendo a transmissibilidade desta doença. A resistência pode ser classificada em cinco tipos diferentes, que

vão desde monoresistentes a extensivamente resistentes (XDR-TB). A tuberculose multirresistente (MDR-TB) é definida como a tuberculose resistente à isoniazida (INH) e à rifampicina. A XDR-TB é definida como resistência aos fármacos rifampicina e isoniazida e resistência adicional a qualquer fluoroquinolona e a pelo menos um dos três agentes injetáveis (canamicina, amicacina ou capreomicina) (KURZ *et al.*, 2016).

O tratamento para pacientes com MDR-TB requer o uso prolongado de fármacos caros, de segunda linha, com eficácia reduzida e toxicidade aumentada. Os principais medicamentos de segunda linha utilizados no tratamento de MDR-TB e XDR-TB são aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polipeptídeos e Bedaquilina, onde o período de tratamento é maior (18-24 meses) e as chances de cura são consideradas baixas (KOUL *et al.*, 2011; KURZ *et al.*, 2016).

A vacina BCG (bacilo Calmette-Guérin), ofertada pelo SUS, é a principal forma de prevenção, pois protege as crianças das formas mais graves da doença. A vacina BCG foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, do Instituto Pasteur. Foi necessário cerca de 13 anos e mais de 200 passagens em cultura para se alcançar a forma atenuada da cepa virulenta original de *Mycobacterium bovis*. A BCG foi administrada pela primeira vez como vacina em 1921, em crianças. Apesar de sua proteção estar limitada as formas mais graves, o seu uso vem salvando muitas vidas ao longo dos anos (RIBEIRO, 2015). Além disso, o tratamento da Infecção Latente da Tuberculose (ILT) é uma importante estratégia de prevenção para evitar o desenvolvimento da tuberculose ativa, bem como o emprego de medidas que controlem a infecção (SHAPOVALOVA, 2016).

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

O gênero *Mycobacterium* é constituído por dois grupos principais, onde o primeiro inclui micobactérias tuberculosas, pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), e o segundo é formado por micobactérias não tuberculosas (MNT), como aquelas pertencentes ao complexo *M. avium*

(MAC), incluindo *M. avium* e *M. intracellulare*, como também *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. marinum* e *M. goodii* (FARIA *et al.*, 2015; JAGIELSKI *et al.*, 2020).

O MTBC é formado pelas espécies *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* BCG, *M. caprae* e *M. pinnipedii*. As espécies pertencentes a esse complexo apresentam 99,9% de identidade genética, sendo essa semelhança identificada por elementos comuns existentes no DNA, como a sequência 16S, a inserção IS6110 e uma sequência de bases repetitivas de DR (*direct repeated*). Porém, essas espécies apresentam algumas diferenças, como a patogenicidade, as características epidemiológicas e fenotípicas, o tropismo por hospedeiros e os padrões de patologia induzida (WILDNER *et al.*, 2011). Estudos demonstram que os membros pertencentes ao MTBC evoluíram de um ancestral comum, por meio de sucessivas deleções e inserções de DNA resultando nas diferenças entre as espécies e na patogenicidade (FORRELLAD *et al.*, 2013).

As micobactérias que formam o complexo *M. tuberculosis* possuem um crescimento bacteriano considerado lento (crescimento visível de colônias no meio sólido em 21 dias) e são potenciais causadores da TB humana. Deste grupo, a espécie *Mtb*, o principal agente etiológico da TB humana, é a mais bem descrita sendo um bacilo intracelular facultativo, imóvel, aeróbio, em formato de bastonetes, sem flagelos e sem a formação de esporos. (TEIXEIRA *et al.*, 2018). Suas colônias têm aspecto rugoso, são secas, acromógenas e branco-acinzentadas ou amarelo-acastanhadas (SIMEÃO *et al.*, 2008).

A parede celular micobacteriana é uma estrutura complexa, rica em lipídios, principalmente em ácidos micólicos, que são responsáveis por formar uma barreira hidrofóbica resistente à descoloração por álcool-ácido, sendo denominadas de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), além de conferir antigenicidade, virulência, crescimento lento e resistência a antibióticos e desinfetantes. Estas características dificultam a ação de células imunes e dos fármacos utilizados durante o tratamento da TB. O método de coloração de Ziehl-Neelsen é utilizado na detecção dos BAAR, onde os bacilos são tratados com fucsina fenicada, e resistem à descoloração por uma solução de álcool-ácido, permanecendo corados em vermelho (TEIXEIRA *et al.*, 2018).

A estrutura da parede celular (**Figura 1**) é composta por três camadas distintas, um polímero reticulado de peptideoglicano, um polissacarídeo arabinogalactano altamente ramificado e ácidos micólicos de cadeia longa. A bicamada de fosfolipídios da membrana interna contém glicolipídios que se estendem para o espaço periplasmático. E a camada mais externa é constituída pela cápsula, que é composta por proteínas e polissacarídeos (ABRAHAS e BERSA, 2016). Intercalados na camada de micolato estão uma variedade de lipídeos, como lipoarabinomanano (LAM), trealose dimicolato (TDM) e dimicoceratos de tiocerol (DIM), não covalentemente ligados, incluindo glicofosfolipídios e ceras inertes, que formam a membrana externa e parecem desempenhar um importante papel na virulência micobacteriana (LY e LIU, 2020).

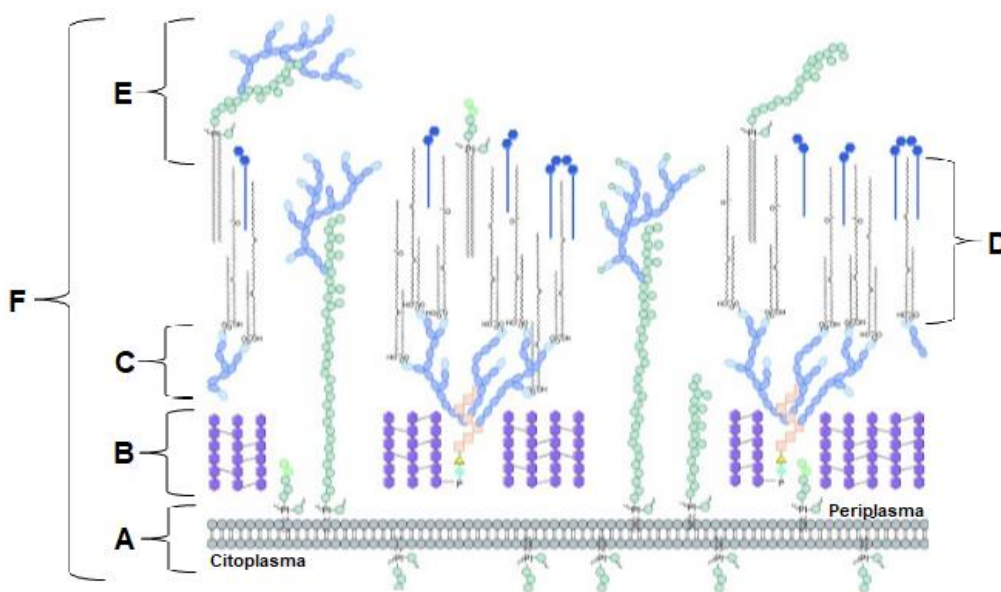


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura da parede celular micobacteriana. As letras representam (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicanos, (C) arabinogalactanos, (D) ácidos micólicos (E) lipídeos (LAM, TDM e DIM) não covalentemente ligados e (F) características proeminentes, nas cores verdes e azuis claros, como glicolipídeos (PIMs, fosfatidil-mio-inositol manosídeos; LM, lipomanano; LAM, lipoarabinomanano; ManLAM, lipoarabinomanano manosilado) e ácidos peptidoglicano (Adaptado de ABRAHAS e BERSA, 2018).

Através do desenvolvimento da biologia molecular, tornou-se possível a utilização de técnicas baseadas na avaliação do DNA, sendo importantes na identificação de diferentes cepas de uma mesma espécie, possibilitando a diferenciação de isolados clínicos e a identificação de cepas individuais de Mtb,

favorecendo a realização de estudos epidemiológicos. A utilização de diferentes métodos de genotipagem micobacteriana possibilita a distinção de cepas Mtb em diferentes famílias e linhagens filogenéticas importantes (JAGIELSKI *et al.*, 2014). A espoligotipagem é uma técnica baseada no locus DR (Direct Repeat locus), e detecta sequências de DNA espaçadoras na região DR, permitindo o agrupamento de diferentes cepas de Mtb em famílias epidemiológicas importantes, como as famílias Beijing, Haarlem, S, T, X, East African-Indian (EAI) e a Latin American-Mediterranean (LAM). (KATO-MAEDA *et al.*, 2011; COSCOLLAA e GAGNEUXA, 2014). A genotipagem que utiliza polimorfismos de sequência grande (LSPs), permite a delimitação de seis linhagens principais do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, Linhagem 1 (conhecido como linhagem oceânica), linhagem 2 (leste asiático e inclui "beijing"), linhagem 3, linhagem 4 (Euro-americanas), linhagem 5 (Africano Ocidental 1) e Linhagem 6 (Africano Ocidental 2) (GAGNEUX *et al.*, 2006).

A família Beijing é a mais estudada e o seu sucesso em diferentes regiões, como nos países asiáticos e Rússia, vem sendo atribuído a sua alta transmissibilidade, rápida adaptação ao hospedeiro, aumento da virulência e resistência aos fármacos. Já em países como o Brasil e Moçambique, a prevalência dessa linhagem é relativamente baixa e isso pode ser devido às diferenças na suscetibilidade dos indivíduos e/ou nas particularidades das cepas que circulam nessa região (GOMES *et al.*, 2015). As cepas Beijing e Haarlem são responsáveis por grandes surtos em hospedeiros humanos e compartilham uma exclusão genômica na região TbD1, que permanece intacta em outras famílias. Os termos moderno e antigo, designados às cepas de Mtb, referem-se a ausência ou presença da região TbD1, respectivamente (BRITES e GAGNEUX, 2017).

O grau de virulência da cepa infectante pode determinar a severidade da TB e um desfecho clínico desfavorável. Onde cepas de Mtb hipervirulentas geram uma severa patologia pulmonar com dano tecidual e alta carga bacilar, ao contrário de cepas com baixa virulência (AMARAL *et al.*, 2014, RIBEIRO *et al.*, 2021). Além disso, estudos recentes vêm demonstrando que Mtb teria a capacidade de formar biofilmes nos pulmões de camundongos e humanos. A formação de biofilmes bacterianos dentro do hospedeiro traz diversos benefícios

aos patógenos, sendo importantes na virulência e resistência micobacteriana, por desempenharem um papel crucial no estabelecimento da infecção e na proteção dos bacilos residentes contra a resposta imune e aos agentes antimicrobianos (CHAKRABORTY *et al.*, 2021).

1.3 Resposta imune contra micobactéria e imunopatologia da tuberculose

A principal forma de transmissão da TB ocorre através do ar, de forma direta, pela inalação de aerossóis contendo Mtb, que foram expelidas através da tosse, espirro ou fala de indivíduos com TB pulmonar ativa (CHAI *et al.*, 2020). Após a infecção por Mtb, o bacilo pode ser eliminado pelas células imunes, entrar em fase de latência ou desencadear uma multiplicação bacteriana evoluindo para TB ativa. Em sua maioria (**Figura 2**), os indivíduos acometidos permanecem em estado latente de infecção, onde o recrutamento de células imunes inatas (macrófagos e neutrófilos) para o pulmão com posterior ativação da imunidade adaptativa conduz ao estabelecimento de granulomas com a finalidade de conter o crescimento e a disseminação bacilar. Porém, existem diversos fatores que podem determinar a progressão da doença à forma ativa, tais como comorbidades e coinfeções, a virulência e dose de infecção, falha na resposta imune protetora e fatores ambientais que determinam a reativação da forma ativa da doença e sua progressão, podendo culminar no desenvolvimento de patologia necrótica que pode resultar em sequelas como a cavitação, que promove a perda de volume e déficits pulmonares crônicos, além da transmissão bacilar (KUMAR *et al.*, 2011; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2017).

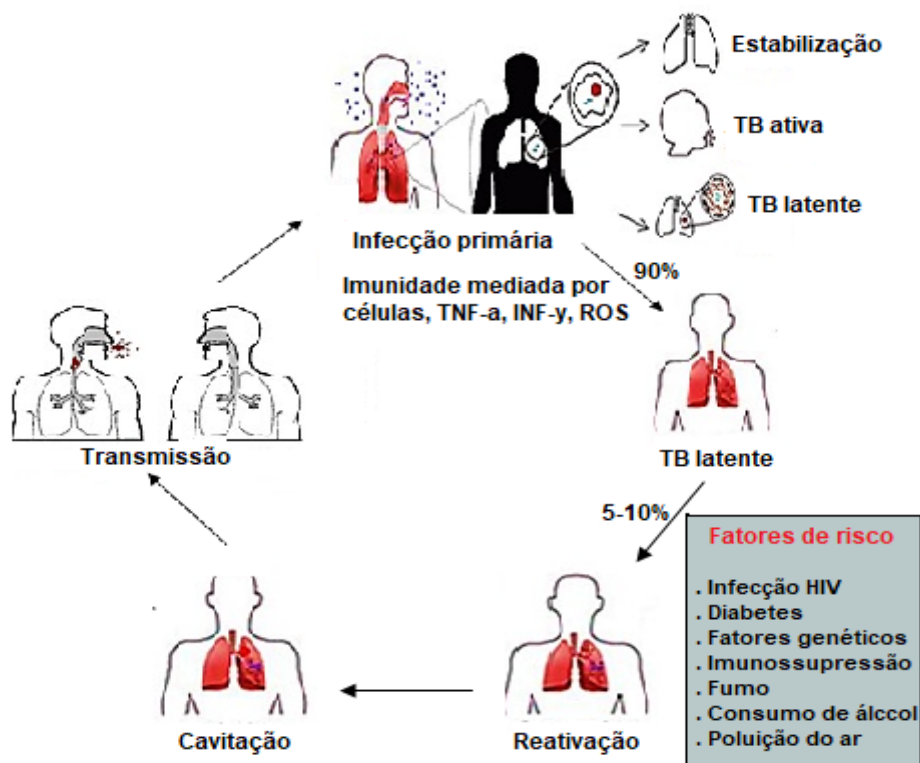


Figura 2 - Sequência de eventos que ocorrem após a infecção por Mtb e a progressão da doença (Adaptado de KUMAR *et al.*, 2011).

O sistema imunitário inato constitui a primeira linha de defesa de um organismo, frente a uma infecção por um determinado patógeno. Ao invadir a via respiratória de um hospedeiro, as micobactérias encontram barreiras, como a depuração mucociliar e as células epiteliais das vias aéreas (CEVAs), que dificultam a sua entrada. Porém, aquelas que conseguem escapar e chegar aos alvéolos pulmonares enfrentam a fagocitose dos macrófagos alveolares como um importante obstáculo para sua multiplicação, que pode resultar na eliminação das micobactérias ou na inibição do seu crescimento pelo sistema imune, configurando a forma latente da infecção (SILVA, 2012).

Os alvéolos pulmonares são formados por um revestimento fino de células epiteliais do tipo I e II, e por células do sistema imunitário, como macrófagos alveolares (MAs), células dendríticas (CDs) e neutrófilos. Enquanto as células epiteliais do tipo I formam as paredes dos alvéolos e realizam trocas gasosas, as células epiteliais do tipo II são infectadas por Mtb, e semelhante as células epiteliais das vias aéreas produzem moléculas antimicrobianas, além de produzirem e secretarem surfactante, enzimas hidrolíticas e hidrolases no

pulmão. (LERNER *et al.*, 2015). Os surfactantes causam aglutinação de Mtb e intensificam a fagocitose realizada pelos macrófagos. Já as hidrolases modificam a parede celular da micobactéria, afetando suas interações com os macrófagos e conseqüentemente, as respostas imunes (ARCOS *et al.*, 2011).

Depois que o Mtb entra no pulmão, os bacilos são capturados por macrófagos alveolares, células dendríticas e neutrófilos, ou ocasionalmente células epiteliais; o último possivelmente resultando em crescimento bacteriano precoce limitado. As células infectadas começam a produzir e secretar peptídeos antimicrobianos, citocinas (como interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α , IL-12 e IL-6) e quimiocinas. Outras células imunitárias e macrófagos permissivos são atraídos para o local da infecção (O'GARRA *et al.*, 2013). O próprio Mtb, usando múltiplas estratégias, direciona o recrutamento de macrófagos e desencadeia a formação de granulomas (NDLOVU e MARAKALALA, 2016). Os granulomas secundários são formados por macrófagos infectados que partem do granuloma primário ou quando um granuloma se rompe. Enquanto o Mtb se replica livremente nos macrófagos, as células dendríticas migram para os linfonodos locais, para ativar as células T. A chegada de células T específicas de Mtb no pulmão geralmente não acontece até 14-21 dias após o início da infecção (GALLEGOS *et al.*, 2008). Sua produção de TNF- α e interferon- γ (IFN- γ) estimula as atividades de morte pelos macrófagos. Além disso, as células T completam a formação do granuloma formando o manguito linfocítico que o envolve (O'GARRA *et al.*, 2013).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), proteínas geralmente localizadas na membrana plasmática das células fagocíticas, são importantes no reconhecimento e na interação com o patógeno, através dos PAMPs (Padrões Moleculares Associados a Patógenos) presentes na superfície das micobactérias (CRUVINEL *et al.*, 2010; STAMM *et al.*, 2016). Os principais receptores envolvidos no reconhecimento de Mtb e na ativação da resposta imune contra a micobactéria são do tipo Toll-like (TLRs), receptores de lectinas do tipo C (CLR), incluindo DC-SIGN, receptores de manose (CD206) e os receptores do tipo NOD. Dentre os receptores Toll-like, o TLR2 reconhece o maior número de PAMPs identificados, como as lipoproteínas e os peptideoglicanos (ERNST, 2012; STAMM *et al.*, 2016).

Os receptores Toll-like desempenham um papel fundamental na imunidade inata, por serem importantes na iniciação e modulação das respostas do hospedeiro ao Mtb. A interação entre a micobactéria e esses receptores desencadeiam uma séria de cascatas de sinalização intracelular, que induz a expressão de citocinas pró- inflamatória (IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α), quimiocinas e receptores de adesão celular, que auxiliam no processo inflamatório do tecido e contribuem para a ativação de macrófagos e recrutamento de outras células, como os neutrófilos, células natural de Killer (NK), monócitos e linfócitos para o sítio ativo da infecção. Porém, esse reconhecimento também pode desencadear sinais que atenuam a resposta imune inata (JO, 2008; LYADOVA, 2012).

Os macrófagos são as principais células de defesa do sistema imune inato de um organismo frente a uma infecção pelo Mtb e desempenham um papel crucial no controle e progressão da doença. Quando são ativados tendem a aumentar o tamanho e a quantidade de vacúolos fundidos com os fagolisossomos, distribuídos no citoplasma, formando um local hostil para micobactéria. Além disso, quando estão ativados iniciam a secreção de mediadores imunológicos e moléculas bactericidas como, mediadores químicos (IL-1 β , TNF- α , IL-12), peptídeos antimicrobianos, fator de crescimento TGF- β , a quimiocina CXCL8, espécies reativas de oxigênio (ROS) (ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e intermediários reativos do nitrogênio, onde o principal é o óxido nítrico (NO). O NO é sintetizado pela óxido nítrico-sintase induzida (iNOS), que é ativada pelo reconhecimento de TLRs, principalmente na presença de INF- γ . O NO produzido limita o acúmulo de células T diferenciadas no granuloma e a atividade do inflamassoma NLRP3, requerida para a resposta inflamatória inata. A produção de NO juntamente com ROS se tornam altamente eficazes como agentes antimicrobianos. (CRUVINEL *et al.*, 2010; HERREIRA *et al.*, 2018; AGUAYO-CERÓN *et al.*, 2019).

Os neutrófilos recrutados, além de fagocitarem as micobactérias, liberam armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), que tem como constituintes o DNA nuclear, a histona citrulinada-H3 (cit-H3), a interleucina 17, proteases (metaloproteinases de matriz (MMP-1 e 8)) e elastase neutrofílica, um importante mediador da lesão tecidual. Alguns estudos sugerem a fina relação entre neutrófilos e a imunopatogênese da tuberculose pulmonar, onde a quimioatração

e acúmulo excessivo de neutrófilos podem estimular processos inflamatórios graves que resultam no dano tecidual (LIU *et al.*, 2016; DE MELO *et al.*, 2019).

Os neutrófilos são abundantes nas vias aéreas de humanos com TB ativa (EUM *et al.*, 2010). Seu papel na TB parece dicotômico: altos números de neutrófilos no sangue no momento da exposição estão associados a menor probabilidade de infecção (MARTINEAU *et al.*, 2007). Por outro lado, mais tarde, na TB, seus números no sangue foram associados a piores resultados dos pacientes (BARNES *et al.*, 1988; LOWE *et al.*, 2013). Vários mediadores solúveis (entre outros IL-1 β , IL-8, IL-17, PGE2, LTB4 e fator estimulador de colônias de granulócitos) promovem o recrutamento de neutrófilos (LOWE *et al.*, 2013), outros, como IFN- γ e óxido nítrico (NO), reduzem o recrutamento e a sobrevivência de neutrófilos, em parte através da inibição de IL-17 (NANDI e BEHAR, 2011), IL-1 β e 12-lipoxigenase (12-LOX) (MISHRA *et al.*, 2017).

No momento da apresentação da TB ativa, os neutrófilos estão associados a danos pulmonares: uma assinatura de transcrição de sangue total dirigida por neutrófilos e induzida pela via de IFN (BERRY *et al.*, 2010), contagens de neutrófilos e níveis séricos mais elevados de proteínas S100 (uma proteína produzida por neutrófilos, promovendo seu próprio recrutamento) (BERROCAL-ALMANZA *et al.*, 2016) em pacientes com TB ativa relacionam-se com a extensão da doença pulmonar vista em radiografias do tórax. Interessantemente, os neutrófilos são as únicas células que armazenam MMPs (ONG *et al.*, 2015).

A imunidade adaptativa contra a micobactéria é intermediada principalmente pelas células T auxiliares (T CD4+) e T citotóxicas (T CD8+) (SCHRAGER *et al.*, 2016). Dentre as células T auxiliares, a Th1 e a Th17 são as principais células efetoras na proteção contra o Mtb (PANTELEEV *et al.*, 2015). Os linfócitos T CD4+ desempenham papel primordial na resposta contra o bacilo. Isso explica o porquê de pacientes com deficiências em células T CD4+, como no caso de portadores do vírus HIV, serem tão suscetíveis ao Mtb. As células T CD4+ secretam citocinas importantes, como as IL-2, IL-12, IL-18, TNF- α , TNF- β e IFN- γ , que auxiliam no controle da micobactéria, através da indução do processo inflamatório do tecido e da ativação, expansão e diferenciação dos linfócitos. A diferenciação nas linhagens de Linfócitos T auxiliares é dependente

do tipo de citocina expressa. Como a infecção pela micobactéria tem uma alta produção de IL-12, a resposta é majoritariamente do tipo Th1 (LYADOVA, 2012; (TZELEPIS *et al.*, 2018).

Os linfócitos Th1 são responsáveis por secretar principalmente o IFN- γ , que é responsável pela ativação de macrófagos e outras células, atuando no aumento da capacidade fagocítica e estimulando uma maior produção de IL-12, TNF- α e mediadores da oxidação (PANTELEEV *et al.*, 2015). Nesse tipo de resposta também é secretado o fator de necrose tumoral (TNF- α), citocina importante na manutenção do granuloma, permitindo a persistência da TB latente. Outras citocinas, como TGF- β , IL-1 β , IL-6, IL-21 e IL-23 são responsáveis por diferenciar os linfócitos TCD4 em Th17, um tipo de célula T auxiliar, que sintetiza citocinas importantes (IL-17, IL-21 e IL-22) que estimulam a síntese de defensina e promovem a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos durante a infecção inicial (SCHWANDER *et al.*, 2011; PANTELEEV *et al.*, 2015). Existe uma complexidade entre a interação dos linfócitos Th1 e Th17 na patogenia da tuberculose, pois apesar do tipo Th17 não inibir e em alguns casos até favorecer a resposta Th1, o IFN- γ , principal citocina Th1, é responsável por inibir a diferenciação em Th17. (NIKITINA *et al.*, 2018).

Apesar do papel dos linfócitos T CD8+ não estar totalmente definido na patogenia da TB, eles apresentam função citolítica contra as células infectadas pela micobactéria, gerando poros em sua membrana celular (SILVA, 2012). As células T regulatórias (T reg) são um subtipo de linfócitos TCD4+ que expressam o fator de transcrição FOXP3, sendo importantes na regulação da resposta imune, ao inibirem a função das células T efetoras (CARVALHO, 2009). Essa característica é devido à capacidade de sintetizar citocinas imunossupressoras (IL-10, TGF- β e IL-4) que promovem a ativação da via Th2 e inibem a Th1 (JÚNIOR *et al.*, 2010). Por isso, essas células apresentam grande importância na regulação da resposta imune contra Mtb, principalmente na forma grave da doença, podendo diminuir a resposta das células efetoras, minimizando o dano tecidual inflamatório. Porém, a produção excessiva das citocinas imunossupressoras pelas células T reg pode interromper o controle da infecção (MOUTINHO, 2011).

Com o decorrer do tempo, as células que migram para o sítio ativo da infecção formam um agregado celular compacto, denominado granuloma, que é composto por macrófagos infectados, neutrófilos, CDs, células Natural Killer e células B e T, rodeados por fibroblastos. O granuloma (**Figura 3**) é a principal característica da resposta imune a TB, e apesar de inibir o crescimento e a disseminação bacilar, ele também é considerado como uma forma de manter a multiplicação dos bacilos e conseqüentemente a sua sobrevivência, ao fornecer um nicho celular adicional a expansão da população micobacteriana (EHLERS *et al.*, 2013). A maioria dos granulomas humanos é composta por um centro de macrófagos infectados, com a capacidade de se diferenciar, por exemplo, em células epitelióides, células gigantes multinucleadas e macrófagos espumosos. Existem diferentes tipos de granuloma: celular, supurativo, fibrótico ou caseoso (CANETTI, 1955).

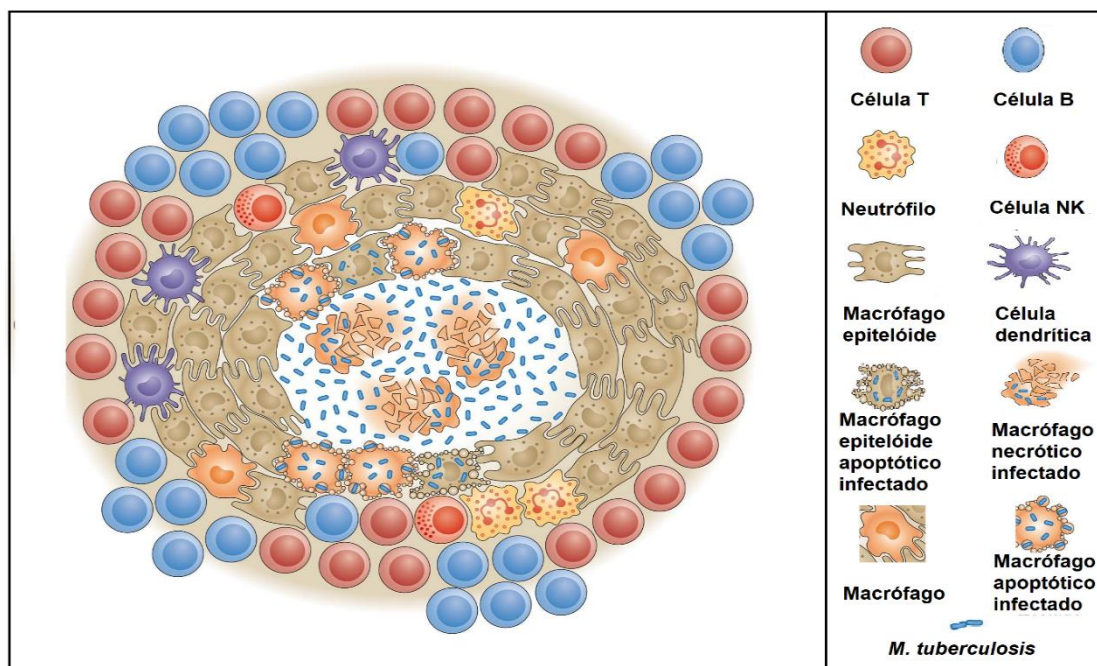


Figura 3 - Representação esquemática da constituição, organização e estruturação do granuloma na TB (Adaptado de CADENA *et al.*, 2017).

O granuloma clássico da TB humana é o granuloma caseoso, que ocorre quando as células dentro do granuloma sofrem necrose. O acúmulo de neutrófilos no foco inflamatório e a morte necrótica das células infectadas conduz a formação da caseose central e promove a liberação de uma variedade de produtos microbicidas e citotóxicos, que são importantes mediadores da lesão

tecidual (DE MELO *et al.*, 2019). A progressão das lesões necróticas pode culminar em sequelas como a cavitação levando a perda de volume e déficits pulmonares, além de fornecer um nicho seguro para os bacilos, devido a penetração limitada de leucócitos e antibióticos nos tecidos necróticos. As cavidades são vulneráveis à colonização secundária por infecções oportunistas (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Diversos tipos de granulomas podem estar presentes em um pulmão ao mesmo tempo, desde pequenos granulomas celulares até múltiplos granulomas caseosos que aderem e expõem seu conteúdo para formar grandes cavidades; eles se comportam independentemente um do outro, e existem diferentes perfis imunológicos entre (SUBBIAN *et al.*, 2015) e dentro (MARAKALALA *et al.*, 2016) dos granulomas. Granulomas podem ser estáveis, ou podem progredir. Clinicamente, o comportamento de alguns ou mesmo um único granuloma mal controlado pode determinar o desfecho da doença em nível de hospedeiro (STEK *et al.*, 2018).

Quando a carga de antígeno bacilar é esparsa e a resposta imune é bem sucedida, os granulomas que se formam com macrófagos ativado conseguem eliminar o Mtb e conter a infecção, formando um granuloma calcificado. Porém, quando a carga de antígeno e as reações de hipersensibilidade do tecido são altas, isso pode promover uma reação perifocal exagerada com necrose maciça, resultando em cavitação. Dessa forma, o equilíbrio entre as reações de hipersensibilidades tardias (DTH) e a carga de antígeno micobacteriano é importante na imunopatologia da TB. Pois ao mesmo passo que a DTH é considerada benéfica, devido promover a ativação de macrófagos para eliminação de Mtb, se estiver em excesso e com alta carga de antígeno bacilar, também é responsável por quase todos os danos teciduais produzidos por esta doença (HUNTER, 2020).

Apesar da resposta inflamatória ser uma resposta protetora essencial a infecção por Mtb, uma resposta inflamatória inadequada, com excessiva produção de mediadores inflamatórios e dano ao tecido pulmonar contribui para o agravamento da patologia pulmonar, desenvolvimento da patologia necrótica, formação de cavidades e promoção da disseminação e transmissão de micobactérias (VENTURA *et al.*, 2015).

O nível de inflamação resulta da interação do hospedeiro, patógeno e fatores extrínsecos. Porém é difícil dizer se a inflamação exagerada é causada pela hiper-reatividade intrínseca do hospedeiro ao patógeno, ou pela deficiência no controle do mesmo, devido a uma alta carga bacilar (LYADOVA, 2012). Inflamações muito baixas e altas frequentemente estão associados à TB destrutiva, com desfechos desfavoráveis de tratamentos, enquanto respostas imunológicas balanceadas estão associadas à TB amena, com desfechos favoráveis, e subsequente eliminação dos bacilos (BASTOS *et al.*, 2018).

Acredita-se que o dano tecidual pulmonar pode ser induzido por mecanismos de morte indiscriminados, que podem resultar em danos significativos ao tecido do hospedeiro. A remoção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos promove a morte subsequente de Mtb, enquanto a remoção de neutrófilos necróticos permite a sobrevivência e proliferação de micobactérias dentro dos macrófagos. Mtb conduz a necrose de neutrófilos, um processo que requer espécies reativas de oxigênio (ROS) derivadas de neutrófilos (DALLENGA *et al.*, 2017).

O tipo de morte celular induzida após a infecção por Mtb tem um caráter crucial na patogênese da TB, bem como no desfecho da doença. A apoptose, um tipo não inflamatório de morte celular, é um processo eficiente na eliminação das micobactérias, enquanto a necrose, um tipo inflamatório de morte celular, promove a perda da integridade da membrana plasmática e conseqüentemente, a liberação do conteúdo intracelular, além de promover a sobrevivência e disseminação dos bacilos e a inflamação tecidual. A secreção aumentada de TNF- α durante a infecção por Mtb, pode ser capaz de mudar a apoptose para necroptose, um tipo de morte celular que se assemelha à necrose clássica, porém, ao contrário é dependente de uma via de sinalização mediada por RIPK1 e RIPK3 (AMARAL *et al.*, 2016). A indução de morte necrótica nos macrófagos infectados por Mtb, promove a formação do complexo multiprotéico do inflamassoma e a produção de IL-1 β e IL-18, aumentando a inflamação no tecido pulmonar (ORME *et al.*, 2015).

Apesar dos esforços do sistema imune em combater o Mtb, em alguns casos, ele consegue escapar dos mecanismos de defesa através do sistema de secreção do tipo VII, denominado ESX-1, que secreta os fatores de virulência

EsxA (ESAT-6) e EsxB (CFP-10). A ESAT-6 é uma molécula capaz de inibir a produção de IL-12 e IFN- γ , desencadeando uma resposta anti-inflamatória, além de bloquear os intermediários da oxidação, interromper a maturação do fagossomo, formar poros na membrana do fagolisossomo e reduzir a acidificação no fagossomo (SASINDRAN *et al.*, 2011; AGUILERA, 2020). De certa forma, podemos resumir a patogênese da tuberculose pulmonar (**Figura 4**), com as respostas imunes inatas e adaptativas.

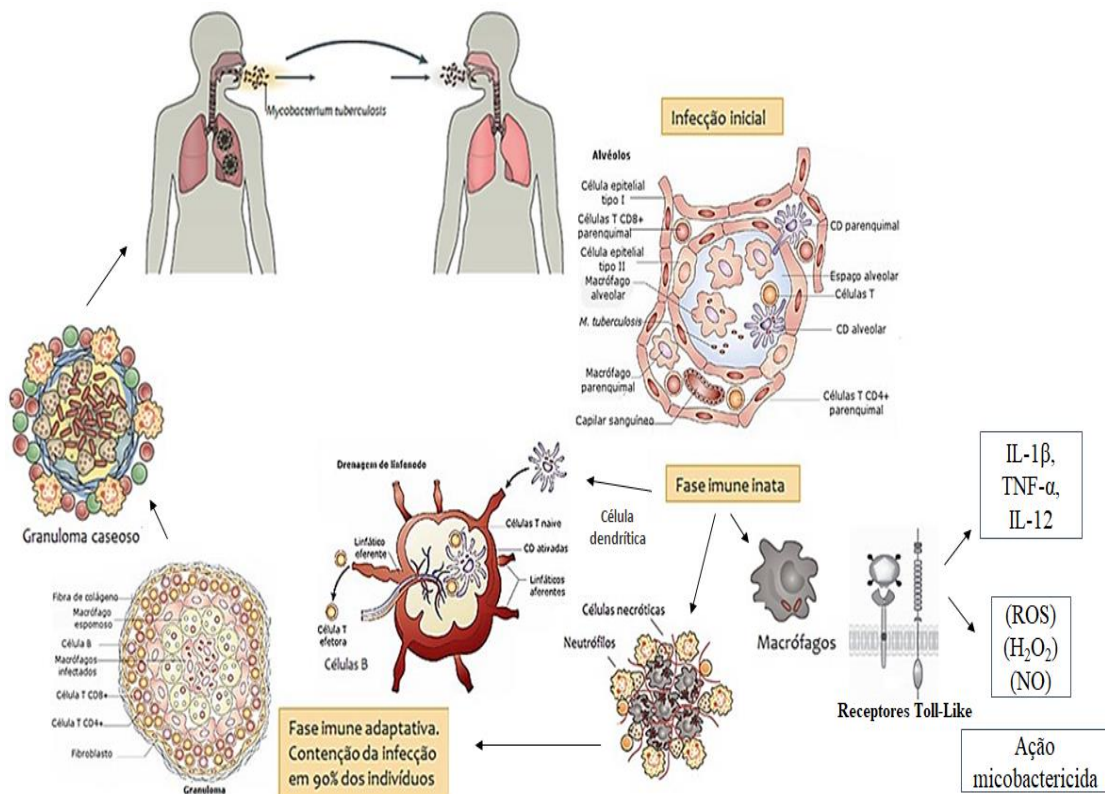


Figura 4 - Patogênese da Tuberculose, resumo da resposta imune inata e adaptativa na tuberculose (Adaptado de NUNES ALVES, 2014).

1.4 Virulência micobacteriana

A virulência pode ser definida como a capacidade de um agente patogênico se multiplicar e causar danos em seu hospedeiro, evadindo das defesas imunes e induzindo um processo patológico, podendo levar a morte (POULIN e COMBES, 1999). O sucesso das micobactérias em causar doenças

depende de diversos mecanismos que permitem a sua colonização, replicação e sobrevivência no hospedeiro. Portanto, os fatores que vão determinar a virulência micobacteriana podem ser definidos como produtos bacterianos ou componentes celulares modificados pela bactéria que irão permitir a sua sobrevivência de forma geral no hospedeiro. Alguns desses fatores foram identificados por análise genômica, bioquímicas e funcionais de Mtb (LY e LIU, 2020).

Existe uma grande variedade de parâmetros e condições para determinação da virulência, portanto, não existe ainda uma definição exata e universalmente aceita sobre o que constitui um gene de virulência. Contudo, um requisito importante na classificação de um gene como fator de virulência é que a sua perda ou deleção atenuem a patogenicidade do microrganismo e a sua disseminação em modelos *in vivo* (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Uma visão geral dos genes necessários a sobrevivência e virulência das micobactérias foi obtido utilizando bibliotecas de transposons mutantes de cepas de Mtb em modelos de infecção murina, revelando entre 200 e 500 genes essenciais para o crescimento de Mtb *in vivo*. Dentre estes, foram identificados vários genes importantes na determinação da virulência de Mtb, através de análises comparativas de bacilos atenuados e virulentos (KROESEN *et al.*, 2019). A maior parte desses genes de virulência codifica proteínas envolvidas em sistemas de secreção, mecanismos de persistência, enzimas de várias vias lipídicas, proteínas de superfície celular, reguladores e proteínas de sistemas de transdução de sinal. Outro grupo importante é aquele relacionado na sobrevivência de Mtb em microambientes desfavoráveis e agressivo, como em macrófagos. É notável que o Complexo Mtb não possui fatores de virulência considerados clássicos, como toxinas, e muito dos seus genes de virulência estão conservados em micobactérias não patogênicas, sugerindo assim, que as espécies patogênicas moldaram seu genoma de vida livre para a sobrevivência no microambiente intracelular, com aquisição mínima de genes de virulência exclusivos (FORRELLAD *et al.*, 2013).

Modelos experimentais de infecção *in vivo* e *in vitro* são utilizados para avaliar o impacto que os fatores de virulência tem na patogenia da TB. O teste de infecção *in vitro* realizado em grande parte em macrófagos, permite analisar

a interação intracelular da micobactéria com a célula hospedeira, por meio de parâmetros como a taxa de crescimento intracelular micobacteriano nos macrófagos infectados, que avalia a capacidade de Mtb em se adaptar em um ambiente desfavorável a sua sobrevivência. É conhecido que micobactérias virulentas crescem mais rápido que cepas avirulentas, sendo esta uma forma de evadir a defesa imune. Essa capacidade pode ser explicada, pelo menos em parte, ao fato da micobactéria conseguir interromper a maturação do fagossomo e se translocar para o citosol da célula fagocítica, através do sistema de secreção do tipo VII, denominado ESX-1 e aos fatores de virulência secretados por ele, como o EsxA (ESAT-6) e EsxB (CFP-10). Pois os mutantes Mtb que tiveram deleções genéticas ou defeitos na secreção de EsxA e / ou EsxB não conseguiram se deslocar para o citosol e demonstraram uma redução na lise de células hospedeiras e na infecção de outras células fagocíticas (AGUILERA *et al.*, 2020).

Dados recentes demonstram que o sistema de secreção ESX-1 atua juntamente com dimicoceratos de tiocerol (DIM ou PDIM) promovendo a ruptura do fagossomo durante a infecção de macrófagos pelo Mtb, sendo necessários para a patogenicidade das micobactérias tuberculosas. Os DIM ou PDIM são lipídeos presentes na membrana externa das micobactérias e são conhecidos como os principais fatores de virulência de Mtb (ORGEUR e BROSCH, 2017). O trealose dimicolato (TDM), um outro lipídeo encontrado na membrana de Mtb também é importante na sua virulência, ao inibir a estimulação de citocinas e suprimir a apresentação antigênica na resposta imune (HUNTER, 2020).

Além do sistema de secreção ESX-1, o ESX-3 e o ESX-5 também são necessários para a virulência total de Mtb. Onde foi verificado que as proteínas PE / PPE que são codificadas pelo sistema ESX-5 são altamente imunogênicas e representam um potencial fator de virulência. A função exata dessas proteínas ainda não está totalmente clara, mas elas podem estar envolvidas na integridade da parede celular micobacteriana, absorção de nutrientes, variação antigênica, inibição da maturação do fagossomo e crescimento micobacteriano em macrófagos (LY e LIU, 2020).

Outro parâmetro analisado *in vitro* é a capacidade das micobactérias virulentas e avirulentas na indução de morte celular em macrófagos

(citotoxicidade) e o tipo de morte. Alguns estudos demonstraram que o *M. tuberculosis* H37Rv, cepa virulenta induz morte por necrose em células hospedeiras infectadas, promovendo danos na sua membrana mitocondrial interna e externa, enquanto o *M. tuberculosis* H37Ra, não virulento, causou danos somente à membrana mitocondrial externa, não levando à necrose. A indução da necrose nas células infectadas favorece a liberação de conteúdo celular, incluindo as próprias micobactérias e proteínas de estresse que funcionam como sinais de perigo denominadas DAMPS (Padrões moleculares associados a danos), que induzem o recrutamento de novos fagócitos para o local da infecção para serem utilizados pelas micobactérias como células permissíveis a sua propagação (KROESEN *et al.*, 2021).

Também é possível avaliar o perfil de resposta imune desenvolvido contra Mtb, através da análise da produção de mediadores pró e anti-inflamatórios (NO, FNT- α , IL-1 β e IL-10) em modelos de infecção *in vitro*. Alguns estudos apontaram uma correlação entre a virulência de Mtb e a ausência da resposta Th1, enquanto outros sugeriram que certas cepas, principalmente aquelas com características especiais como a cepa Beijing, interagem de forma diferente com o hospedeiro e induzem respostas imunes distintas, podendo apresentar maior virulência e potencial de transmissão, estando associadas à ausência de resposta imune protetora e à supressão da produção de IL-1 β , IFN- γ e FNT- α . (CABRAL *et al.*, 2010).

A utilização do modelo de infecção *in vivo* é considerada o teste “padrão ouro” para avaliação da virulência e do perfil da resposta imune desencadeada pela micobactéria durante a interação com o hospedeiro. Para isso, são utilizados, principalmente, camundongos que são infectados pelo Mtb através das vias respiratórias e posteriormente são analisados parâmetros como: a morbidade e mortalidade induzida pela cepa micobacteriana, histopatologia e carga micobacteriana no pulmão, baço, fígado e outros órgãos (ALMEIDA *et al.*, 2017). A carga bacteriana pode ser avaliada pela quantificação do número de micobactérias (CFU- Colony forming unit) obtidas do pulmão ou outro órgão. Para avaliação da resposta imune desencadeada, pode ser utilizada a quantificação de mediadores inflamatórios e das subpopulações celulares dos leucócitos recrutados ao pulmão (MUSSI, 2017). Por fim, uma grande

quantidade de evidências demonstra que a virulência de micobactérias está determinada pelo efeito acumulativo de muitos fatores de virulência (LY E LIU, 2020).

Assim, a caracterização da virulência de isolados clínicos de Mtb circulantes em uma determinada região e seu impacto na severidade da TB torna-se um fator importante no controle da TB, uma vez que possibilita uma melhor compreensão das particularidades de patogenicidade das cepas de Mtb locais e das propriedades de modulação da resposta imunitária dessas cepas, que podem contribuir ou não para a sobrevivência do hospedeiro. Esse estudo fomenta as informações e o conhecimento sobre a influência das diferenças na virulência de cepas Mtb em relação a progressão da doença no hospedeiro, idealizado e realizado com isolados clínicos de pacientes do estado do Rio de Janeiro, que apresenta um dos maiores coeficientes de incidência de TB no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes com diferentes desfechos clínicos de TB pulmonar no estado do Rio de Janeiro, em relação à virulência e o caráter da resposta imune induzida nos macrófagos infectados *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a virulência de isolados clínicos de Mtb obtidos de pacientes com TB infiltrativa (forma amena da doença) e TB cavernosa (forma destrutiva), em comparação a cepa laboratorial de referência Mtb H37Rv, em modelo de infecção dos macrófagos *in vitro*, avaliando:
 - A taxa de crescimento micobacteriano intracelular em macrófagos RAW 264.7 infectados e em cultura no meio líquido 7H9;

- A capacidade de indução de morte celular necrótica em macrófagos (citotoxicidade).
- Avaliar o perfil de resposta dos macrófagos ao Mtb, através da análise da produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios (NO, TNF- α , IL-1 β e IL10);
- Analisar o conjunto de informações sobre virulência dos isolados clínicos de Mtb, obtidos a partir dos resultados no modelo *in vitro*, juntamente com os dados clínicos dos respectivos pacientes, verificando possíveis associações de nível de virulência com a patogenia da TB e a gravidade da doença desenvolvida no hospedeiro.
- Comparar, com base nos parâmetros utilizados, o nível de virulência entre os isolados clínicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultura Celular

As células da linhagem celular dos macrófagos murinos RAW 264.7 e J774A.1 foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 e 75 cm² (Corning) em meio Dulbecco's Modified Medium F-12 (DMEM F-12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL), 50 μ g/mL de gentamicina (Gibco BRL) e 25 μ g/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich). Para o macrófago J774A.1, o meio também foi suplementado com 2mM de L-glutamina (Sigma-Aldrich) e 1mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich), em estufa (Forma Scientific – water jacketed incubator) à temperatura de 37°C com 5% de CO₂.

Para a experimentação, as células RAW 264.7 foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Cellstar) (5×10^4 células/mL – 100 μ L/poço) com DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, por 24 h antes da infecção. Já as J774 foram cultivadas em placas de cultura de 24 poços (Cellstar) (5×10^5 células/mL – 100 μ L/poço) com DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB, por 24 h antes da infecção.

3.2 Obtenção e preparo da cultura estoque e do cultivo micobacteriano

Seis cepas de Mtb foram utilizadas no estudo: a cepa padrão H37RV e os isolados clínicos de pacientes do estado do Rio de Janeiro com TB grave (2201/16), TB moderada (1909/17, 2203/16) e TB não grave (1879/16, 2351/17). Estas cepas foram provenientes de pacientes com TB infiltrativa (forma amena) e de pacientes com TB cavernosa (forma destrutiva) e foram genotipadas e gentilmente cedidas pelo Dr. Afrânio Kritski do Centro de Pesquisa em TB da Faculdade de Medicina/UFRJ. A cepa laboratorial de referência Mtb H37Rv foi utilizada em comparação com as demais e sua cultura foi cedida pelo Dr. Philip Suffys (Fiocruz, RJ).

As culturas de Mtb isoladas dos pacientes foram transportadas ao LBR no meio de cultura sólido Middlebrook 7H10 (DIFCO, Detroit) suplementado com 10% de glicerol e 10% de OADC (ácido oléico, albumina, dextrose e catalase – BD BBL). Para o preparo de estoque de cepas Mtb, duas alças de colônias micobacterianas foram retiradas do meio sólido e colocadas em um tubo com tampa de rosca contendo pérolas de vidro, e agitado no vórtex (Biomotic). Após a agitação, foi adicionado 1 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit) acrescido de 0,05% glicerol e de 10% de ADC (albumina, dextrose, catalase - BD BBL) e agitado novamente no vórtex. Para destruir os grumos formados pelo Mtb durante o seu crescimento e obter uma suspensão homogênea, o tubo foi colocado em banho de ultra-som (Ultrasonic – Unique MaxiClean800) por 1 minuto. Para padronizar e ajustar a concentração das micobactérias na suspensão foi realizada uma leitura prévia da densidade ótica (D.O) da suspensão das culturas, em espectrofotômetro (Biochrom, modelo Libra s6), a 600 nm, subtraindo-se a densidade ótica do meio de cultura 7H9. A diluição da suspensão bacteriana obedeceu ao critério de relação da densidade ótica versus número de bacilos. Após quantificação da D.O. da suspensão bacteriana, foi realizada a diluição para a D.O. 0,100 e plaqueamento em ágar Middlebrook 7H10 suplementado. Depois de 21 dias, foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (CFU) para cada cepa e então obtida a relação entre CFU e D.O. 0,100. Desta suspensão, com o auxílio de uma alça de cultura, foi repicadas 3 alças para o meio sólido 7H10 fresco e alíquotas de 1

mL foram distribuídas em criotubos (107 a 108 bactérias/ml) e estocadas em freezer -70 °C.

Para os experimentos de infecção, as culturas foram descongeladas, crescidas em meio líquido 7H9 por 5 dias, e a D.O. foi ajustada a 0,100.

3.3 Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9

Todas as cepas de Mtb foram previamente descongeladas em meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO, Detroit) acrescido de 0,05% de glicerol e 10% de ADC. Logo após, a D.O. das cepas foi mensurada em espectrofotômetro a 600 nm. O valor obtido foi ajustado para a D.O. 0,050 e disposto para um tubo contendo o volume total de 10 mL. As suspensões bacterianas de cada cepa foram incubadas na estufa a 37 °C e a densidade óptica mensurada a 600 nm, em dias alternados (dia 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12) para cada cepa Mtb estudada. Com isso, foi avaliada a curva de crescimento de cada cepa por 12 dias.

3.4 Infecção dos macrófagos com as cepas de Mtb

A cultura de macrófagos RAW 264.7 foi infectada, separadamente, com cada cepa, em diferentes proporções de multiplicidade da infecção (MOI): 1:1 (bactéria/macrófago) para análise do crescimento micobacteriano através da quantificação do número de colônias (CFU) (ZHANG *et al.*, 1998); 10:1 para análise do perfil de mediadores pró e anti-inflamatórios, e também para avaliação de morte celular; 50:1 para avaliação da indução de morte celular provocada pela micobactéria (PARK *et al.*, 2006). Já a cultura de macrófagos J774A.1 foi infectada com diferentes cepas de Mtb, na proporção 10:1, para análise da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β . Pelo menos 8 poços foram infectados para cada tipo de avaliação.

Após 3h de contato bactéria-macrófago, para ocorrer a fagocitose das bactérias (LASUNSKAIA *et al.*, 2010), o sobrenadante foi removido e a

monocamada das células foi lavada com PBS por 3 vezes, para retirar as micobactérias não fagocitadas. Posteriormente, o meio DMEM-F12 suplementado com 2% de SFB foi acrescido à cultura infectada (DIA 0). As células infectadas foram mantidas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ durante 4 dias para avaliação dos parâmetros descritos acima.

3.5 Quantificação do crescimento intracelular micobacteriano

A quantificação do crescimento intracelular micobacteriano foi realizado nos macrófagos RAW 264.7 infectados na proporção (MOI 1:1) através da semeadura em ágar Middlebrook 7H10 suplementado com 10% de glicerol e 10% de OADC (Ácido oleico, albumina, dextrose, catalase) e posterior contagem de CFU. A cultura de macrófagos infectados por cada cepa foi lisada nos dias 0 e 4 após infecção, utilizando solução de saponina a 0,1% por 20 min. O lisado da cultura foi agitado, sonificado em ultrassom de banho, e diluído em PBS nas diluições de 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴. Alíquotas de 50µL da diluição de 10⁻³ e 10⁻⁴ foram semeadas em duplicata em ágar Middlebrook 7H10 suplementado. As placas foram incubadas por 21 dias à 37°C, e as colônias foram quantificadas. O número de colônias quantificadas foram ajustadas para CFU/mL e os valores expressos em Log¹⁰. A capacidade de crescimento intracelular de cada cepa foi expressa através da subtração das médias do CFU dia 4 e dia 0 (CFU_{dia4} - CFU_{dia0}). Esse procedimento foi realizado em triplicata.

3.6 Quantificação de citocinas e mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por isolados clínicos de Mtb

Para quantificação dos mediadores inflamatórios presentes no sobrenadante das culturas de macrófagos (RAW 264.7 e J774A.1) infectados pelos isolados clínicos de Mtb, foi utilizada a proporção de MOI 10:1. Os sobrenadantes, coletados em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3) após a infecção, foram congelados a uma temperatura de -20°C. As citocinas presentes nos

sobrenadantes foram quantificadas através do ensaio de ELISA sanduíche DuoSet, utilizando os kits correspondentes (RD SYSTEMS a biotechne brand) para, IL-1 β (J774), TNF- α e IL-10, de acordo com o protocolo do fabricante.

O NO produzido no sobrenadante das culturas de macrófagos RAW 264.7 infectados pelos isolados clínicos de Mtb foi quantificado através do método de Griess (ZHANG *et al.*, 2002). Cinquenta microlitros do sobrenadante da cultura foi acrescido de 50 μ L de reagente de Griess (p-aminobenzenosulfonamida 1% + diidrocloreto de naftilenodiamino 0,1% em 5% de ácido fosfórico (Sigma Aldrich). Após 10 min, a absorbância, a 570 nm, foi medida em espectrofotômetro de placa (Dynatech MR5000). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μ M, usando como referência uma curva padrão de nitrito de sódio (200 μ M a 1,56 μ M).

3.7 Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados

PARK *et al.* (2006) evidenciaram que a infecção de macrófagos por micobactérias patogênicas em altas doses de infecção (50 bactérias/macrófago) induz necrose nestas células. Para comparar a capacidade dos diferentes isolados de Mtb induzirem necrose nos macrófagos, as células RAW 264.7 foram infectadas na razão de MOI 50:1. A cultura de macrófagos infectados foi mantida por um período de 4 dias. Nos dias 1, 2, 3 e 4 de infecção, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada através da utilização do corante azul de tripan. Este corante penetra somente nas células mortas, corando-as de azul, o que possibilita a quantificação através de microscopia óptica (Microscópio invertido Nikon, 400x). O resultado obtido foi expresso em percentual de células azul de tripan positivas. A avaliação da capacidade de indução de morte celular também foi realizada na razão MOI 10:1, para aprofundar as informações obtidas nas infecções em altas doses e detalhar os intervalos de morte induzido por cada cepa testada.

A viabilidade dos macrófagos também foi avaliada através da utilização da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) no sobrenadante da cultura

celular, através da liberação da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH) utilizando o Kit comercial Labrax (GO, Brasil). O sobrenadante da cultura infectada na proporção de MOI 10:1 e 50:1 foi coletado em 24 h (Dia 1) e 72 h (Dia 3) de infecção, filtrado em filtro acetato de celulose de poro 0,22µm. Cinquenta microlitros do sobrenadante da cultura infectada por cada cepa no período de tempo mencionado, foram acrescidos de 100 µL da solução de alumen férrico e substrato, mantendo-se à 37°C por 3 min. Logo após, foram acrescentados 100 µL da solução de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) e fenasina metasulfato, mantendo-se à 37°C por mais 5 min. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 492 nm (Dinatech MR5000). Para obtenção do percentual de inibição foi calculado o percentual de liberação de LDH = $100 \times (\text{liberação LDH amostra} - \text{liberação espontânea}) / (\text{máximo da liberação} - \text{liberação espontânea})$. Como controle positivo, para o máximo de liberação de LDH (mínimo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos estimuladas, acrescidas de 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma Aldrich) e para a liberação espontânea de LDH (máximo de viabilidade) foram utilizadas cultura de macrófagos somente acrescida do estímulo celular pela micobactéria.

3.8 Obtenção do *ranking* de virulência entre os isolados clínicos estudados

Para obtenção do *ranking* de virulência entre a cepa padrão H37RV e os isolados clínicos avaliados, foram considerados dois parâmetros: 1) o crescimento intracelular das cepas Mtb em macrófagos RAW 264.7 e 2) a capacidade destas cepas induzirem morte celular nos macrófagos RAW 264.7 infectados.

Os valores referentes ao crescimento dos isolados clínicos de *M. tuberculosis* em macrófagos foram quantificados como a diferença entre o log₁₀ CFU dia 4 e o log₁₀ CFU dia 0, e foram comparados com o respectivo valor referente a cepa padrão H37Rv, e uma taxa relativa de crescimento de cada isolado em relação da taxa do crescimento da cepa H37Rv (estabelecida como 1.0) foi calculada em proporção e nomeada taxa A (taxa de crescimento intracelular do isolado).

A porcentagem de células azul tripan-positivas em cultura dos macrófagos RAW 264.7 infectados na proporção 50:1, 72 h após a infecção e a liberação de LDH na cultura dos macrófagos infectados na proporção 10:1, 72 h pós infecção, foram comparados com os respectivos valores referentes à cepa padrão H37Rv, e as taxas relativas de citotoxicidade dos isolados em relação à citotoxicidade da cepa H37Rv (estabelecidos como 1.0) foram calculadas em proporção. A média dessas duas taxas foi quantificada para cada isolado, e o valor obtido foi nomeado taxa B (taxa de citotoxicidade do isolado). Por fim, foi realizada a média entre os valores relativos obtidos para cada cepa Mtb nos quesitos capacidade de crescimento intracelular e indução de morte celular.

3.9 Relacionar os dados clínicos dos pacientes com os dados de virulência

Após analisar o conjunto de informações sobre virulência dos isolados clínicos de Mtb, obtido a partir dos resultados no modelo de infecção *in vitro*, essas informações foram relacionadas com os dados clínicos dos respectivos pacientes, verificando possíveis associações do nível de virulência com a patogenia da TB e desfechos favoráveis e desfavoráveis da doença. Para isso, analisamos cada parâmetro dos isolados clínicos (crescimento em meio de cultura líquido e em macrófagos RAW 264.7, citotoxicidade e indução da produção de mediadores pró e anti-inflamatórios) e correlacionamos com o quadro clínico e a gravidade da doença desenvolvida no hospedeiro.

3.10 Sequenciamento Genômico Completo - WGS

Em colaboração com Laboratório de Micobacteriologia Molecular as cepas de Mtb analisadas foram enviadas para sequenciamento genômico completo.

O protocolo utilizado para a realização do WGS encontra-se descrito previamente por Salvato e Colaboradores (2020).

O DNA genômico das amostras de *M.tb* foi extraído de cultura de escarro em meio sólido, Lowenstein-Jensen, usando o método de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB), conforme descrito por Van Embden *et al.* (1993).

Resumidamente, aproximadamente um micrograma de DNA genômico de *Mtb* por amostra foi fragmentado usando um sonicador Q800R2 (QSonica, Newtown, CT, EUA) com os seguintes parâmetros: 3 min de sonicação com pulso de 15 s ligado, pulso de 15s ligado, 15s pulso desligado, e 20% amplitude. O DNA fragmentado foi selecionado por tamanho para atingir 600-650 pb por separação de fragmentos, usando as esferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Código A63882). A preparação da biblioteca de DNA foi realizada usando o NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs, Código E7645L). Adaptadores e oligos de índice de 8 pb adquiridos da IDT® (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA), com base em Kozarewa e Turner (2011), foram usados no lugar daqueles fornecidos no kit de preparação NEB em uma abordagem de indexação dupla. (STONE *et al.*, 2016). O sequenciamento de extremidade pareada (2 × 150 bp) foi realizado em uma máquina Illumina NextSeq, usando um kit de saída média ou alta saída v2 de 300 ciclos (Illumina, Código FC-404-2003 ou Código FC-404- 2004), usando o procedimento padrão Illumina®.

3.11 Forma de análise dos resultados

Os dados de quantificação das citocinas, morte celular e CFU foram analisados pelo ANOVA e Student t test. As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 4 (GraphPad, EUA), através do teste deTukey.

3.12 Biossegurança

Todas as etapas do trabalho experimental foi realizado em área de biossegurança de nível 2 e os trabalhos com as micobactérias em área de nível

de biossegurança 3. Toda manipulação com material biológico e com os isolados clínicos foi efetuada com uso dos equipamentos de proteção individual, EPI (luvas, propés, máscara descartáveis, jaleco e touca apropriados), dentro de cabine de biossegurança. Todo material contaminado com Mtb foi coletado em sacos de autoclave dentro da cabine de biossegurança, ou imerso em solução de hipoclorito de sódio 4% para posterior descontaminação em autoclave a 121°C por 40 minutos.

3.13 Modelo de estudo

Segue abaixo o fluxograma da sequência experimental utilizada neste trabalho.

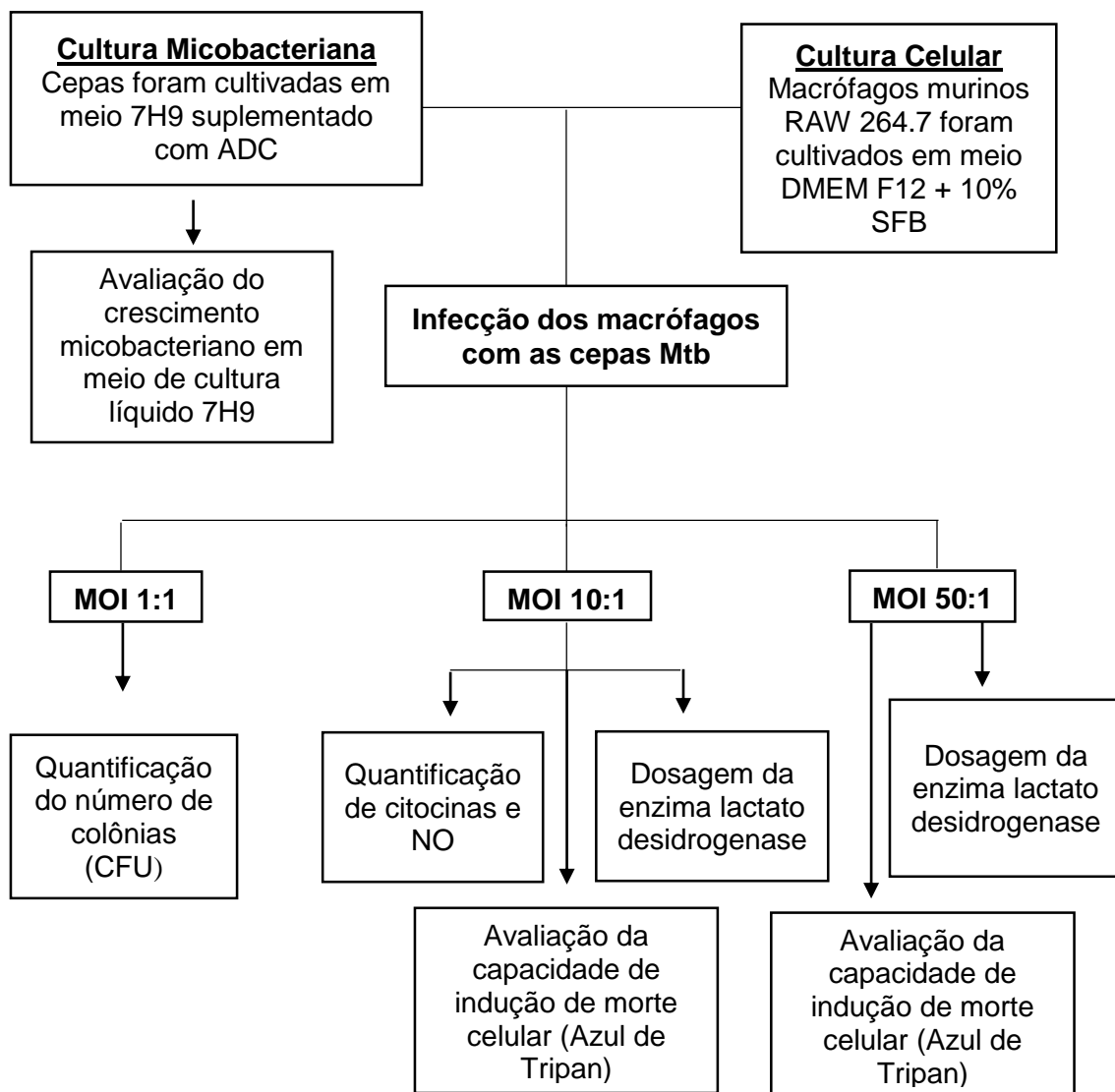


Figura 5 - Fluxograma da sequência experimental utilizada.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização dos isolados clínicos

Para comparar a virulência das cepas de Mtb obtidas de pacientes no Estado do Rio de Janeiro e Duque de Caxias, nós selecionamos cinco cepas provenientes de pacientes com diferentes desfechos de tuberculose pulmonar.

As características das cepas utilizadas neste trabalho estão presentes na **Tabela 1**.

Como definição do tipo de TB (grave, moderada ou não grave) observada em pacientes infectados pelas cepas analisadas, foram utilizados os seguintes parâmetros: 1) Raio-X do tórax, verificando a presença ou não de cavidades, de lesão bilateral e a quantidade de terços acometidos no pulmão; e 2) contagem de neutrófilos. As cepas de Mtb isoladas foram cedidas ao nosso laboratório, juntamente com as informações fornecidas abaixo.

Tabela 1. Perfil das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar utilizadas neste trabalho.

ORIGEM	ISOLADOS CLÍNICOS	ANO DO ISOLAMENTO	TIPO DE TB DESENVOLVIDA
RJ	2201/16	2016	TB Grave
RJ	1909/17	2017	TB Moderada
RJ	2203/16	2016	TB Moderada
RJ	1879/16	2016	TB não Grave
RJ	2351/17	2017	TB não Grave

4.2 Avaliação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9

Durante um período de 12 dias o crescimento da população bacteriana foi monitorado em meio líquido, através da medida da densidade óptica de cultura. As suspensões de todas as cepas de Mtb foram ajustadas à D.O. inicial de 0.050. E a curva de crescimento de cada uma das seis cepas estão apresentadas na **Figura 6A**. Posteriormente, (**Figura 6B**) o crescimento micobacteriano foi quantificado como a razão entre as médias da densidade óptica da cultura medida no dia 12 e no dia 0 (D.O. dia 12/ D.O. dia 0). A cepa padrão H37Rv foi utilizada como parâmetro de comparação com os demais isolados clínicos.

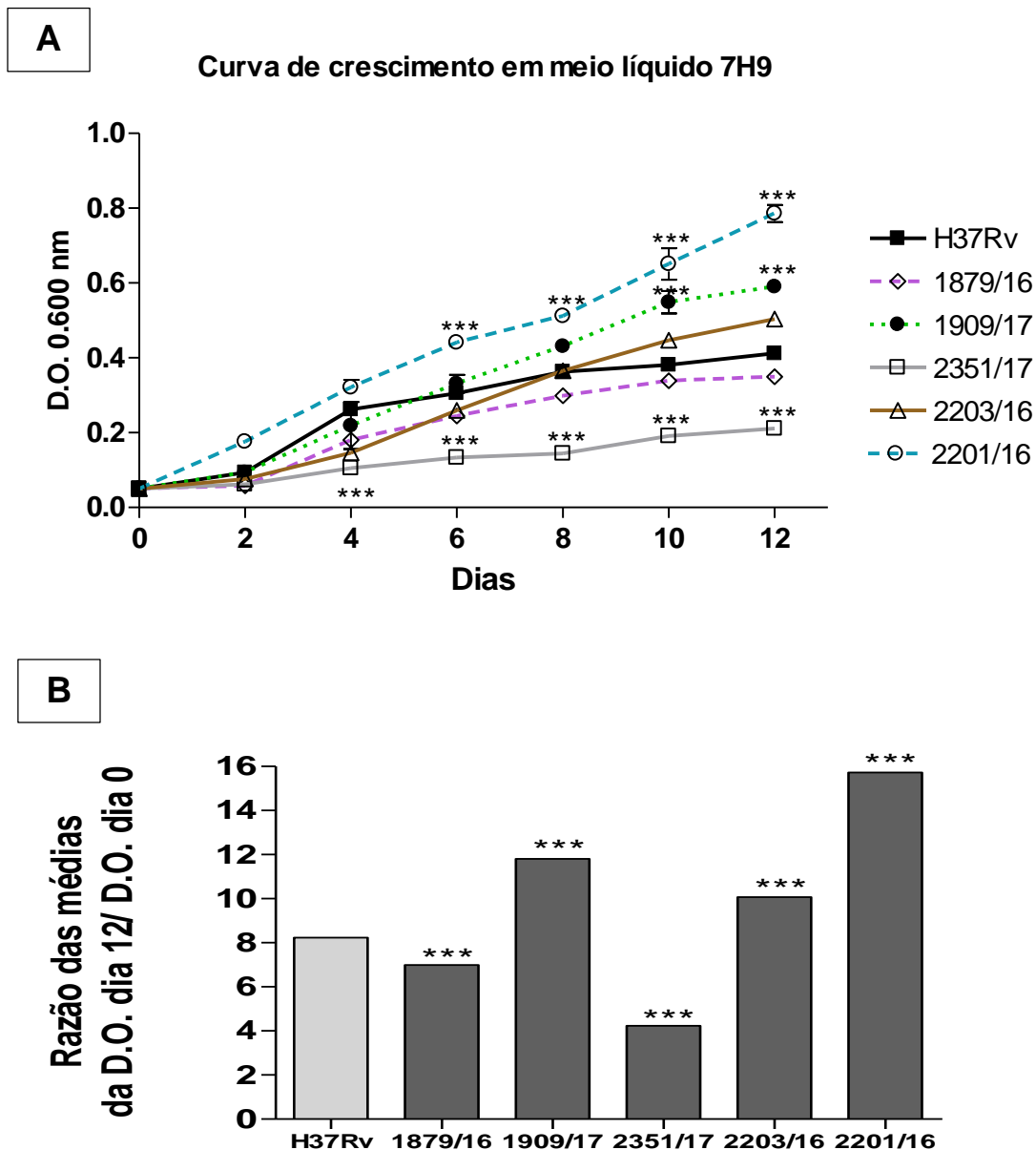


Figura 6 – Avaliação da curva de crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (A) e a razão das médias da curva de crescimento micobacteriano (B). As suspensões de 6 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* foram ajustadas inicialmente em meio 7H9 a D.O. 0.050 e incubadas a 37 °C. Nos dias 2, 4, 6, 8, 10 e 12 a densidade óptica da suspensão foi mensurada através de espectrofotometria, com comprimento de onda 600nm (A). Posteriormente foi realizado a razão entre as médias da D.O. do dia 12 e da D.O. do dia 0 (D.O. dia 12/ D.O. dia 0) (B). Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv, e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,001$ (***).

Três cepas (1909/17, 2203/16 e 2201/16) apresentaram um crescimento significativamente maior em comparação a cepa padrão H37Rv,

respectivamente, 1,5; 1,3 e 2 vezes mais (figura 6B). Duas cepas (1879/16 e 2351/17) cresceram menos que cepa padrão, sendo que a 1879/16 teve um crescimento similar com a mesma durante a curva (figura 6A). Já a cepa 2203/16 apresentou um crescimento inferior a H37Rv até o dia 8 da curva, e após esse período ela teve um crescimento superior a cepa padrão.

A cepa 2201/16 demonstrou um crescimento em meio líquido superior a H37Rv já no segundo dia da curva de crescimento. As cepas 1909/17 e 2203/16 demonstraram um crescimento superior a H37Rv no oitavo dia. E as cepas 1879/16 e 2351/17 demonstraram um crescimento em meio líquido inferior a H37Rv em todos os dias da curva.

De acordo com os gráficos, a D.O. da cultura da cepa padrão H37Rv aumentou 8 vezes. As demais cepas analisadas obtiveram um aumento da D.O., cerca de 7 vezes (1879/16), 12 vezes (1909/17), 4 vezes (2351/17), 10 vezes (2203/16) e 16 vezes (2201/16), (figura 6B).

Interessantemente, as cepas com o maior crescimento em cultura líquida foram obtidas dos pacientes que apresentaram o maior dano tecidual pulmonar (2201/16) e neutrofilia. Adicionalmente, o Δ de crescimento em cultura líquida apresentou fenótipo diretamente relacionado ao dano tecidual pulmonar observado nos pacientes com TB sensível em Duque de Caxias (Figura 6).

Nossos dados preliminares sugerem que as cepas isoladas de pacientes com TB sensível, relacionadas ao dano tecidual pulmonar grave, apresentam ótimo crescimento em meios de cultura líquido, quando comparadas com a cepa padrão H37RV.

4.3 Quantificação e avaliação do crescimento intracelular de Mtb em macrófagos infectados

Para avaliar a capacidade de crescimento intracelular das cepas estudadas, macrófagos RAW 264.7 foram infectados. Os resultados da avaliação do crescimento intracelular demonstraram que as cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 apresentaram maior capacidade de replicação intracelular

quando comparadas à cepa padrão H37Rv (figura 7). Contudo, a cepa 2201/16 se destacou, demonstrando um crescimento intracelular 2,1 vezes maior que a cepa padrão, sendo a sua população intracelular aumentada em cerca de \log_{10} 1,80, durante os 4 dias de incubação (figura 7). As cepas 1909/17 e 2203/16 apresentaram um crescimento intracelular, respectivamente, 1,40 e 1,37 vezes maior que a H37Rv. O crescimento intracelular da cepa 2351/17 foi similar à cepa de referência, entre os dias 0 e 4. Já a cepa 1879/16 teve um crescimento intracelular inferior a H37Rv, cerca de 4 vezes menor (figura 7).

Ao comparar os isolados clínicos entre si, a cepa 2201/16 também demonstrou ter o maior crescimento intracelular em relação as demais, seguida, em ordem decrescente, pela cepa 1909/17, 2203/16, 2351/17 e 1879/16 (figura7). Esses dados demonstram a capacidades da cepa 2201/16 em multiplicar-se rapidamente em meios de cultura líquida e macrófagos, mostrando uma capacidade adaptativa interessante. Ademais, essa cepa foi isolada de paciente que apresentou alto dano tecidual pulmonar, visualizado por Raio X, cavitações ≥ 5 cm, doença bilateral e acometimento de 4 terços do pulmão na inclusão do estudo. As análises de sensibilidade à fármacos, mostraram que essa cepa, assim como as demais não apresentavam perfil de resistência às drogas anti-tuberculínicas.

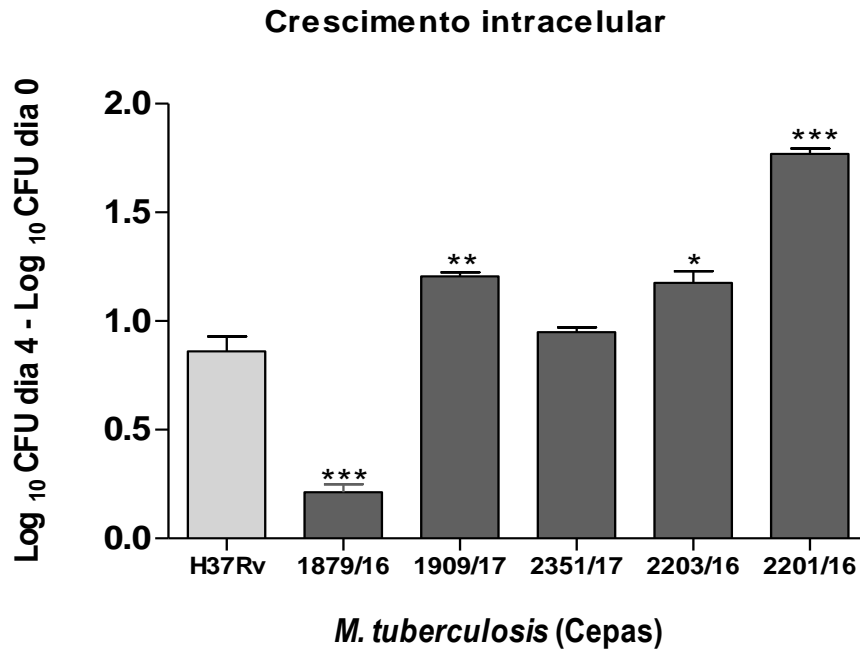


Figura 7 – Avaliação do crescimento intracelular de cepas de *M. tuberculosis* em macrófagos RAW 264.7. As células foram infectadas na proporção 1:1 e cultivadas durante 4 dias. O crescimento intracelular das micobactérias foi avaliado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 4 de infecção e o crescimento foi determinado através da diferença das médias dos Log₁₀ de CFU obtidos nesses dias (log₁₀ CFU dia 4 – log₁₀ CFU dia 0). Os valores estão reportados como média ± desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv, e as diferenças significativas estão indicadas, p < 0,05 (*), p < 0,01 (**), e p < 0,001 (***).

4.4 Avaliação da capacidade de indução de morte celular nos macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb

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

As cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 foram as mais citotóxicas em relação a cepa padrão H37Rv e as demais cepas, sendo capazes de induzirem a morte celular em 50-60% dos macrófagos infectados, em poucas horas de infecção (48 h). A cepa 2201/16 teve a contagem de células azul de tripan-positivas em 60% da cultura celular, já em 48 h. Já as cepas 1879/16 e 2351/17

foram as menos citotóxicas em relação a H37Rv e as demais cepas, induzindo a morte celular em menos de 40% dos macrófagos infectados, em 48 h (figura 8).

Em 72 horas de infecção, as cepas 1909/17, 2203/16 atingiram 60% de morte celular e a cepa 2201/16 foi capaz de induzir a morte de 80% dos macrófagos infectados. Enquanto as cepas 1879/16 e 2351/17 não foram capazes de chegar a 40% de morte celular. Em 96 horas de infecção, todas as cepas foram capazes de promover mais de 50% de morte celular nos macrófagos RAW infectados. No entanto, as cepas 1879/16 e 2351/17 induziram a morte em apenas 60% das células, enquanto as cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 foram capazes de atingir 90-100% de morte celular nos macrófagos infectados (figura 8).

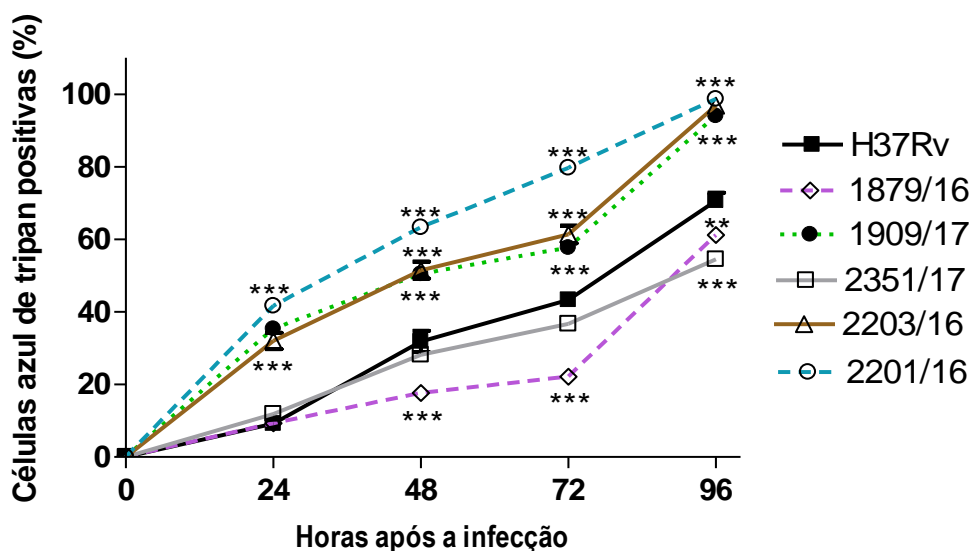


Figura 8 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 50:1 utilizando o método de coloração por azul de tripan. As células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 24-96 h. O método de coloração por azul de tripan foi utilizado para contagem do número de células mortas. As células mortas (coradas em azul) e vivas (não coradas) foram contadas por meio de microscopia óptica e os resultados expressos em porcentagem das células mortas (azul de tripan-positivas). Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

Devido ao fato do MOI 50:1 ser alto e algumas cepas de Mtb terem induzido uma elevada taxa de morte celular já em 48 h da infecção, foi reduzido

a dose de infecção para 10:1 (10 bactérias / 1 macrófago) e o ensaio foi repetido (Figura 9).

Como esperado, a redução da dose de infecção foi associada a diminuição da morte celular e aumento da sobrevivência dos macrófagos, onde 50% das células infectadas permaneceram viáveis até 48 h de infecção. No entanto, foi confirmando uma maior citotoxicidade das cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16, que induziram uma maior taxa de morte celular, cerca de 40% (1909/17) e 60% (2203/16 e 2201/16), em 72 h de infecção. Estas cepas também foram responsáveis por induzirem de 80 a 100% de morte celular nos macrófagos infectados, em 96 horas de observação (Figura 9).

A cepa padrão H37Rv ficou entre as menos citotóxicas, sendo capaz de induzir a morte em 45% dos macrófagos, após 96h da infecção. Foi demonstrado também, uma menor citotoxicidade das cepas 1879/16 e 2351/17, que não foram capazes de induzir mais de 50% de morte celular, em 96 horas de infecção (Figura 9).

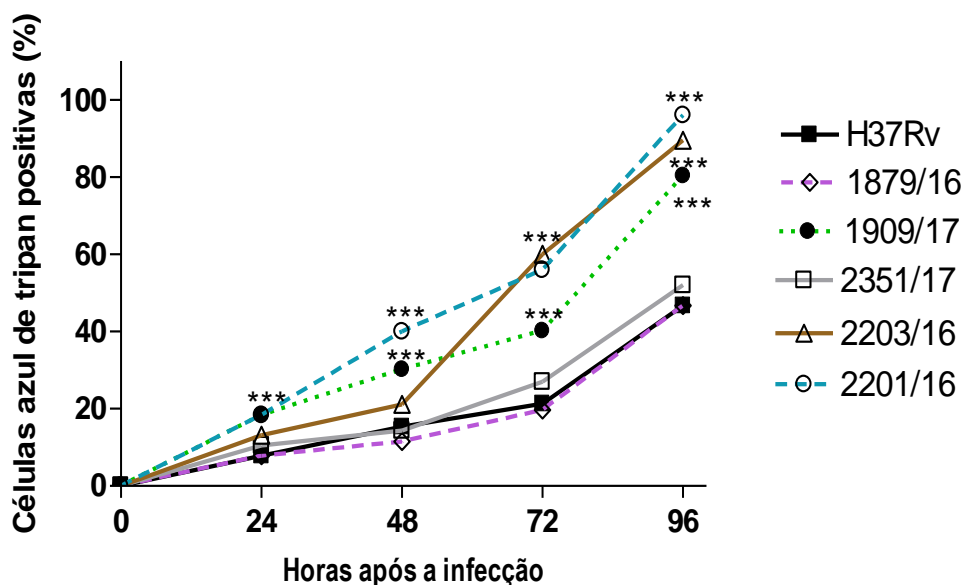


Figura 9 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1 utilizando o método de coloração por azul de tripan. As células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 24-96 h. O método de coloração por azul de tripan foi utilizado para contagem do número de células mortas. As células mortas (coradas em azul) e vivas (não coradas) foram contadas por meio de microscopia óptica e os resultados expressos em porcentagem das células mortas (azul de tripan-positivas). Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram

comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,001$ (***)).

As culturas dos macrófagos RAW264.7 infectados pelas cepas de Mtb estudadas também foram submetidas à dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) presente no sobrenadante da cultura, em 24 e 72 h de infecção, na proporção 50:1 (**Figura 10**) e na proporção 10:1 (**Figura 11**). Os sobrenadantes das culturas dos macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo.

As cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 foram as mais citotóxicas em comparação a cepa padrão H37Rv e as demais cepas, sendo capazes de induzir a morte celular por necrose nos macrófagos, levando ao aumento considerável da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante de cultura, já em 24 h pós infecção. Estas cepas induziram a morte celular necrótica em 31% (1909/17), 27% (2203/16) e 38% (2201/16) (figura 10). Nesse mesmo período, as cepas 1879/16 e 2351/17 demonstraram uma citotoxicidade similar à cepa padrão H37Rv e baixa em relação as demais, promovendo a necrose das células infectadas em, respectivamente, 12% e 9,5% (figura 10).

Após 72 h da infecção, os níveis de lactato desidrogenase no sobrenadante aumentaram nas culturas infectadas pelas cepas 1909/17 (83%), 2203/16 (61%) e 2201/16 (87%). Demonstrando uma indução de necrose celular superior as demais, induzindo a morte celular em mais de 50% das células infectadas. Já as cepas 1879/16 e 2351/17 não obtiveram um aumento expressivo nos níveis da enzima lactato desidrogenase (30%), demonstrando uma citotoxicidade similar a cepa de referência H37Rv (figura 10). Nossos dados demonstraram um papel de alta citotoxicidade induzida pelas cepas obtidas de pacientes de TB pulmonar com o maior dano tecidual pulmonar.

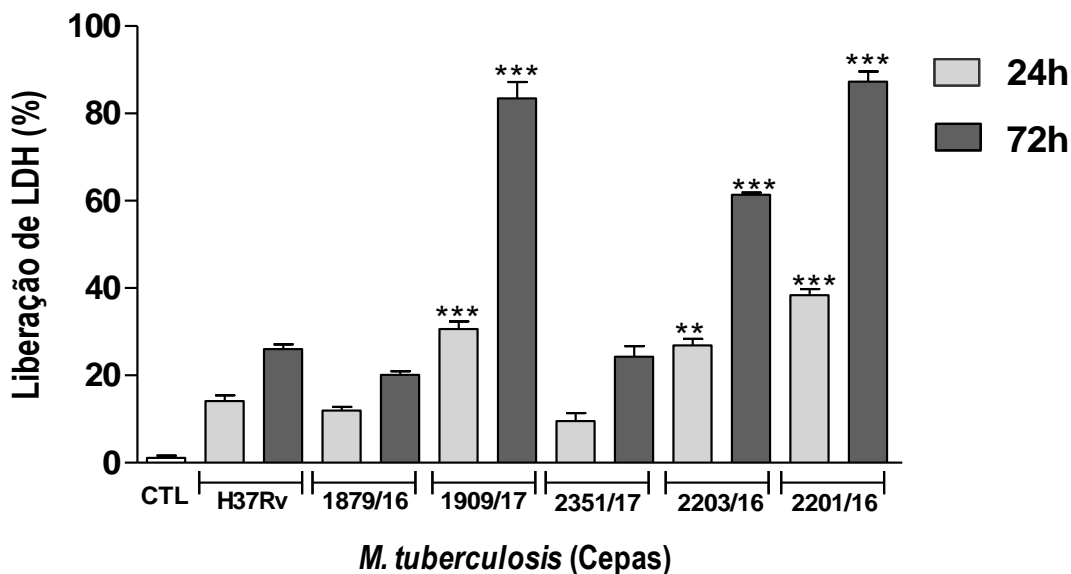


Figura 10 – Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 50:1 pelo teste de LDH. Células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 24 e 72 horas e o número de células mortas foi quantificado pela dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 492 nm. Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

Como esperado, a redução da dose de infecção (MOI 10:1) foi associada a diminuição dos níveis da enzima lactato desidrogenase no sobrenadante dos macrófagos infectados. Porém, pode-se confirmar uma maior citotoxicidade das cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16, que induziram maiores quantidade de LDH em comparação a cepa padrão H37Rv e as demais cepas, tanto em 24 h quanto em 72 horas após a infecção. Destacando a cepa 2201/16, que em 72 horas, obteve a maior porcentagem de indução de LDH (60%), sendo capaz de promover a morte por necrose em mais da metade da cultura celular infectada, enquanto as outras duas (1909/17, 2203/16) induziram até 40% de morte por necrose (figura 11).

As cepas 1879/16 e 2351/17 foram as menos citotóxicas, induzindo baixos níveis de LDH em comparação a cepa padrão H37Rv, em ambas horas de infecção. Estas cepas não induziram LDH significativo em relação ao controle negativo, em 24 h após a infecção. E também não foram capazes de promover nem 20% de morte necrótica nos macrófagos infectados durante todo o período de observação (figura 11).

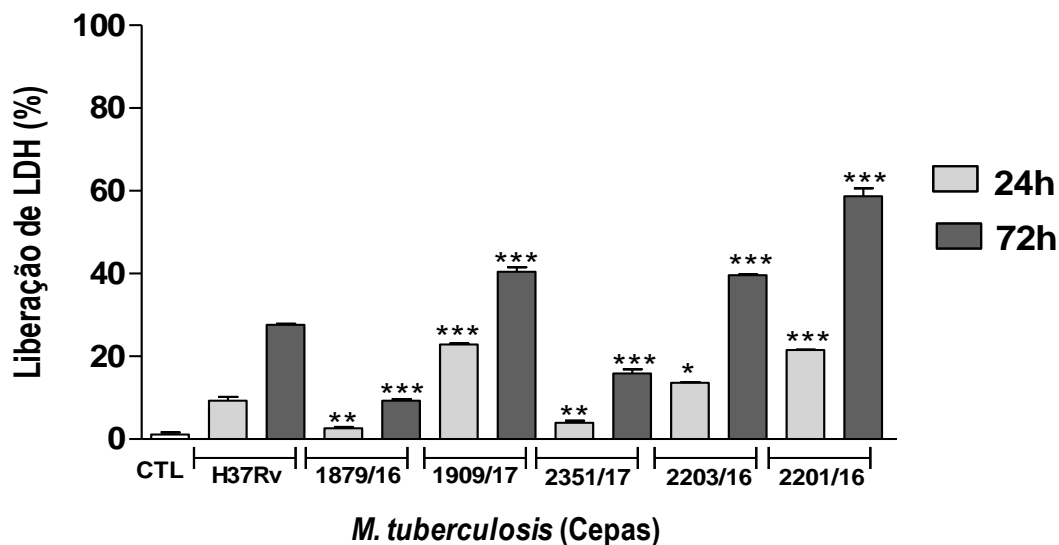


Figura 11. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1 pelo teste de LDH. Células RAW 264.7 foram infectadas e incubadas por 24 e 72 horas e o número de células mortas foi quantificado pela dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de placa a 492 nm. Os valores foram reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (**).

Esses resultados confirmam os anteriores, de que as cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 podem ser mais virulentas (através da avaliação do crescimento intracelular e em meio líquido 7H9 (figuras 6 e 7), e dos métodos de coloração por azul de tripan (figuras 8 e 9) e liberação de LDH (figuras 10 e 11)). Com ênfase para a cepa 2201/16, que em todos os testes, tanto com MOI 10:1 e MOI 50:1 apresentou maiores índices de virulência e citotoxicidade. Enquanto as cepas 1879/16 e 2351/17, demonstraram menor virulência, através dos métodos de avaliação citados acima.

4.5 Quantificação de mediadores inflamatórios na cultura de macrófagos infectados por diferentes cepas de Mtb

Para avaliar o padrão da resposta dos macrófagos às micobactérias, foi quantificada a produção das citocinas, IL-1 β , TNF- α (citocinas pró-inflamatórias) e IL-10 (citocina anti-inflamatória), e do mediador inflamatório NO, que são

importantes no processo inflamatório e na indução da resposta imune protetora (Figuras 12, 13 e 14).

4.5.1 Produção da Interleucina 1 β (IL-1 β)

Ao analisarmos a produção de IL-1 β , podemos perceber que todas as cepas foram capazes de induzir a secreção dessa citocina pelos macrófagos J774A.1. Porém, as cepas 1879/16 e 2351/17 não induziram a produção de IL-1 β em 24 h após a infecção, ao comparar com o controle negativo. Já em 72 horas, estas cepas induziram a produção dessa citocina, mas em concentrações significativamente inferiores aos macrófagos infectados pela cepa padrão H37Rv (figura 12).

Os maiores produtores de IL-1 β foram os macrófagos infectados pelas cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16, que produziram significativamente mais em comparação aos macrófagos infectados pela cepa padrão. A cepa 2201/16 induziu a maior produção de IL-1 β , já em 24 h após a infecção, cerca de 566,4 pg/mL (2,7 vezes mais que a H37Rv; 1,8 vezes mais que a 1909/17 e 2 vezes mais que a 2203/16). Em 72 horas após a infecção, as cepas 1909/17 e 2203/16 aumentaram a indução de IL-1 β , chegando a 500 pg/mL (figura 12).

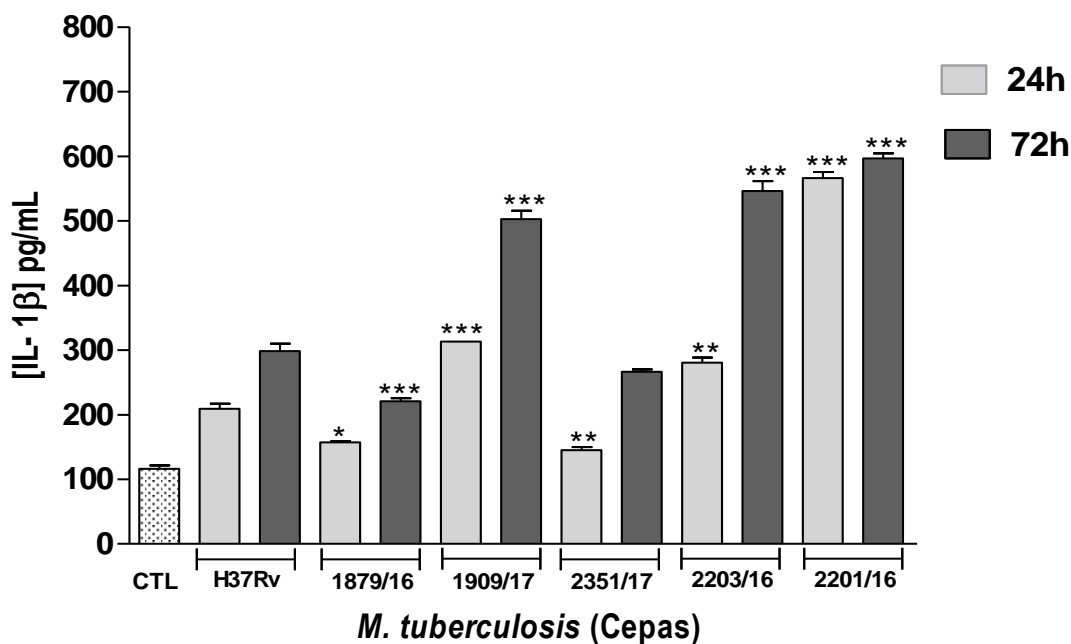


Figura 12 – Análise da produção da citocina IL-1 β pelos macrófagos J774A.1 infectados por cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação da citocina através de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos. Os macrófagos J774A.1 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). Os valores foram calculados e depois reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***).

4.5.2 Produção do Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α).

Todas as cepas *M. tuberculosis* foram capazes de induzir a citocina TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7. Entretanto, a cepa padrão H37Rv induziu baixo nível desta citocina (152,2 pg/mL), 24 h pós infecção, tendo um aumento em 72 horas (166,5 pg/mL). As cepas 1879/16 e 2351/17 também induziram baixos níveis dessa citocina, em 24 e 72 horas após infecção, induzindo em média uma quantidade similar a H37Rv (figura 13).

Maiores níveis de produção de TNF- α foram observados nos macrófagos infectados pelas cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16, que foram, respectivamente, 2; 1,9 e 2,7 vezes maior em comparação a quantidade dessa citocina produzida na cultura infectada pela cepa H37Rv, após 72 h. A cepa 2201/16 induziu os maiores níveis de TNF- α em apenas 24 horas (446,4 pg/mL) após a infecção, cerca de 4,4 vezes mais que a H37Rv (figura 13).

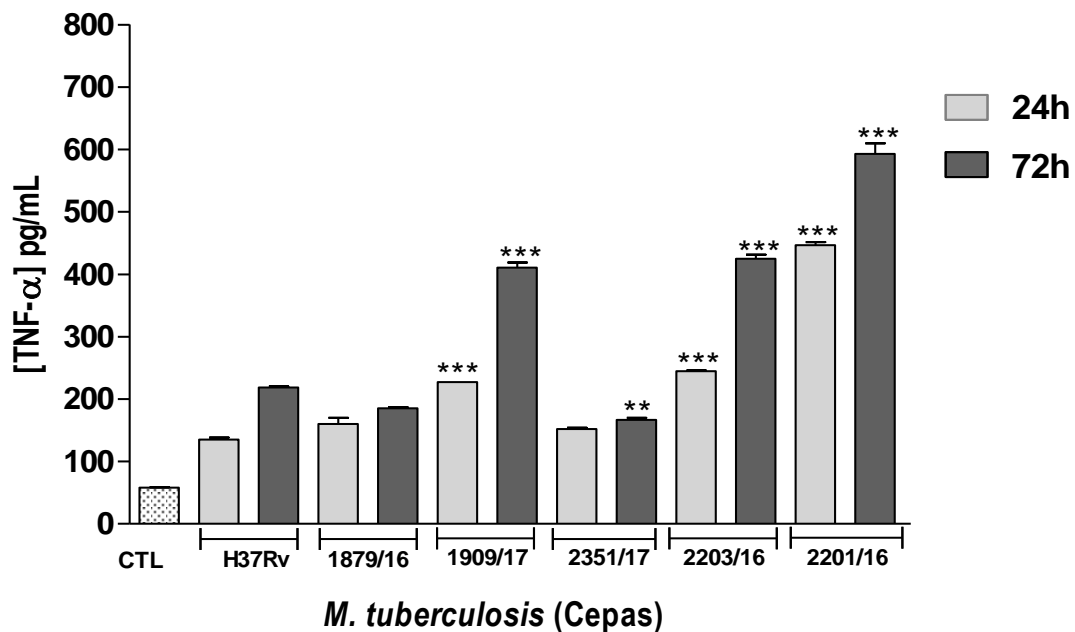


Figura 13 – Análise da produção da citocina TNF- α pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação da citocina, através de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos. Os macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). Os valores foram calculados e depois reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4.5.3 Produção da Interleucina 10 (IL-10)

A produção da citocina IL-10 nos macrófagos RAW 264.7 infectados pelas cepas Mtb foi relativamente baixa. As cepas 1879/16, 2351/17, 2201/16 e H37Rv não induziram essa citocina, ao comparar com o controle negativo (figura 14). Já as cepas 1909/17 e 2203/16 foram capazes de induzir a sua produção, sendo que, após 24 horas de infecção, os macrófagos infectados por essas cepas produziram uma quantidade similar a cepa padrão H37Rv. Já em 72 horas, as cepas 1909/17 e 2203/16 induziram níveis mais altos e expressivos da IL-10, cerca de 3-4 vezes mais que a cepa padrão (figura 14).

Pode-se observar, que as cepas 1879/16 e H37Rv induziram uma produção relativamente baixa e temporária, sendo observada diminuição em 72 h, em relação ao valor obtido em 24 h (figura 14).

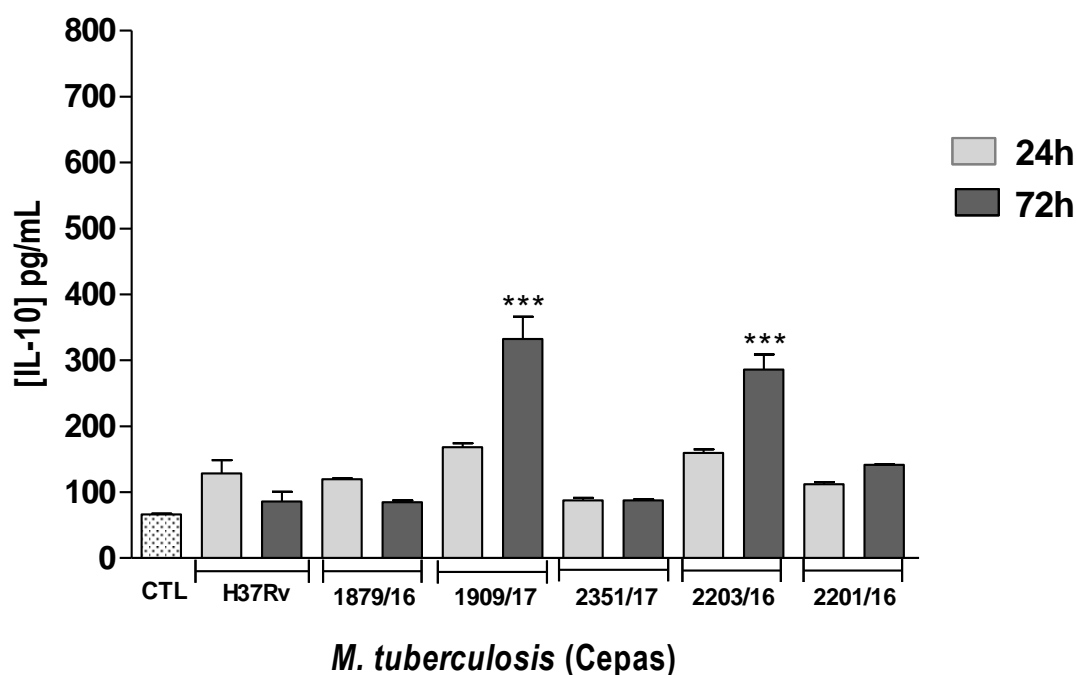


Figura 14 – Análise da produção da citocina IL-10 pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação da citocina através de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos. Os macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). Os valores foram calculados e depois reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,001$ (***)

4.5.4 Produção de NO

Além das citocinas pró e anti-inflamatórias, o óxido nítrico (NO), outro mediador inflamatório, foi avaliado em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados. Os resultados demonstram que todas as cepas testadas foram

capazes de induzir a produção de NO, dentre elas, as cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 foram as que apresentaram maior nível de indução em comparação a cepa padrão H37Rv (figura 15). A cepa 2201/16 foi a que induziu maior produção de NO, cerca de 52,5 (24h) e 76,7 (72h) μM de nitrito (1,7 vezes maior que a cepa de referência). As cepas 1879/16 e 2351/17 induziram menores quantidades de NO em relação a cepa padrão, com ressalva para a cepa 2351/17, que em 24 h de infecção, induziu uma quantidade relativamente maior (figura 15).

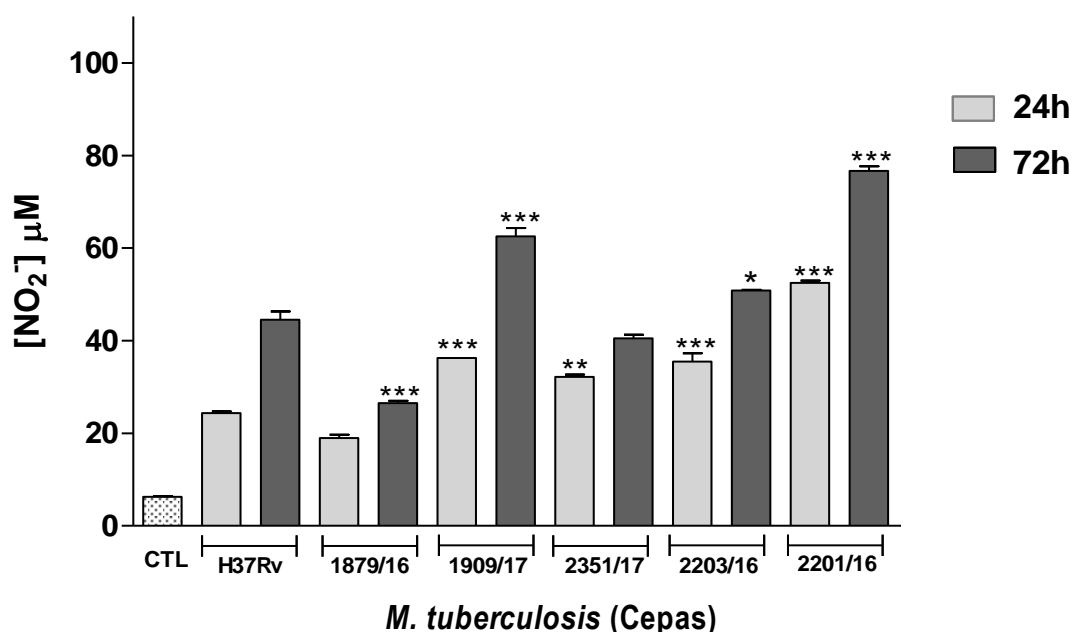


Figura 15 – Análise da produção de NO pelos macrófagos RAW 264.7 infectados por diferentes cepas de *M. tuberculosis* na proporção 10:1. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados em 24 e 72 h de infecção e utilizados para quantificação de NO através da reação de Griess. Os macrófagos RAW 264.7 não infectados foram utilizados como controle negativo (CTL). A concentração de nitrito no sobrenadante foi determinada em μM , utilizando como referência uma curva de nitrito de sódio, decrescida do valor obtido com os aditivos sem células. Os valores foram calculados e depois reportados como média \pm desvio padrão. Os valores referentes a cada uma das cepas foram comparados com os respectivos valores da cepa padrão H37Rv e as diferenças significativas estão indicadas, $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***)

4.6 Quantificação do *ranking* de virulência entre os isolados clínicos de Mtb estudados

Para obtenção do *ranking* de virulência entre a cepa padrão H37RV e os isolados clínicos avaliados, foram considerados dois parâmetros: 1) o crescimento intracelular das cepas Mtb em macrófagos RAW 264.7 e 2) a capacidade destas cepas induzirem morte nos macrófagos infectados. A taxa de virulência relativa foi quantificada como a média das taxas A e B (taxa A + taxa B / 2) e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da taxa de virulência das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar, em relação a cepa padrão H37Rv, através de testes de infecção *in vitro*, utilizando macrófagos RAW264.7.

Cepa	Taxa A	Taxa B	Taxa de virulência dos isolados micobacterianos (Taxa A + Taxa B/2)
	Capacidade de crescimento intracelular micobacteriano em macrófagos	Capacidade micobacteriana de induzir morte necrótica	
Cepa de referência H37Rv	1,0	1,0	1,0
1879/16	0,2	0,40	0,3
1909/17	1,4	1,40	1,4
2351/17	1,1	0,70	0,9
2203/16	1,4	1,40	1,4
2201/16	2,1	2,00	2,05

Os resultados demonstram que o grau de virulência da cepa padrão H37Rv pode ser considerado intermediário, dentre as cepas analisadas. Um isolado clínico (cepa 2201/16) apresentou grau de virulência elevado, com uma taxa de virulência 2,05 vezes maior que a virulência da cepa padrão; dois isolados clínicos (as cepas 1909/17 e 2203/16) apresentaram grau de virulência intermediário, com uma taxa de virulência média 1,4 vezes maior que a virulência da cepa padrão; e dois isolados clínicos (as cepas 1879/16 e 2351/17) apresentaram grau de virulência baixo, com uma taxa de virulência média cerca de 1,6 vezes menor que a virulência da cepa padrão. A cepa 1879/16 apresentou a menor taxa de virulência (0,3) dentre as demais.

4.7 Sequenciamento e caracterização das cepas do estudo

As cepas de Mtb foram enviadas para sequenciamento de genoma completo - WGS com o intuito de caracterizar a família e genótipo de resistência das cepas. Todas as cepas que apresentaram o perfil de virulência mais importante pertencem a família LAM das Mtb (1909/17, 2203/16 e 2201/16). As cepas com perfil de virulência mais leve pertencem a família LAM (1879/16) e tipo S (2351/17). Os dados obtidos por WGS permitem avaliar a sublinhagem associada a cada linhagem. Assim, em nossas análises observamos que a linhagem LAM – sublinhagem 4.3.4.2 foi identificada nas amostras 2201/16 e 2203/16; a linhagem LAM – sublinhagem 4.3.3 foi identificada nas amostras 1909/17, por último a linhagem LAM – sublinhagem 4.3.2 foi identificada na amostra 1879/16. Os dados estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Sequenciamento e caracterização das cepas do estudo

CEPAS	LINHAGEM	SUBLINHAGEM
2201/16	LAM	4.3.4.2
1909/17	LAM	4.3.3
2203/16	LAM	4.3.4.2
1879/16	LAM	4.3.2
2351/17	TIPO S	4.4.1.1

5 DISCUSSÃO

A infecção por Mtb resulta em um espectro de manifestações clínicas e patológicas culminando em distintos desfechos clínicos. Esta heterogeneidade no desenvolvimento da doença está relacionada principalmente ao grau de virulência da cepa infectante e com fatores de suscetibilidade do indivíduo

infectado (HUNTER, 2020). Ressaltando assim, a importância do estudo de cepas de Mtb circulantes em determinada região e sua virulência, possibilitando uma melhor compreensão das particularidades de patogenicidade e das propriedades de modulação da resposta imunitária dessas cepas, que podem contribuir ou não para a sobrevivência do hospedeiro.

A proposta deste trabalho foi a caracterização de cepas de Mtb isoladas de pacientes com diferentes desfechos clínicos de TB pulmonar no Estado do Rio de Janeiro, em relação à virulência e o caráter da resposta imune induzida nos macrófagos infectados, utilizando o modelo de infecção *in vitro*. Cinco cepas foram utilizadas na análise, as cepas 1879/16 e 2351/17 (isolados clínicos provenientes de pacientes com TB pulmonar não grave); as cepas 1909/17 e 2203/16 (isolados clínicos provenientes de pacientes com TB pulmonar moderada); e por fim a cepa 2201/16 (isolado clínico proveniente de paciente com TB pulmonar grave). Como referência para comparação, foi utilizada a cepa laboratorial H37Rv, por ser uma cepa amplamente utilizada e que manteve a sua virulência. A H37Rv é derivada de um isolado clínico, H37, obtido de um paciente com TB pulmonar em 1905 (IOERGER *et al.*, 2010).

Existem vários tipos de modelos (*in vivo*, *in vitro* e *in silico*) experimentais que podem ser utilizados na avaliação da virulência e caráter da resposta imune destas cepas. Neste estudo optou-se pelo ensaio de infecção *in vitro*, utilizando macrófagos, como alternativa para o uso de modelos animais, quando o objetivo é a comparação de um grande número de cepas, devido sua praticidade, além de permitir a análise do contato inicial do patógeno com a célula hospedeira, que é o foco principal deste trabalho (MAULÉN, 2011).

A linhagem celular RAW 264.7 (células imortalizadas) foi a adotada para a avaliação da produção de mediadores inflamatórios, citotoxicidade e taxa de crescimento intracelular e em meio líquido 7H9, devido sua semelhança com as células primárias e por apresentar uma elevada aderência e uma relativa facilidade no cultivo celular e manutenção para os estudos *in vitro*. Já a linhagem celular J774A.1 foi utilizada para quantificação da citocina pró-inflamatória IL-1 β , já que os macrófagos RAW264.7 não secretam essa citocina. Segundo Andreu *et al.* (2017), compreender os mecanismos de interações entre os macrófagos e Mtb é a chave na identificação das vias centrais tanto para a virulência

micobacteriana quanto para a imunidade do hospedeiro (SHI *et al.*, 2017; FERREIRA, 2018).

Primeiramente, foi comparada a capacidade de adaptação (fitness) do crescimento de cada cepa bacteriana em meio Middlebrook 7H9 completo, durante um período de doze dias (Figura 6). Nossos resultados demonstraram que três cepas (1909/17, 2203/16 e 2201/16) apresentaram um padrão de crescimento significativamente superior a cepa laboratorial de referência H37Rv, e duas cepas (1879/16 e 2351/17) obtiveram um crescimento inferior. A fitness de bactéria de forma isolada não permite avaliar a virulência micobacteriana de uma forma geral, mas pode ser utilizada de forma complementar na caracterização da capacidade de adaptação de cada cepa.

Lasunskaja *et al.* (2010) demonstraram que as cepas hipervirulentas da família do genótipo *Beijing*, dominante no noroeste da Rússia, apresentaram uma aptidão reprodutiva (fitness) e uma capacidade de sobrevivência em macrófagos significativamente maiores do que as cepas de menor virulência (*Beijing* resistentes e suscetíveis isoladas no Brasil). Portanto, uma maior taxa de crescimento em meio líquido, pode refletir uma maior capacidade de adaptação dessas cepas. Sugerindo, uma possível associação com a virulência da cepa, mas como dito anteriormente, esses dados precisam estar em conjunto com outros dados para tal determinação.

Um dos parâmetros utilizados na determinação de virulência foi a avaliação do crescimento intracelular das diferentes cepas de Mtb analisadas. Para isso, os macrófagos RAW 264.7 foram infectados com baixa dose de infecção, uma bactéria por macrófago (MOI 1:1), que diferente das altas doses de infecção, permite uma melhor avaliação da capacidade da bactéria de se reproduzir em um ambiente hostil de uma célula fagocítica, sem alterar a viabilidade no macrófago (ZHANG *et al.*, 1998).

As cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 mostraram maior capacidade de replicação intracelular quando comparadas à cepa padrão H37Rv, sendo que a cepa 2201/16 apresentou um crescimento significativamente maior. Já a cepa 2351/17 teve um crescimento intracelular praticamente igual à cepa de referência, enquanto a cepa 1879/16 teve um crescimento bastante inferior a H37Rv (Figura 7).

Como dito anteriormente, uma capacidade elevada de crescimento da micobactéria em macrófagos pode influir um sinal de elevada virulência. Ribeiro *et al.* (2014) demonstraram em seus resultados que as cepas mais virulentas foram capazes de induzir uma multiplicação intracelular em macrófagos mais elevada e mais rápida do que outras cepas estudadas de menor virulência. Além disso, em dose mais alta de infecção (MOI de 10), estas cepas induziram níveis mais elevados de morte por necrose em macrófagos.

Ademais, estudos vem demonstrando que fatores de virulência micobacterianos, como as proteínas da família Esx, proteínas da família Pro-Glu (PE), e lipídios da parede celular micobacteriana, auxiliam na maior sobrevivência dos bacilos em células hospedeiras ao promover a evasão da resposta imune protetora (KEANE *et al.*, 2000; ARBUÉS *et al.*, 2014; LY e LIU, 2020). No entanto, foi demonstrado também que nem todas as cepas com alta capacidade de crescimento são capazes de induzir a patologia no hospedeiro, apesar de sua alta transmissibilidade (VALWAY *et al.*, 1998).

Ao comparar a capacidade de crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido com a capacidade de crescimento intracelular em macrófagos, pode-se perceber que 3 cepas que apresentaram maior fitness (1909/17, 2203/16 e 2201/16) também obtiveram maior crescimento intracelular. Assim como as cepas 1879/16 e 2351/17, que apresentaram menor fitness, também cresceram menos nos macrófagos.

Outro parâmetro que pode favorecer a virulência micobacteriana é a sua capacidade de induzir a morte por necrose nos macrófagos infectados (ZHANG *et al.*, 1998). O tipo de morte celular mediada pelo patógeno tem um papel crucial na formação do resultado da infecção. Onde o Mtb virulento regula negativamente a autofagia e promove a ruptura da célula hospedeira por piroptose, necroptose e necrose, evadindo assim das respostas antimicrobianas dos fagócitos no hospedeiro (KOLLOLI *et al.*, 2021).

Estudos demonstram que cepas com um perfil hipervirulento estimulam a secreção de grandes quantidades de IFNs do tipo I e induzem a morte celular necrótica, em contrapartida as cepas avirulentas ou de baixa virulência, que induzem a morte celular por apoptose. Além disso, foi demonstrado que o rápido crescimento intracelular de micobactérias com alta virulência resulta em danos

maciços aos macrófagos (AMARAL *et al.*, 2016). Amaral *et al.* (2014) apontaram em seus resultados que a capacidade de isolados clínicos hipervirulentos de induzirem a morte celular por necrose em culturas de macrófagos foi consideravelmente maior, quando comparado com cepas laboratoriais.

Para avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com as cepas de Mtb, foi utilizado o método de coloração de azul tripan. Por ser um corante que penetra nas células que sofrem permeabilização da membrana celular, o azul de tripan, consegue corar somente as células que estão mortas. Já as células vivas, que possuem a membrana intacta, não são coradas por este corante (STROBER, 2015). Já o teste de liberação da enzima lactato desidrogenase (LDH) foi utilizado para quantificação da morte celular por necrose nos macrófagos infectados. A LDH é uma enzima importante que atua na rota metabólica celular, transformando o ácido láctico em ácido pirúvico, promovendo à produção de ATP. Por ser uma enzima intracelular, a sua presença no sobrenadante aponta a ocorrência da lise na membrana plasmática da célula, e conseqüentemente, a sua morte por necrose. Portanto, cepas mais virulentas apresentam uma maior quantidade dessa enzima em seu sobrenadante, devido maior indução de necrose nos macrófagos infectados (BALLS e CLOTHIER, 1992).

Em ambos os testes e nas duas concentrações de infecção (MOI 10:1 e 50:1 bactéria/macrófago), as cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16 foram mais citotóxicas e induziram maiores níveis de morte celular por necrose, através do teste de liberação da LDH, com ênfase para a cepa 2201/16. E as cepas 1879/16 e 2351/17 foram menos citotóxicas.

Ribeiro *et al.* (2014) também demonstraram que a liberação de LDH em culturas infectadas por cepas altamente virulentas (modernas de Beijing, cepas padrão III 1471, 2172 e M299) foi significativamente maior do que em culturas infectadas pela cepa H37Rv, sugerindo que a indução da morte por necrose nos macrófagos poderia contribuir para a patogenicidade dessas cepas bacterianas.

Importante ressaltar, que a cepa 2201/16, seguida das cepas 1909/17 e 2203/16, também apresentaram maiores taxas de crescimento intracelular em macrófagos, o que fortemente sugere a virulência elevada dessas micobactérias.

Outro fator que influencia no aumento da virulência micobacteriana é a capacidade da bactéria em alterar a resposta imune inata e/ou adaptativa. A indução de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF e IL-1 β) e citocinas anti-inflamatórias (IL-10) por células do sistema imune do hospedeiro, demonstrou ser crítica para o controle ideal de Mtb. No entanto, desregulações na produção dessas citocinas podem causar danos, e estão associadas a desfechos negativos em doenças com infecções bacterianas, virais e doenças autoimunes ou inflamatórias (ZHAN *et al.*, 2018; WONG *et al.*, 2020). Através do modelo de infecção em células RAW 264.7 e J774A.1 foi possível verificar a produção dessas citocinas pelos macrófagos infectados por Mtb.

Em relação a produção da IL-1 β , todas as cepas foram capazes de induzir a secreção dessa citocina. Porém, as cepas 1879/16 e 2351/17 só induziram a produção de IL-1 β em 72 h de infecção, e em concentrações significativamente inferiores a H37Rv. Os maiores produtores de IL-1 β foram os macrófagos infectados pelas cepas 1909/17, 2203/16 e 2201/16, que produziram significativamente mais em comparação aos macrófagos infectados pela cepa padrão (Figura 12).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória que está envolvida em processos inflamatórios, dor e condições autoimunes (REN e TORRES, 2009). Esta citocina é produzida em macrófagos infectados por Mtb, em consequência da ativação do inflamassoma NLRP3. Estudos em modelos murinos demonstraram que a produção de IL-1 β é um fator crítico na resistência do hospedeiro ao Mtb, porém a produção excessiva dessa citocina se torna prejudicial ao hospedeiro, pois está associada a intensa inflamação, dano tecidual e aumento da imunopatologia (MAYER-BARBER *et al.*, 2014). Mishra *et al.* (2017) mostraram que a inflamação neutrofílica prejudicial presente em formas graves da TB está relacionada à produção elevada de IL-1 β . Além disso, de acordo com Amaral *et al.* (2018), a redução da produção dessa interleucina, via inibição da catepsina B, pode diminuir a imunopatologia da TB sem afetar a imunidade contra a micobactéria.

Portanto, a produção elevada dessa citocina pelas cepas 1909/17, 2203/16 e pela cepa 2201/16 (que induziu um alto nível já em 24 h), pode estar relacionada com o seu grau de virulência e com a imunopatologia causada por ela, visto que a cepa 2201/16 é proveniente de pacientes com TB grave e as

cepas 1909/17, 2203/16 são provenientes de pacientes com TB moderada (Figura 12). Além disso, Zhan *et al.* (2018) relataram em seu trabalho que o nível mais elevado de IL-1 β sérico está associado a lesões cavitárias e aspergiloma mais graves. Interessante ressaltar que o papel de neutrófilos e perfis hiperinflamatórios em TB sensível vem ganhando espaço na literatura médica de tuberculose. IL-1beta é uma importante citocina que encontra-se aumentada durante a infecção por TB e está relacionada ao recrutamento de neutrófilos para o pulmão e a alças de amplificação relacionadas a resposta de neutrófilos mediado por plaquetas (DE MELO *et al.*, 2019).

Já na dosagem da secreção do TNF- α em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados, todas as cepas *M. tuberculosis* foram capazes de induzir a citocina TNF- α . Entretanto, as cepas 1879/16, 2351/17 e a cepa padrão H37Rv induziram baixos níveis dessa citocina, em 24 e 72 h. 3 cepas (1909/17, 2203/16 e 2201/1) induziram níveis elevados dessa citocina, em particular a 2201/16, que induziu os maiores níveis em apenas 24 horas (Figura 13).

Por ser uma citocina pró-inflamatória, a expressão do TNF- α tem um papel crucial no controle inicial e a longo prazo da TB. Ele medeia múltiplas respostas imunes e bactericidas durante a infecção por Mtb. Porém, conforme dito anteriormente, altas concentrações dessa citocina possuem efeitos deletérios, que podem estar associadas as formas graves da tuberculose. Visto que, em alta concentração, o TNF- α pode causar degranulação de neutrófilos, promovendo a liberação de enzimas proteolíticas associadas à injúria tecidual. Portanto, alta indução do TNF- α por algumas cepas pode sinalizar uma virulência elevada (ORME, 2013; YAO *et al.*, 2018).

A dosagem da IL-10 em sobrenadante de cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados demonstrou que todas as cepas analisadas induziram baixos níveis dessa citocina em 24 e 72 horas, e apenas as cepas 1909/17 e 2203/16 induziram níveis mais altos e expressivos da IL-10 em 72 h (Figura 14).

A Interleucina-10 é uma citocina anti-inflamatória e imunorreguladora produzida por células imunes inatas e adaptativas, que atua regulando uma variedade de processos imunológicos em resposta a patógenos (MOREIRA-TEIXEIRA *et al.*, 2017). A IL-10 antagoniza as principais vias que controlam a infecção por Mtb, inibindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-

1 β e TNF- α . (HUYNH *et al.*, 2018). Estudos demonstraram que cepas virulentas de Mtb podem induzir aumento da produção de IL-10 pelos macrófagos, como forma de diminuição da resposta imune do hospedeiro, evitando assim sua eliminação. Enquanto as cepas de alta virulência que induzem altos níveis de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α) mas não induzem citocinas regulatórias (IL-10), podem provocar maior imunopatologia (NEWTON *et al.*, 2006; MURPHY, 2014; MUSSI, 2017).

Isso poderia explicar o porquê das cepas 1909/17 e 2203/16 (TB moderada) terem induzido níveis mais altos de IL-10, enquanto a cepa 2201/16 (TB Grave) induziu níveis mais baixos (Figura 14). Já a baixa indução da IL-10 pelas cepas 1879/16, 2351/17 e H37Rv (Figura 14), poderia ser explicada pelo fato delas terem induzido baixas concentrações de citocinas pró-inflamatória, não requerendo altas concentrações da citocina regulatória IL-10. Mas isso, são apenas hipóteses e sugestões que precisam ser mais estudadas e analisadas.

Cilfone *et al.* (2013) demonstraram pela primeira vez que um equilíbrio entre a produção de TNF- α e IL-10 torna-se essencial no controle da infecção por Mtb e previne danos aos tecidos do hospedeiro. Portanto, cepas que alteram a resposta imune promovendo a expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias podem ser consideradas virulentas.

Também foi realizada a quantificação da concentração de NO no sobrenadante da cultura de infecção (Figura 15). O NO é produzido por macrófagos infectados, por meio da sua ativação por micobactérias. A indução de NO controla e restringe o crescimento de micobactérias invasoras (BOSCA *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2016). Porém, cepas consideradas hipervirulentas tendem a induzirem altas concentrações de NO em cultura de macrófagos infectados (MUSSI, 2017). Portanto, juntamente com os dados anteriores, a cepa 2201/16 que também induziu alto nível de NO, pode ser considerada a mais virulenta, seguida pelas cepas 1909/17 e 2203/16.

De acordo com os dados obtidos, diferenciamos as cepas de Mtb em 3 grupos distintos, de acordo com a virulência apresentada por cada uma. O grupo 1, com elevada virulência está a cepa 2201/16; grupo 2, com virulência intermediária (1909/17 e 2203/16); e grupo 3, com baixa virulência (1879/16 e 2351/17).

Esses resultados vão de encontro com os dados clínicos dos pacientes, onde a cepa de elevada virulência foi proveniente de paciente com TB pulmonar grave; as cepas de virulência intermediária foram provenientes de pacientes com TB pulmonar moderada; e as cepas de baixa virulência são provenientes de pacientes com TB pulmonar não grave.

É sabido que a tuberculose pulmonar pode ter distintos desfechos clínicos e apresentar diversos perfis de dano tecidual pulmonar ao longo do processo infeccioso, podendo apresentar formas leves (TB amena com lesões infiltrativas) a graves (TB destrutiva com lesões cavernosas). A tuberculose pulmonar grave é apontada como uma doença imunopatológica, desenvolvida devido à hiperreatividade imune do hospedeiro, que envolve um perfil descontrolado de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, extensa infiltração neutrofílica, respostas exacerbadas de células T e regulação negativa de controles intrínsecos mediados por células Treg (LYADOVA *et al.*, 2010; SAKAI *et al.*, 2016; DE MELLO *et al.*, 2019). O dano tecidual presente na tuberculose pulmonar grave pode ser determinado como doença pulmonar bilateral (4 terços ou mais), e com a presença de pelo menos uma cavidade $\geq 5\text{cm}$ (DE MELLO *et al.*, 2019).

Portanto, conforme os resultados demonstraram, pode haver uma associação entre o grau de virulência da cepa infectante com a progressão da doença. Onde cepas de elevada virulência podem contribuir na severidade da TB, induzindo um perfil de resposta inflamatória, com elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias. Em dados anteriores do nosso grupo, Almeida *et al.* (2017) demonstraram que as lesões necróticas em camundongos C57BL/6 infectados com uma cepa de Mtb altamente virulenta, pertencentes à sublinhagem moderna Beijing, foram associadas ao aumento do influxo de neutrófilos e aumento dos níveis de produção de citocinas inflamatórias nos pulmões, consistente com inflamação exacerbada.

Por último, os dados clínicos dos pacientes no dia 0 do tratamento anti-tuberculose, demonstrou perfil de resposta diferentes. As cepas com maior potencial de virulência estão relacionadas com neutrofilia, trombocitose e maior dano tecidual pulmonar, enquanto as cepas com menor perfil de virulência não foi observado neutrofilia, trombocitose ou cavitações. Isso sugere que a relação

da *Mtb* com o hospedeiro pode levar a desfechos clínicos diferentes, independente da sensibilidade ou resistência ao tratamento anti-TB. Nossos dados subsidiam a hipótese de terapias direcionadas ao hospedeiro, com o incremento de uso de terapias adjuvantes que previnam formas graves de dano tecidual pulmonar e comprometimento no curso da infecção por pacientes de TB.

6 CONCLUSÕES

- Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* obtidos dos pacientes com doença pulmonar no Estado do Rio de Janeiro apresentam variedades na sua virulência e no caráter da resposta imune inicial aos macrófagos.
- Através da avaliação *in vitro* dos seguintes parâmetros: crescimento em meio líquido 7H9, crescimento intracelular em macrófagos RAW e capacidade de indução de morte celular, pode-se observar que:
 - A cepa 2201/16 (TB pulmonar grave) demonstrou alta virulência;
 - As cepas 1909/17 e 2203/16 (TB pulmonar moderada) demonstraram virulência intermediária;
 - As cepas 1879/16 e 2351/17 (TB pulmonar não grave) demonstraram baixa virulência.
- A avaliação do perfil de produção de mediadores pró- e anti-inflamatórios, demonstrou uma forte associação com os resultados da análise de virulência das cepas de *Mtb* estudadas.
- Pode-se observar uma associação entre o nível de virulência observado nos testes de infecção *in vitro* com os dados clínicos dos respectivos pacientes (tipo de TB) e com a patogenia da TB.
- A cepa 2201/16 apresentou virulência elevada em testes *in vitro* em comparação com as demais cepas de *M. tuberculosis* testadas. Essa cepa

pode ser hipervirulenta, podendo induzir uma doença pulmonar grave, associada a extensa lesão tecidual. Porém, esses dados precisam de mais estudos e testes para serem confirmados.

- Os resultados reforçam que a patologia da TB está intimamente ligada a interação de 3 fatores: 1) a virulência da cepa infectante, 2) aos fatores genéticos do hospedeiro (susceptibilidade, perfil hiper-reativo), e 3) ao ambiente (fatores externos). Portanto, concluímos que a virulência da cepa infectante é um fator importante na progressão da TB, e possivelmente no desfecho clínico do paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAMS, K. A.; **BESRA**, G. S. (2018). Mycobacterial cell wall biosynthesis: a multifaceted antibiotic target. *Parasitology*, v. 145, n. 2, p. 116-133.

AGUAYO-CERÓN, K. A.; Morales-González, J. A.; Gutiérrez-Iglesias, G. *et al* (2019). Efecto Regulador de Tibolona sobre la Actividad Antiinflamatoria del Macrófago. *Revista mexicana de ingeniería biomédica*, v. 40, n. 3, p. 1-10.

AGUILERA, J.; **KARKI**, C. B.; **LI**, L. *et al* (2020). N α -Acetylation of the virulence factor EsxA is required for mycobacterial cytosolic translocation and virulence: N α -Acetylation of EsxA facilitates heterodimer separation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 17, p. 5785-5794.

ALLEN, M.; **BAILEY**, C.; **CAHATOL**, I. *et al* (2015). Mechanisms of control of *Mycobacterium tuberculosis* by NK cells: Role of glutathione. *Frontiers in Immunology*. v. 6, p. 1–9, Oct.

ALMEIDA, F. M.; **VENTURA**, T. L. B.; **AMARAL**, E. P. *et al* (2017). Hypervirulent *Mycobacterium tuberculosis* strain triggers necrotic lung pathology associated with enhanced recruitment of neutrophils in resistant C57BL/6 mice. *PloS one*, v. 12, n. 3, p. 1-19.

AMARAL, E. P.; **RIBEIRO**, S. C. M.; **LANES**, V. R. *et al* (2014). Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of tuberculosis. *Plos Pathogens*. v. 10, p.1-14.

AMARAL, E. P.; **LASUNSKAIA**, E. B.; **D'IMPÉRIO-LIMA**, M.R (2016). Innate immunity in tuberculosis: How the sensing of mycobacteria and tissue damage modulates macrophage death. *Microbes and Infection*, v. 18, n. 1, p. 11–20.

AMARAL, E. P.; **RITEAU**, N.; **MOAYERI**, M. *et al* (2018). Lysosomal cathepsin release is required for NLRP3-inflammasome activation by *Mycobacterium tuberculosis* in infected macrophages. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 1427.

ANDREU, N.; **PHELAN**, J.; **SESSIONS**, P. F. *et al* (2017). Primary macrophages and J774 cells respond differently to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-12.

ARBUES, A.; **LUGO-VILLARINO**, G.; **NEYROLLES**, O. *et al* (2014). Playing hide-and-peek with host macrophages through the use of mycobacterial cell envelope phthiocerol dimycocerosates and phenolic glycolipids. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, v. 4, p. 173.

ARCOS, J.; **SASINDRAN**, S. J; **FUJIWARA**, N. *et al* (2011). Hidrolases pulmonares humanas delineiam interações *Mycobacterium*

tuberculosis- macrófago e a capacidade de controlar a infecção. *J Immunol* 187: 372 - 381.

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

BARNES, P. F.; LEEDOM, J. M.; CHAN, L. S. *et al* (1998). Predictors of short-term prognosis in patients with pulmonary tuberculosis. *Journal of Infectious diseases*, v. 158, n. 2, p. 366-371.

BASTOS, H. N.; OSÓRIO, N. S.; GAGNEUX, S. *et al* (2018). The Troika host–pathogen–extrinsic factors in tuberculosis: modulating inflammation and clinical outcomes. *Frontiers in immunology*, v. 8, p. 1948.

BERROCAL-ALMANZA, L. C.; GOYAL, S.; HUSSAIN, A. *et al* (2016). S100A12 is up-regulated in pulmonary tuberculosis and predicts the extent of alveolar infiltration on chest radiography: an observational study. *Scientific Reports*, v. 6, n. 1, p. 1-10.

BERRY, M. P. R.; GRAHAM, C. M.; MCNAB, F. W. *et al* (2010). An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature*, v. 466, n. 7309, p. 973-977.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO TUBERCULOSE (2020) Nº 01/2020, Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO TUBERCULOSE (2021) Nº 01/2021, Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro.

BOSCA, L.; ZEINI, M.; TRAVES, P. G.; HORTELANO, S. (2005). Nitric oxide and cell viability in inflammatory cells: a role for NO in macrophage function and fate. *Toxicology*. v. 208, n. 2, p. 249-258.

BRITES, D.; GAGNEUX, S. (2017). The nature and evolution of genomic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Strain Variation in the Mycobacterium tuberculosis Complex: Its Role in Biology, Epidemiology and Control*, p. 1-26.

CABRAL, V. R. *et al* (2010). Heterogeneidade de resposta por IFN- γ a cepas clínicas de *Mycobacterium tuberculosis* em humanos. *J. bras. pneumol*, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 494-497.

CADENA, A. M.; FORTUNE, S. M.; FLYNN, J. A. L. (2017). Heterogeneity in tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, v. 17, n. 11, p. 691-702.

CARVALHO, B. T. C.; MELO, K. M. (2009). Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas. *Rev. Bras. de alergia e imunopatologia*. v. 3, n.5, p. 294–301, Dez.

CANETTI G. (1955). The Tubercle Bacillus in the Pulmonary Lesion of Man. New York, NY: Springer Publishing.

CHAI, Q.; LU, Z.; LIU, C. H. (2020) Host defense mechanisms against *Mycobacterium tuberculosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 77, n. 10, pág. 1859-1878.

CHAKRABORTY, P.; BAJELI, S.; KAUSHAL, D. et al (2021). Biofilm formation in the lung contributes to virulence and drug tolerance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature communications, v. 12, n. 1, p. 1-17.

CHANDRASEKARAN, P.; SARAVANAN, N.; BETHUNAICKAN, R.; TRIPATHY, S. (2017) Malnutrition: Modulator of Immune Responses in Tuberculosis. Frontiers in Immunology, v. 8, p. 1316.

CILFONE, N. A.; PERRY, C. R.; KIRSCHNER, D. E. et al (2013). Multi-Scale Modeling Predicts a Balance of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-10 Controls. Plos One, v. 8, p.1-16.

COSCOLLA, M.; GAGNEUX, S. (2014). Consequences of genomic diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. In: Seminars in immunology. Academic Press, p. 431-444.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P. et al (2010). Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória; Immune system: Part I. Rev. bras. reumatol, v. 50, n. 4, p. 434–447.

DALLENGA, T.; REPNIK, U.; CORLEIS, B. et al. (2017). *M. tuberculosis*-induced necrosis of infected neutrophils promotes bacterial growth following phagocytosis by macrophages. Cell host & microbe, v. 22, n. 4, p. 519-530.

DE MELO, M. G. M.; MESQUITA, E. D. D.; OLIVEIRA, M. M; et al (2019) Imbalance of NET and alpha-1-antitrypsin in tuberculosis patients is related with hyper inflammation and severe lung tissue damage. Frontiers in Immunology, v. 10, p. 1–17.

DINARDO, A. R.; NISHIGUCHI, T.; GRIMM, S. L. et al (2021). Tuberculosis Endotypes to Guide Stratified Host-Directed Therapy. Med, Volume 2, P 217-2323.

EHLERS, S.; SCHAIBLE, U. E. (2012) The granuloma in tuberculosis: Dynamics of a host-pathogen collusion. Frontiers in Immunology, v. 3, p. 1–10.

ERNST J. D. (2012). The immunological life cycle of tuberculosis. Nature Reviews Immunology, v.12, p.581.

EUM, S. Y.; KONG, J.; HONG, M. et al (2009). Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. Chest, v. 137, n. 1, p. 122-128.

FARIA, S.; JOAO, I.; JORDAO, L. (2015) General overview on nontuberculous mycobacteria, biofilms, and human infection. *Journal of Pathogens*. v. 2015, 1-10.

FERREIRA, J. C. C. (2018). AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cyperus articulatus* L. EM MACRÓFAGOS. 72f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Oeste do Pará, Santerém.

FERRI, A. O.; AGUIAR, B.; MÖRSCHBÄCHER W. C. *et al* (2014). Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. *Revista Liberato*, v. 15, n. 24, p. 145–154.

FORRELLAD, M. A. KLEPP, L. I.; GIOFFRÉ, A. *et al* (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, v. 4, n. 1, p. 3-66.

GAGNEUX, S. et al (2006). Variable host–pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 8, p. 2869-2873.

GALLEGOS, A. M.; PAMER, E. G.; GLICKMAN, M. S. (2008). Delayed protection by ESAT-6–specific effector CD4+ T cells after airborne *M. tuberculosis* infection. *The Journal of experimental medicine*, v. 205, n. 10, p. 2359-2368.

GOMES, L. L. et al (2015). Genetic diversity of the *Mycobacterium tuberculosis Beijing* family in Brazil and Mozambique and relation with infectivity and induction of necrosis in THP-1 cells. *Tuberculosis*, v. 95, p. S190-S196.

GUPTA, N.; KUMAR, R.; AGRAWAL, B. (2018). New Players in Immunity to Tuberculosis: The Host Microbiome, Lung Epithelium, and Innate Immune Cells. *Frontiers in immunology*, v. 9, p. 709.

HERRERA, M. T.; GONZALEZ, Y.; JUAREZ, E. (2018). El IFN- γ induce LL-37 pero no controla el crecimiento de *M. tuberculosis* en macrófagos alveolares. *Neumol. cir. torax*, México, v. 77, n. 4, p. 267-275.

HUNTER, R. L. (2020). The Pathogenesis of Tuberculosis–The Koch Phenomenon Reinstated. *Pathogens*, v. 9, n. 10, p. 813.

HUYNH, J. P.; LIN, C. C.; KIMMEY, J. M. *et al* (2018). Bhlhe40 is an essential repressor of IL-10 during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 215, n. 7, p. 1823-1838.

IOERGER, T. R.; FENG, Y.; GANESULA, K. *et al* (2010). Variation among Genome Sequences of H37Rv Strains of *Mycobacterium tuberculosis* from Multiple Laboratories. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 14, p. 3645-3653.

JAGIELSKI, T. et al (2020). Genomic insights into the *Mycobacterium kansasii* complex: an update. *Frontiers in microbiology*, v. 10, p. 2918.

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

JILANI, T. N.; AVULA, A.; GONDAL, A. Z. *et al* (2021). Active Tuberculosis. National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513246/>>

JO, Eun-Kyeong. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs. *Current opinion in infectious diseases*, v. 21, n. 3, p. 279-286.

JÚNIOR, D. M.; CRUVINEL, W. M; ARAÚJO, J. A. P. *et al* (2010). Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória; Immune system: Part I. Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammation. *Rev. bras. reumatol*, v. 50, n. 4, p. 434–447.

KATO-MAEDA, M.; GAGNEUX, S.; FLORES, L. L. *et al* (2011). Strain classification of *Mycobacterium tuberculosis*: congruence between large sequence polymorphisms and spoligotypes. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, v. 15, n. 1, p. 131-133.

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

KOLLOLI, A.; KUMAR, R.; SINGH, P. *et al* (2021). Aggregation state of *Mycobacterium tuberculosis* impacts host immunity and augments pulmonary disease pathology. *bioRxiv*, v. 4, n. 1256, p. 1-12.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N. *et al* (2011). The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nat. Rev.* 469: 483-490.

KROESEN, V. M. *et al* (2019). Mycobacterial virulence: impact on immunogenicity and vaccine research. *F1000Research*, v. 8, p 1-15.

KUMAR, A.; FARHANA, A.; GUIDRY, L. *et al* (2011) Redox homeostasis in mycobacteria: the key to tuberculosis control? *Expert Reviews in Molecular Medicine*, v. 13, p. 1-25.

KURZ, S. G.; FURIN, J. J.; BARK, C. M. (2016). Drug-Resistant Tuberculosis: Challenges and Progress. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 30, n. 2, p. 509–522.

LASUNSKAIA, E.; RIBEIRO, S. C.; MANICHEVA, O. *et al* (2010). Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with

enhanced virulence. *Micróbios e infecção*, v. 12, n. 6, pág. 467-475.

LEE, H. J.; **KO**, H. J.; **JUNG**, Y. J. (2016). Insufficient generation of mycobactericidal mediators and inadequate level of phagosomal maturation are related with susceptibility to virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mouse macrophages. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 541.

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

LIU, S.; **SU**, X.; **PAN**, P.; *et al* (2016). Neutrophil extracellular traps are indirectly triggered by lipopolysaccharide and contribute to acute lung injury. *Scientific Reports*, v. 6, n., p. 1–8, Ago.

LOWE, D. M.; **BANDARA**, A. K.; **PACKEET**, G. E. *et al* (2013). Neutrophilia independently predicts death in tuberculosis. *European Respiratory Journal*, v. 42, n. 6, p. 1752-1757.

LYADOVA, I. (2012) Inflammation and Immunopathogenesis of Tuberculosis Progression. *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity*. P. 19-42.

LYADOVA, I. V.; **TSIGANOV**, E. N.; **KAPINA**, M. A. *et al* (2010). In mice, tuberculosis progression is associated with intensive inflammatory response and the accumulation of Gr-1 cells in the lungs. *PLoS ONE*, v. 5, n. 5, p. e10469.

LY, A.; **LIU**, J. (2020) Mycobacterial virulence factors: Surface-exposed lipids and secreted proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 11, p. 3985.

MANUAL DE BIOSSEGURANÇA DO LABORATÓRIO NB3 (2019). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Código nº: NI-LBR002. Publicado em: 07/08/2019. Laboratório de Biologia do Reconhecer. Página: 1 a 30.

MARAKALALA, M. J. *et al* (2016). Inflammatory signaling in human tuberculosis granulomas is spatially organized. *Nature medicine*, v. 22, n. 5, p. 531-538.

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

MARTINEAU, A. R. *et al* (2007). Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. *The Journal of clinical investigation*, v. 117, n. 7, p. 1988-1994.

MARTINO, M.; **LODI**, L.; **GALLI**, L. *et al* (2019). Immune response to *Mycobacterium tuberculosis*: a narrative review. *Frontiers in pediatrics*, v. 7, p. 350.

MAYER-BARBER, K. D.; **ANDRADE**, B. B.; **OLAND**, S. D. et al (2014). Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. *Nature*, v. 511, n. 7507, p. 99-103.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (2021). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico. Epidemiological Report – Tuberculosis, Número especial.

MISHRA, B. B.; **LOVEWELL**, R. R.; **OLIVE**, A. J.; **ZHANG**, G. et al (2017). Nitric oxide prevents a pathogen-permissive granulocytic inflammation during tuberculosis. *Nature microbiology*, v. 2, n. 7, p. 1-11.

MOREIRA-TEIXEIRA, L.; **REDFORD**, P. S.; **STAVROPOULOS**, E. et al (2017). T Cell-Derived IL-10 Impairs Host Resistance to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *The Journal of Immunology*, v. 199, n. 2, pág. 613-623.

MOUTINHO, I. L. D. (2011). Tuberculose: aspectos imunológicos na infecção e na doença. *Rev Med Minas Gerais. Juiz de Fora, MG.* v. 21, n. 1, p. 42–48.

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

MUSSI, V. D. O. CARACTERIZAÇÃO DA VIRULÊNCIA DAS CEPAS DE *Mycobacterium kansasii* ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA PULMONAR NÃO TUBERCULOSA. 2017. 84f. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF, Campos dos Goytacazes, 2017.

NANDI, B.; **BEHAR**, S. M. (2011). Regulation of neutrophils by interferon- γ limits lung inflammation during tuberculosis infection. *Journal of Experimental Medicine*, v. 208, n. 11, p. 2251-2262.

NDLOVU, H; **MARAKALALA**, M. J. (2016). Granulomas and inflammation: host-directed therapies for tuberculosis. *Frontiers in immunology*, v. 7, p. 434.

NEWTON, S. M.; **SMITH**, R. J.; **WILKINSON**, K. A. et al (2006) An exclusion that defines a common Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis* is associated with immune subversion. *Anais da Academia Nacional de Ciências*, v. 103, n. 42, pág. 15594-15598, 2006.

NIKITINA, I. Y. et al (2018). Th1, Th17, and Th1Th17 Lymphocytes during Tuberculosis: Th1 Lymphocytes Predominate and Appear as Low-Differentiated CXCR3 + CCR6 + Cells in the Blood and Highly Differentiated CXCR3 +/- CCR6 – Cells in the Lungs . *The Journal of Immunology*, v. 200, n. 6, p. 2090–2103, set.

NOGUEIRA, A. F.; **FACCHINETTI**, V.; **VINÍCIUS**, M. et al (2012). Tuberculose: uma abordagem geral dos principais aspectos Tuberculosis: a general approach of the main aspects. *Rev. Bras. Farm.*, v. 93, n. 1, p. 3–9.

NUNES-ALVES C., **BOOTY** M. G., **CARPENTER** S. M. et al (2014). In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nature Reviews Microbiology*,

v.12, p.289-299.

O'GARRA, A.; REDFORD, P. S.; MCNAB, F. W. *et al* (2013). The immune response in tuberculosis. Annual review of immunology, v. 31, p. 475-527.

ONG, C. W. M. *et al* (2015). Neutrophil-derived MMP-8 drives AMPK-dependent matrix destruction in human pulmonary tuberculosis. PLoS pathogens, v. 11, n. 5, p. e1004917.

ORGEUR, M.; BROSCH, R. (2018). Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Current opinion in microbiology, v. 41, p. 68-75.

ORME, I. (2013) A new unifying theory of the pathogenesis of tuberculosis. Tuberculosis 1- 7.

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

PANTELEEV, A. V; LYADOVA, I. V. (2015) Th1 and Th17 Cells in Tuberculosis: Protection, Pathology, and Biomarkers. Mediators of Inflammation. Moscou, v. 2015, p.13.

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

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

REN, K.; TORRES, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. Brain research reviews, v. 60, n. 1, p. 57-64.

RIBEIRO, S. C. M. (2015). CARACTERIZAÇÃO DE VIRULÊNCIA E CARÁTER DA RESPOSTA IMUNE INDUZIDA POR CEPAS DE *Mycobacterium tuberculosis* DA FAMÍLIA GENÉTICA *BEIJING*: SUBLINHAGENS ANCESTRAL E MODERNA. 82f. Tese de Doutorado – Universidade Estadual do norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF – Campos dos Goytacazes.

RIBEIRO, S. C. M.; GOMES, L. L.; AMARAL, E. P. *et al* (2014). *Mycobacterium tuberculosis* strains of the modern sublineage of the *Beijing* family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. Journal of clinical microbiology, v. 52, n. 7, p. 2615-2624.

SAKAI, S.; KAUFFMAN, K. D.; SALLIN, M. A. *et al* (2016). CD4 T Cell-derived IFN- γ plays a minimal role in control of pulmonary *mycobacterium tuberculosis* infection and must be actively repressed by PD-1 to prevent lethal disease. PLoS pathogens, v. 12, n. 5, p. e1005667.

SALVATO, R. S. et al (2020). First insights into circulating XDR and pre-XDR *Mycobacterium tuberculosis* in Southern Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 78, p. 104127.

SASINDRAN, S. J.; TORRELLES, J. B. *Mycobacterium tuberculosis* infection and inflammation: What is beneficial for the host and for the bacterium? *Frontiers in Microbiology*, v. 2, n. JAN, p. 1–16.

SCHRAGER, L. K.; IZZO, A.; VELMURUGAN, K. (2016) Immunopathogenesis of tuberculosis and novel mechanisms of vaccine activity. *51 Tuberculosis*, v. 99, p. S3–S7.

SCHWANDER, S.; DHEDA, K. (2011). Human lung immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: Insights into pathogenesis and protection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 183, n. 6, p. 696–707.

SHAPOVALOVA, O.; SACADURA-LEITE, E.; MENDONÇA G. et al (2016). Tuberculose latente em profissionais de saúde: concordância entre 2 testes diagnósticos. *Revista Portuguesa de Saude Publica*, v. 34, n. 1, p. 3–10.

SHI, D.; XU, M.; REN, M. et al (2017). Immunomodulatory Effect of Flavonoids of Blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Leaves via the NF- κ B Signal Pathway in LPS-Stimulated RAW 264.7 Cells. *J Immunol Res*, v. 2017, p. 5476903.

SIMEAO, F. C. S.; CHIMARA, E.; OLIVEIRA, R. S. et al (2009). Detecção do fator corda e avaliação do aspecto macroscópico das colônias de micobactérias: um eficiente teste de triagem combinado para a identificação presuntiva do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em meios só. *J. bras. pneumol. São Paulo*, v. 35, n. 12, p. 1212-1216.

SILVA, D. R.; RABAHI M. F.; SANT'ANNA C. C. et al (2021). Consenso sobre o diagnóstico da tuberculose da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 47, n. 2.

SILVA, J. R. Lapa. (2012). *Novos Aspectos da Patogenia da Tuberculose. Pulmão RJ*, v. 21, n. 1, p. 10–14.

STAMM, C. E.; COLLINS, A. C.; SHILOH, M. U. (2016). Sensing of *Mycobacterium tuberculosis* and consequences to both host and bacillus. *Immunological Reviews*, v. 264, n. 1, p. 204–219.

STEK, C. et al (2018). The immune mechanisms of lung parenchymal damage in tuberculosis and the role of host-directed therapy. *Frontiers in Microbiology*, p. 2603.

STONE, N. E. et al (2016) More than 50% of *Clostridium difficile* isolates from pet dogs in Flagstaff, USA, carry toxigenic genotypes. *PloS one*, v. 11, n. 10, p. e0164504.

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

SUBBIAN, S. *et al* (2015). Lesion-specific immune response in granulomas of patients with pulmonary tuberculosis: a pilot study. PloS one, v. 10, n. 7, p. e0132249.

TEIXEIRA, A. B.; FEITOSA, A. C. S.; RIBEIRO, D. B. de C. *et al* (2018). General aspects of tuberculosis: an update on the etiologic agent and treatment. Revista Brasileira de Análises Clínicas. Ceará, v. 50, n. 3, p. 228–232.

TZELEPIS, F.; BLAGIH, J.; KHAN, N. *et al* (2018) Mitochondrial cyclophilin D regulates T cell metabolic responses and disease tolerance to tuberculosis. Science Immunology, v. 3, n. 23, p. 11.

VALWAY S.E.; SANCHEZ M.P.; SHINNICK T.F. *et al*. (1998). An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. New England Journal of Medicine, v.338, n.10, p.633-639.

VAN E.; J. D. *et al* (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. Journal of clinical microbiology, v. 31, n. 2, p. 406-409.

VENTURA, T. L. B.; S. D. CALIXTO; B. A. ABRAHIM-VIEIRA *et al* (2015). Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on an Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach. Molecules, v. 20, n. 5, p. 8072-8093.

WILDNER, L. M. *et al* (2011). Micobactérias: epidemiologia e diagnóstico. Revista de Patologia Tropical/Journal of Tropical Pathology, v. 40, n. 3, p. 207-230.

WONG, E.; EVANS, S.; KRAUS, C. R. *et al* (2020). IL-10 impairs local immune response in lung granulomas and lymph nodes during early *Mycobacterium tuberculosis* infection. The Journal of Immunology, v. 204, n. 3, pág. 644-659.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2020) *Global Tuberculosis Report 2020*. Geneva.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2021) *Global Tuberculosis Report 2021*. Geneva.

YAO, J.; DU, X.; CHEN, S. *et al* (2018). Rv2346c enhances mycobacterial survival within macrophages by inhibiting TNF- α and IL-6 production via the p38/miRNA/NF- κ B pathway. Emerging microbes & infections, v. 7, n. 1, p. 1-16.

ZHAN, M.; XU, B.; ZHAO, L. *et al* (2018). The serum level of IL-1B correlates with the activity of chronic pulmonary Aspergillosis. Canadian respiratory journal, v. 2018, 2018.

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

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