



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA



Eduardo Martins de Sousa

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA AGUDA DE CAMUNDONGOS
C57BL/6 E BALB/c FRENTE À INFECÇÃO POR *Mycobacterium massiliense*.**

**Orientadora:
Prof^a Dra Ana Paula Junqueira Kipnis**

Dissertação de Mestrado

Goiânia-Go, 2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL



Eduardo Martins de Sousa

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA AGUDA DE CAMUNDONGOS
C57BL/6 E BALB/c FRENTE À INFECÇÃO POR *Mycobacterium massiliense*.**

Orientadora:

Profª Dra Ana Paula Junqueira Kipnis

Comitê de Orientação:

Profº Drº André Kipnis

Dissertação de mestrado submetida ao PPGMT/UFG como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical na Área de Concentração em Imunologia.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FUNAPE-UFG.

Goiânia-Go, 2009

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central - UFG

S719a Sousa, Eduardo Martins de.
Avaliação da resposta imunológica aguda de camundongos C57BL/6 E BALB/c frente à infecção por *Mycobacterium massiliense* [manuscrito] / Eduardo Martins de Sousa. - 2009.
xv, 73 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Junqueira Kipnis.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, 2009.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

1. Micobactéria atípica. 2. Citocina. 3. Óxido nítrico.
4. Resposta imune inata. I. Título.

CDU: 576.8

Dedico este trabalho ao meu querido sobrinho
João Pedro que é minha razão de viver, sonhar e lutar.

”... Nossas dádivas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar, se não fosse o medo de tentar.”

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

Pelos mais variados motivos, este trabalho me é muito caro, e devo agradecer a muitas pessoas que estiveram comigo durante todo o processo. Para mim mesmo, chamo este agradecimento de “desabafo de dois anos”, então, não estranhem se o acharem um pouco longo!

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho durante esta caminhada em busca dos meus objetivos.

Aos meus pais, que me ensinaram a não temer desafios e a superar os obstáculos com humildade.

A toda minha família, tão normal e tão louca ao mesmo tempo; as figuras mais presentes (presentes **DEMAIS**, algumas vezes) na minha vida, meu norte (embora eu sempre prefira o sul) e, muitas vezes, minha consciência.

À Professora Ana Paula Junqueira-Kipnis, por ter acreditado no meu trabalho desde o princípio, quando parecia que ninguém acreditava. Por ter sido amiga, orientadora em todos os momentos de dificuldades e alegrias vividos. A sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de argüir as idéias apresentadas, creio que deram norte a este trabalho, facilitando o alcance de seus objetivos.

Ao Professor André Kipnis pelas suas reflexões criativas sobre nosso trabalho, as quais muito nos ajudaram a compreendê-lo e a realizar uma análise crítica sobre o mesmo, meus sinceros agradecimentos.

À Professora Thereza Liberman Kipnis (in memoriam), que tive a oportunidade de conhecer e descobrir que pautamos nossas vidas por trabalho, estudo e dedicação. Creio ter sido esta experiência de vida que a levou ser extremamente generosa comigo em sua colaboração para realização deste trabalho. Seus exemplos de vida vão além da pequenez desta tentativa de agradecimento frente à sua nobreza, meus eternos agradecimentos.

Aos professores pelos quais cruzei nesta pós-graduação, que foi tão rica em informações. Obrigado por me mostrar como um profissional deve agir realmente. Através dos exemplos vistos em sala e na vida, posso afirmar que aprendi como devo proceder.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunopatologia das Doenças Infecciosas: Arioldo, Ediane, Loanda, Bruna, Fernando, Rafael, Michelle, Mayara, Cinthya, Rogério, Hidelbrando, João Alves que contribuíram com uma mão a mais para realização dos experimentos, ou sugestões para a realização dessa dissertação.

Aos colegas do Laboratório de Bacteriologia Molecular Alessandra, Camila, Lorena, Sueli que contribuíram para realização deste trabalho.

A todos os funcionários do biotério que me auxiliaram na realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública.

Ao amigo Eduardo e demais colegas do Laboratório de Biologia do Reconhecer da Universidade Estadual do Norte Fluminense pela colaboração na realização dessa dissertação.

Aos amigos que me apoiaram e agüentaram durante estes anos de curso, e sempre manifestaram apoio ou estiveram ao menos curiosos a respeito deste trabalho.

Considero que a elaboração de uma dissertação de mestrado é um produto coletivo embora sua redação, responsabilidade e *stress* seja predominantemente individual. Várias pessoas contribuíram para que este trabalho chegasse a um bom termo. A todas elas registro minha gratidão.

Agradeço a todos os demais que estiveram ao meu lado neste trabalho. Precisei muito do apoio de todos para que este, que parecia ser apenas um delírio meu, virasse um sonho que se torna realidade.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE QUADROS.....	xvii
Quadro 1 : Classificação das espécies de MA de acordo com a patogenicidade.....	8..... xvii
Quadro 2: Investigação de Surto por Micobactérias Atípicas no Brasil.....	11..... xvii
RESUMO.....	1
Micobactérias atípicas são microrganismos distintos dos agentes etiológicos responsáveis pela tuberculose e pela lepra (Hanseníase). São considerados atualmente como patógenos emergentes associados a procedimentos cirúrgicos simples, e são resistentes aos antibióticos convencionais. As infecções por micobactérias atípicas atingem três em cada 10 mil pessoas por ano, porém a incidência vem aumentando à medida que cresce o número de indivíduos infectados por HIV. A baixa virulência das micobactérias atípicas condiciona a sua patogenicidade à diminuição da resistência do hospedeiro, por isso faz-se necessário uma melhor investigação da interação do microrganismo com o hospedeiro. Nesta dissertação, a resposta imune celular e humoral de camundongos BALB/c e C57BL/6 frente à infecção por <i>M. massiliense</i> isolada de surto hospitalar na cidade de Goiânia foi avaliada. O isolado de <i>M. massiliense</i> utilizado neste estudo foi capaz de infectar camundongos imunocompetentes, que controlaram completamente a carga bacteriana antes dos 30 dias de infecção. Os mecanismos pelos quais estes animais eliminaram as micobactérias foram: produção de NO por macrófagos peritoneais, presença de IgG1 específica e indução de mRNA para citocinas inflamatórias, assim como de citocinas reguladoras da inflamação.....	1
Palavras-chave: Citocina, Micobactéria Atípica, Óxido Nítrico, Resposta imune inata.	1
ABSTRACT.....	2
1 – Introdução.....	3
1.1 Gênero <i>Mycobacterium</i>	3
1.2 Micobactérias Atípicas.....	6
1.2.1 Micobactérias Atípicas como Patógenos Emergentes.....	7
1.2.2 Epidemiologia	8
1.3 <i>Mycobacterium massiliense</i>	10
1.4 Imunopatologia de micobactérias.....	12
1.5 Resposta imune.....	15
2 – Justificativa.....	22
3 – Objetivos.....	23
3.1 Objetivo Geral:.....	23
3.2 Objetivos Específicos:.....	23
4 – Material e Métodos.....	24
4.1 Animais e divisão dos grupos experimentais.....	24
4.2 Isolados de Micobactérias atípicas.....	24
4.3 Preparação do bacilo para inoculação em animais de laboratório.....	26
4.4 – Inoculação dos animais.....	26
4.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).....	27
4.6 Obtenção de Soro e sobrenadante celular.....	27
4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	28
4.7.1 Obtenção de extrato protéico de <i>M. massiliense</i>	28
4.7.2 Dosagem de Anticorpos.....	28
4.8 Obtenção de RNA total.....	29
4.8.1 Quantificação de RNA total.....	30
4.9 Síntese de cDNA pelo método de transcrição reversa.....	30
4.10 Ensaio de expressão gênica através da reação de polimerase em cadeia em tempo real.....	31
4.11 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.....	33
4.12 Cultura de macrófagos.....	34

4.13 Dosagem de Óxido Nítrico.....	35
4.14 Análise Estatística.....	35
5 – RESULTADOS.....	37
5.1 Avaliação da virulência em camundongos.....	37
5.2 Avaliação da resposta imune específica.....	39
5.3 Avaliação da produção de Óxido Nítrico.....	43
7 – Conclusões.....	49
7.1 Conclusão Geral.....	49
7.2 Conclusões Específicas.....	49
8 - Referências Bibliográficas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCs: Células Apresentadoras de Antígenos

BAAR: Bacilos Álcool-ácidos Resistentes

BCG: Bacilo Calmete-Guérin

C: Citosina

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

CR: Receptor de complemento

dATP: Deoxi adenosina trifosfato

dCTP: Deoxi citosina trifosfato

dGTP: Deoxi guanina trifosfato

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Deoxiribonucleotídeo trifosfato

dTTP: Deoxi timidina trifosfato

ELISA: Ensaio Imunoenzimático

eNOS: Óxido Nítrico Sintase endotelial

G: Guanina

GLPs: Glicopeptideolípídeos

GM-SCF: Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos e Monócitos

HPN: Peptídeo de Neutrófilo Humano

IFN- γ : Interferon gama

IgG : Imunoglobulina

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase induzível

ip: Intraperitoneal

iv: Intravenoso

kDa: Quilodalton

LAM: Lipoarabinomanana

LB: Linfócito B

LT: Linfócito T

MA: Micobactérias Atípicas

MCP: Proteína Químioatraente de Monócito

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

MIP: Proteína Inflamatória de Monócito

MOTT: Outras micobactérias que não *Mycobacterium tuberculosis*

mRNA: Ácido ribonucléico mensageiro

NK: Matadoras naturais

nNOS: Óxido Nítrico Sintase neuronal

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintase

NTM: Micobactérias não Tuberculosas

OADC: Complexo Dextrose Albumina e Ácido Oléico

OD: Densidade Óptica

OPD: Ortofenilenodiamino

PAMPs: Padrões Moleculares Associados aos Patógenos

pb: Pares de Base

PBS: Tampão Fosfato Salina

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PCR-PRA: Análise por restrição de produtos por Reação em Cadeia da Polimerase

rDNA: Ácido Dexosirribonucléico ribossomal

RNA: Ácido Ribonucléico

rpm: Rotações por minuto

TA: Temperatura Ambiente

TACO: Camada de Tryptofano-Aspartato

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta

TLR: Receptor Semelhante ao Toll

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

V-H⁺ ATPase: Adenosina Trifosfato Vacuolar

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da parede celular de micobactérias	05
Figura 2: Árvore filogenética do gene <i>recA</i> combinado com gene <i>rpoB</i> de <i>M. massiliense</i> e outras espécies.....	12
Figura 3: Genotipagem dos isolados clínicos por PFGE	25
Figura 4: Determinação de unidades formadoras de colônias do baço de camundongos C57BL/6 após 1, 3, 7 e 14 dias de inoculação via intraperitoneal e intravenosa com 10 ⁶ bacilos viáveis de <i>M. massiliense</i>	37
Figura 5: Determinação de unidades formadoras de colônias do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c após 1, 3, 7 e 14 dias de inoculação via intravenosa com 10 ⁶ bacilos viáveis de <i>M. massiliense</i>	38
Figura 6: Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti-extrato protéico de <i>M. massiliense</i> no soro de camundongos C57BL/6 e BALB/c após 14 dias de infecção com <i>M. massiliense</i>	39
Figura 7: Expressão de mRNA de citocinas em relação a expressão de mRNA de β -actina em camundongos C57BL/6 e BALB/c após 3, 7 e 14 dias de infecção com 10 ⁶ bacilos viáveis de <i>M. massiliense</i>	42
Figura 8: Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e BALB/c após estimulação com <i>M. massiliense</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes analisados por qRT-PCR.....	33
--	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 : Classificação das espécies de MA de acordo com a patogenicidade.....	8
Quadro 2 : Investigação de Surto por Micobactérias Atípicas no Brasil.....	11

RESUMO

Micobactérias atípicas são microrganismos distintos dos agentes etiológicos responsáveis pela tuberculose e pela lepra (Hanseníase). São considerados atualmente como patógenos emergentes associados a procedimentos cirúrgicos simples, e são resistentes aos antibióticos convencionais. As infecções por micobacterias atípicas atingem três em cada 10 mil pessoas por ano, porém a incidência vem aumentando à medida que cresce o número de indivíduos infectados por HIV. A baixa virulência das micobactérias atípicas condiciona a sua patogenicidade à diminuição da resistência do hospedeiro, por isso faz-se necessário uma melhor investigação da interação do microrganismo com o hospedeiro. Nesta dissertação, a resposta imune celular e humoral de camundongos BALB/c e C57BL/6 frente à infecção por *M. massiliense* isolada de surto hospitalar na cidade de Goiânia foi avaliada. O isolado de *M. massiliense* utilizado neste estudo foi capaz de infectar camundongos imunocompetentes, que controlaram completamente a carga bacteriana antes dos 30 dias de infecção. Os mecanismos pelos quais estes animais eliminaram as micobactérias foram: produção de NO por macrófagos peritoneais, presença de IgG1 específica e indução de mRNA para citocinas inflamatórias, assim como de citocinas reguladoras da inflamação.

Palavras-chave: Citocina, Micobactéria Atípica, Óxido Nítrico, Resposta imune inata.

ABSTRACT

Atypical mycobacteria are microorganism's apart from the etiological agents responsible for tuberculosis and leprosy. They are currently considered as emerging pathogens associated with simple surgical procedures, and are resistant to conventional antibiotics. The atypical mycobacterial infections is responsible for three in every 10 thousand people per year, but the incidence has been increasing as the number of individuals infected with HIV also increases. The low virulence of atypical mycobacteria associates its pathogenicity to decreased resistance of the host, and consequently it is necessary to better understand the interaction between host and microorganism. The cellular and humoral immune response of BALB/c mice and C57BL/6 mice infected with *M. massiliense* isolated from an outbreak of hospitals in the city of Goiania was evaluated. The isolate of *M. massiliense* used in this study was able to infect immunocompetent mice, which completely controlled the bacterial load before the 30 days of infection. The mechanisms by which these animals cleared the mycobacteria were: production of NO by peritoneal macrophages, presence of specific IgG1 and induction of mRNA for inflammatory cytokines, as well as regulatory cytokines in inflammation.

Key-words: Atypical mycobacteria, Cytokines, nitric oxide, innate immune response.

1 – Introdução

1.1 Gênero *Mycobacterium*.

A definição taxonômica do gênero *Mycobacterium* se baseia em marcadores quimiotaxonômicos sob três critérios, a saber: a álcool-ácido resistência, o conteúdo de G-C (guanina-citosina) do seu DNA, presente em 61 a 71% das cepas, e, a síntese de ácidos micólicos de peso molecular entre 60 a 90 Kda (Hance et al, 1989; Saito et al, 1990).

O gênero *Mycobacterium* pertence à família *Mycobacteriaceae* (o único gênero desta família), ordem *Actinomycetales* e classe *Actinomycetes* e se caracteriza como bacilos delgados, levemente curvados ou retos, com tamanho de 0,2 a 0,4 x 2 a 4 µm. São microrganismos aeróbicos, embora algumas espécies possam crescer em ambientes com baixa concentração de oxigênio, imóveis e não formadores de esporos (Vossler, 2000). Seu crescimento se dá, em geral, sob forma de micélios ou filamentosa, dando origem a elementos bacilares. Sua patogenicidade está relacionada com sua parede celular, cuja camada externa contém ácido micólico (Shinnick & Good, 1994), que forma uma camada cérea, resistente à água.

A parede celular das micobactérias contém glicopeptídeos unidos a polissacarídeos de cadeia ramificada denominado arabinogalactana, por meio de ligações fosfodiéster. As terminações distais da arabinogalactana estão esterificadas com o ácido micólico. Os ácidos

micólicos são ácidos graxos complexos, β -hidroxilados e α -substituídos, que ocorrem como ésteres. O complexo glicopeptídeo-ácido micólico-arabinogalactana forma o esqueleto da parede celular micobacteriana. As cadeias de carbono dos ácidos micólicos estão intercaladas com as de numerosos lipídios e glicolipídios associados à parede. Estes ácidos graxos são importantes para a análise e para a caracterização das espécies de micobactérias. Outros lipídios complexos, como ácidos graxos de cadeias curtas, fenolglicolipídios, peptidoglicolipídeos também são bons marcadores para a identificação de numerosas espécies (Vincent et al, 1992). Outra característica de micobactérias conferida por estas moléculas de ácidos micólicos-arabinogalactana é a chamada álcool-ácido-resistência (Nolte & Metchock, 1995, Koneman et al, 2001).

Os lipídios são responsáveis por 60% do peso seco da parede celular das micobactérias (Figura 1) (Koneman et al, 2001; Rastogi et al, 2001). Quando as micobactérias são inseridas em um ambiente que favoreça a ruptura da parede celular, componentes como: lipoarabinomananas (LAM), fosfatidilinositol, manosídeos, lipomananas entre outros se solubilizam, mas o complexo formado pelo ácido micólico, arabinogalactanas e peptideoglicanas permanece intacto. Tal característica permite que a camada superior participe na infecção do hospedeiro enquanto a camada inferior garante a viabilidade da bactéria (Brennan, 2003; Sinha et al, 2005).

O gênero *Mycobacterium* compreende 125 espécies (Euzéby, 2006), sendo que *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canetti*, *M. bovis*, *M. bovis BCG* (*Bacilo Calmette Guéri*), *M. microti* e *M. pinnipedii* (Cousins et al, 2003) formam um complexo conhecido como Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) os quatro primeiros

representantes desse grupo causam tuberculose em humanos e juntos com o *M. leprae* são as únicas micobactérias que são transmitidas de pessoa para pessoa (Vossler, 2000). Este complexo pertence a um grupo de micobactérias de crescimento lento com um tempo de duplicação entre 12 – 20 h., crescem em uma temperatura entre 34 – 38°C, e formam colônias visíveis de duas a seis semanas (Roberts, 1991).

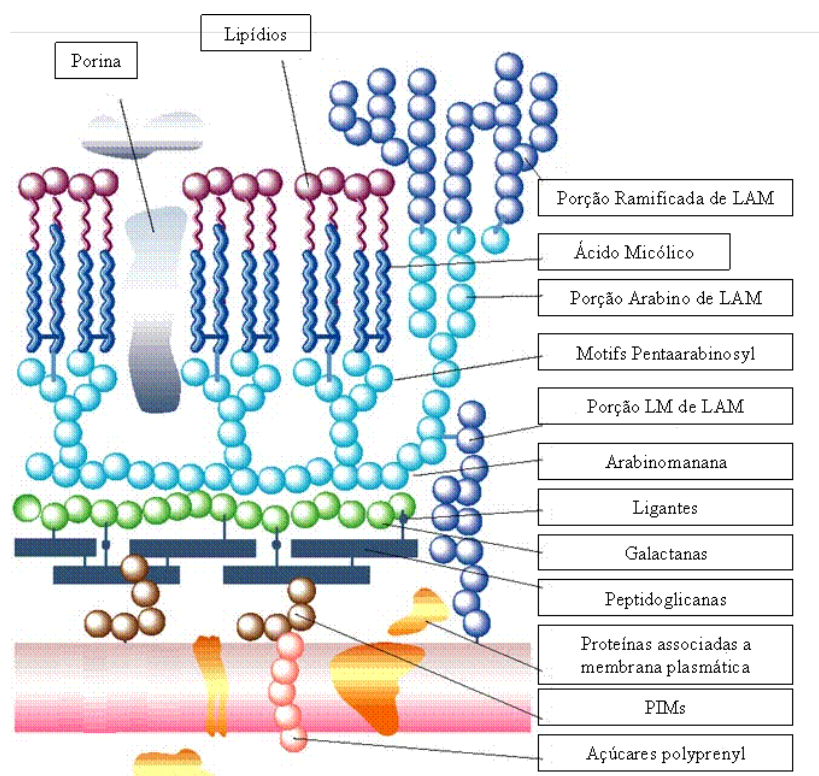


Figura 1. Estrutura da parede celular de micobactérias. Fonte: Adaptado de <http://oregonstate.edu/%7Emahmudt/pictures/Mycobacterium%20cell%20envelope.jpg>.

O complexo *M. avium* (MAC) inclui diversas espécies de micobactérias entre elas *M. avium*, *M. intracellulare*. Estes microrganismos são frequentemente relacionados às complicações da aids, por razões ainda desconhecidas (Ramos et al, 2000).

1.2 Micobactérias Atípicas

Micobactérias, exceto as compreendidas no complexo *M. tuberculosis* e *M. leprae*, tem recebido ao longo do tempo diferentes denominações, em 1899 Moeller lhes chamou de “bacilos pseudotuberculosis”, Borrel e Marmoreck em 1901 lhes chamou de “bacilos paratuberculosos”, posteriormente Pinner em 1932 e Timpe e Runyon em 1954 lhes denominaram de “micobactérias atípicas” (Timpe & Runyon, 1954; Runyon, 1959), Haudoroy em 1955 “micobactérias anormais”, em 1963 Corpe Runyon e Lester “Micobactérias inclassificadas”, em 1963 receberam a denominação inglesa "MOTT" (*mycobacteria other than tuberculosis*) outras micobactérias que não *Mycobacterium tuberculosis*, assim como em 1969 Marks e Selkon as englobam num grupo de “micobactérias oportunistas”, Wolinsky em 1972 lhes chamam de “micobactérias não tuberculosas”, Wayne e Sramek em 1992 “PPEM” (Potentially Pathogenic Enviromental Mycobacteria) Micobactérias ambientais potencialmente patogênicas.

Por questões clínicas, utilizaremos à denominação: Micobactérias atípicas para referirmos a outras micobactérias que não sejam do complexo *M. tuberculosis* ou *M. leprae*, que são consideradas espécies típicas do gênero. Em um exame microscópico todas as micobactérias apresentam a mesma aparência, porém se estudarmos do ponto de vista bacteriológico de maneira mais detalhada com cultivos, provas bioquímicas e provas genéticas, várias difenças podem ser observadas entre micobactérias atípicas e *M. tuberculosis* ou *M. leprae* (Casal & Picazzo, 1999).

1.2.1 *Micobactérias Atípicas como Patógenos Emergentes*

Devido ao aparecimento da aids, uma série de novas espécies de micobactérias passou a atuar como agentes oportunistas. A identificação dessas novas espécies de micobactérias deve-se ao desenvolvimento de sistemas de diagnósticos moleculares que permite o isolamento e identificação de espécies de difícil cultivo (Howard et al, 2002; Taylor & Palmer, 2006).

A infecção cutânea geralmente, é secundária a um trauma cirúrgico, onde o debridamento cirúrgico da área afetada é suficiente para eliminação do agente. As MA são resistentes à maioria dos antibióticos tradicionais e em infecções, recomenda-se o tratamento intravenoso com amicacina e claritromicina via oral durante 4 a 6 meses (McKenna, 2001; Jenkins et al, 2008).

As MA são também classificadas conforme sua capacidade de causar doença no homem como potencialmente patogênicas e raramente patogênicas ou saprófitas (Quadro 1), (Davidson, 1989). As MA potencialmente patogênicas podem causar uma variedade de doenças em humanos e animais que diferem em severidade e importância em saúde pública, podem causar patologias pulmonares, ganglionares, linfadenites, cutâneas e também doenças disseminadas em pacientes portadores do vírus HIV (Barreto et al, 1993; ATS, 1997), assim como infecções pós-cirúrgicas (Freitas et al. 2003; Winthrop et al. 2003).

Quadro 1 - Classificação das espécies de MA de acordo com a patogenicidade

MA POTENCIALMENTE PATOGÊNICAS	MA RARAMENTE PATOGÊNICAS
<p><i>M. abscessus</i> <i>M. asiaticum</i> <i>M. avium</i> <i>M. avium subsp. Paratuberculosis</i> <i>M. celatum</i> <i>M. chelonae</i> <i>M. fortuitum</i> <i>M. genavense</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. immunogenum</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. kansasii</i> <i>M. lentiflavum</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. marinum</i> <i>M. mucogenicum</i> <i>M. peregrinum</i> <i>M. scrofulaceum</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. simiae</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i></p>	<p><i>M. agri</i> <i>M. aurum</i> <i>M. branderi</i> <i>M. chitae</i> <i>M. duvalli</i> <i>M. fallax</i> <i>M. flavescens</i> <i>M. gastri</i> <i>M. gordonae</i> <i>M. hassiacum</i> <i>M. mageritense</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. phlei</i> <i>M. porcinum</i> <i>M. pulveris</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. vaccae</i></p>

Fonte: Leão et al., 2004

1.2.2 Epidemiologia

A incidência de infecções humanas por MA depende principalmente de dois fatores: sua ubiquidade no meio ambiente e do estado imune do hospedeiro. Micobactérias de crescimento rápido, como *M. fortuitum*, *M. chelonae* e *M. abscessus* podem ser encontrados na terra e na água. No entanto, a causa mais comum destas infecções é a transmissão nosocomial. O reservatório da maioria das MA são as torneiras, uma vez que estas

micobactérias resistem à cloração da água e são capazes de crescer mesmo em condições de baixo suprimento nutricional, formando assim um biofilme (Howard & Byrd, 2000). As bactérias contidas nestes biofilmes contaminam a água de lavagem dos equipamentos cirúrgicos que se não forem esterelizados transmitem as micobactérias aos pacientes (Phillips & Von Reyn, 2001).

Surtos hospitalares com MA já ocorreram (Wallace-Jr et al, 1998), nos Estados Unidos da América principalmente nos estados do sul e costeiros, casos foram relatados na Carolina do Norte (Lowry et al, 1988), Louisiana, Geórgia, Flórida e Texas (Wallace-Jr et al 1989) e quase a totalidade dos estados do sul têm relatos de doenças com *M. abscessus* (Hector et al, 1992; Zhang et al, 1997), outros países como: França, Itália, Suécia, Austrália, Bélgica, Suíça, Colômbia, (Villanueva et al, 1997). Japão, Alemanha (Bange et al, 2001), também apresentaram surtos hospitalares com MA devido à transmissão nosocomial destes microrganismos.

No Brasil vários casos de infecções por MA já foram notificados, uma epidemia ocorreu na cidade do Rio de Janeiro envolvendo grandes hospitais, incluindo principalmente cirurgias por videolaparoscopias. Neste caso, foram oficialmente divulgados pela ANVISA 100 casos confirmados em 2007 (Quadro 2). Estas infecções foram associadas ao uso de glutaraldeído para esterelização de instrumentais cirúrgicos de difícil limpeza (Petrini, 2006a).

Em Belém, no estado do Pará, também ocorreram surtos associados a cirurgias por videolaparoscopia, assim como por mesoterapia, onde 311 pacientes foram infectados entre

2004 e 2005. Todos os isolados de micobactérias eram de crescimento rápido e não produziam pigmento, dentre as quais se destacaram *M. bolleti*, *M. abscessus* e *M. massiliense* (Viana-Niero et al, 2008).

Na cidade de Goiânia, no estado de Goiás, também ocorreu um surto associado a procedimentos cirúrgicos por laparoscopia e artroscopia em vários hospitais, onde foram isoladas 18 micobactérias de crescimento rápido. Estas micobactérias, de uma maneira geral, causaram a formação de eritema e edema associados à formação de abscessos localizados, restritos a região do joelho ou do abdômen (Cardoso et al, 2008).

Todos os isolados de micobactérias foram identificados por PCR-PRA e pelo sequenciamento parcial do gene *rpoB* como *Mycobacterium massiliense*. Foi interessante notar que, embora os isolados tenham sido obtidos de pacientes de hospitais diferentes, todos foram geneticamente idênticos (Cardoso et al, 2008).

1.3 *Mycobacterium massiliense*

Recentemente Adékambi et al. (2004) isolaram uma nova espécie de MA em um paciente que apresentava há oito anos hemoptise e bronquiectasia, sem história prévia de tuberculose ou uso de corticóides, e através de técnicas moleculares descobriram que esta espécie apresentava 96% de similaridade com a sequência gênica de *M. abscessus*. Porém investigando as sequências dos genes *hsp65* e *sodA*, demonstraram que esta bactéria diferia

de *M. abscessus* por três a cinco posições de 441 pares de base (pb). Esta nova espécie foi denominada *M. massiliense* (Figura 02).

Quadro 2 – Investigação de Surto por Micobactérias Atípicas no Brasil.

Estados	Casos confirmados (2004)	Casos cumulativos (2007)
SP	14	14
GO	01	37
DF	01	01
PA	69	312
MT	01	02
RJ	0	100

Fonte: Casos de Micobacterioses confirmados e divulgados pela ANVISA. <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>

Mycobacterium massiliense é uma micobactéria de crescimento rápido que não se distingue de *M. abscessus* e *M. chelonae* pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA. Com o seqüenciamento dos genes *rpoB*, *sodA* e *hsp65* Simmon et al, (2007) classificaram a partir de 51 isolados clínicos, originalmente caracterizados como *M. abscessus* quatro isolados que eram *M. massiliense*. Este foi o primeiro relato de isolamento e identificação de *M. massiliense* nos Estados Unidos, sugerindo que *M. massiliense* pode ser mais comumente encontrado, porém erroneamente classificado como *M. abscessus*.

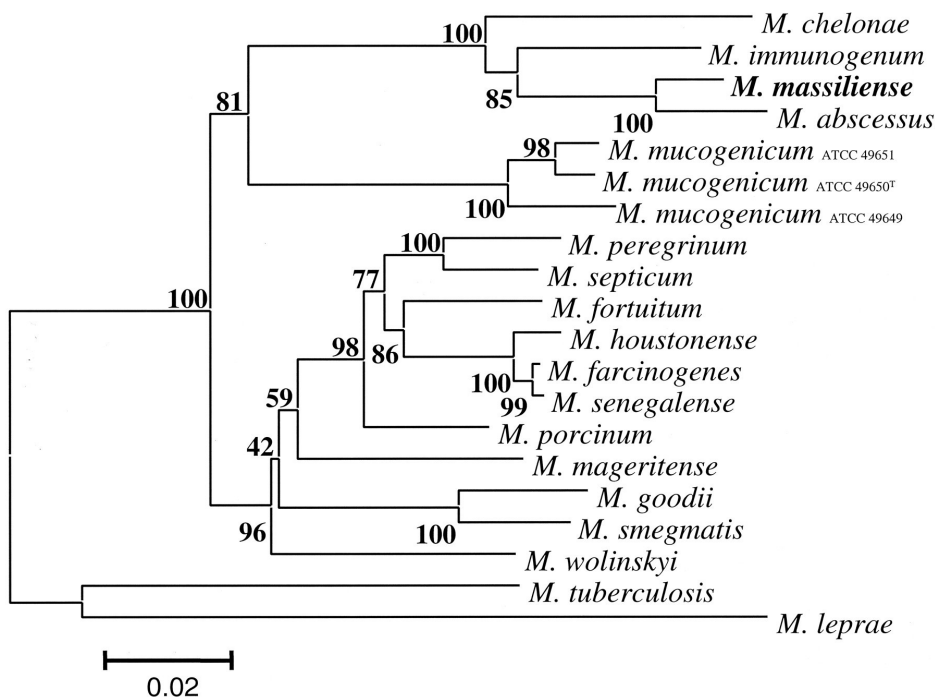


Figura 2. Árvore filogenética do gene *recA* combinado com gene *rpoB* de *M. massiliense* e outras espécies. A barra de escala representa uma diferença de 2% nas seqüências nucleotídicas. Fonte: Adékambi et al, 2004.

1.4 Imunopatologia de micobactérias

Pouco se conhece sobre os mecanismos de patogenicidade de MA, a presença de lipídios parece favorecer a infecção, pela necessidade de uma fonte de triglicérides para o seu crescimento ou talvez como um elemento de proteção frente aos mecanismos de fagocitose do hospedeiro (Brown-Elliot & Wallace, 2002; Brown-Elliot et al, 2002). No entanto, um aspecto característico e que contribui para a virulência do *M. tuberculosis*, por exemplo, é a sua habilidade de crescer dentro de macrófagos (Kawamura, 2008), acredita-se que esse mecanismo possa ser observado em MA devido a várias semelhanças observadas entre as espécies.

De maneira geral, a interação entre a micobactéria e o macrófago é um fator crítico que determina se a infecção por MA irá estabelecer-se no organismo. As micobactérias são patógenos intracelulares facultativos, penetram nos macrófagos e se replicam dentro dos mesmos. Estes microrganismos no interior de fagossomas impedem a acidificação destas vesículas, assim evadindo dos mecanismos microbicidas dos macrófagos (Sturgill-kosycki et al, 1994). Se o microrganismo persiste e se multiplica dentro do macrófago, podem induzir uma resposta imune específica mediada por linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ e células *Natural Killer* (NK) (Thomssen et al, 1995).

Os macrófagos infectados e os linfócitos estimulados produzem fatores solúveis, que incluem quimiocinas e citocinas, que modulam uma complexa resposta imune. Alguns componentes para o controle da infecção são: Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interferon gama (IFN- γ) e Interleucina 12 (IL-12) (Cooper et al, 1993; Cooper et al, 2002). O TNF- α é produzido pelos macrófagos infectados e pelas células NK, sendo provavelmente o componente imunomodulador mais importante para o controle da infecção micobacteriana. Em contraste, a IL-4 e IL-10 modulam negativamente a resposta inflamatória, em especial o efeito do TNF- α , e desta forma são fatores permissivos para a proliferação intracelular micobacteriana (Sturgill-kosycki et al, 1994; Flynn and Chan, 2001).

A parede celular de micobactérias é formada basicamente por 85% de glicopeptideolipídeos (GLPs) (Etienne et al, 2002), e estes GLPs estão relacionados com a

morfologia da colônia (Barrow & Brennan, 1982; Belisle et al, 1993). Catherinot et al (2007) analisou a virulência de duas cepas de *M. abscessus*, uma com morfologia de colônia lisa e outra com colônia rugosa em camundongos C57BL/6. Estes autores mostraram que a morfologia da colônia relaciona-se diretamente com a virulência. Colônias de bactérias rugosas apresentaram maior letalidade com maior produção de TNF- α quando comparadas com colônias lisas de bactérias. A bactéria de colônia lisa apresenta grande quantidade de GLPs na parede celular. Existe uma associação direta entre a quantidade de GLP e a formação de biofilme e de fator corda. Quanto maior a expressão de GLP maior a capacidade para formar biofilmes que se contrapõe a formação de fator corda. O fator corda correlaciona-se diretamente com a virulência de micobactérias, pois *M. abscessus* pode alternar a morfologia de sua colônia entre lisa e rugosa que permite a transição para um fenótipo mais virulento e invasivo (Howard et al, 2006).

No fagossoma, a micobactéria executa vários processos a fim de impedir a fusão fago-lisossoma, dentre eles destaca-se a retenção da molécula denominada TACO (do inglês *Tryptophane-aspartate-containing coat protein*) e o sequestro de íons de Ferro, por moléculas especializadas em sua captação como o receptor de transferrina, pois tal íon é essencial para sobrevivência intracelular do bacilo (Anand and Kaul, 2005). Estes processos também são corroborados pela inibição da acidificação fagossomal, devido à ligação das lipoarabinomananas à proteínas de superfície do lisossoma que suprimem o sinal de fusão entre o lisossoma e o fagossoma (Fratti et al, 2003), pelo impedimento da bomba de próton dependente de adenosina trifosfato vacuolar (V-H⁺ ATPase) transportar

íons hidrogênio para o meio intrafagossomal (Kaufmann, 2001; Pollock et al, 2001; Sturgill-kosycki et al, 1994).

Outros fatores de virulência são: a resistência aos constituintes inibitórios do soro, a diminuição da produção de TNF- α pelas células infectadas do hospedeiro, diminuição da expressão de receptores celulares para IFN- γ e a produção de receptores para união com os macrófagos (Cooper et al, 1993; Falkinham, 1996; Flynn and Chan, 2001; Cooper et al, 2002).

1.5 Resposta imune

Ainda não foi elucidado como as micobactérias atípicas desencadeiam uma resposta imune no hospedeiro, porém acredita-se que o mecanismo de defesa seja semelhante ao estabelecido para *Mycobacterium tuberculosis*.

O desenvolvimento da infecção pela micobactéria depende do seu encontro inicial com as células do hospedeiro, macrófagos e células dendríticas. E esta interação ocorre por meio dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares, tais como receptores do sistema complemento (CR1, CR2, CR3, CR4), receptores de manose, CD14 (Ernest, 1998) e receptores do tipo Toll (do inglês “Toll Like Receptors”) expressos na superfície celular, com os padrões moleculares associados aos patógenos, PAMPs (do inglês “Pathogen Associated Molecular Pattern”) expressos na superfície de micobactérias (Abel et al, 2002; Kaufmann & Shaible, 2003; Drennan et al, 2004; Flynn et al, 2005). Outra via alternativa de

infecção, é via lectina presente na superfície de células dendríticas, CD209, que se liga à lipoarabinomanana da micobactérias (Herrmann & Lagrange, 2005).

Considera-se que a proteção contra micobactéria provém preferencialmente de uma resposta imune celular, com interações entre células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T (Kaufmann, 2001). Na resposta imune celular, os linfócitos T secretam citocinas que ativam macrófagos para eliminação de micobactérias (Stabel, 2000). Os macrófagos apresentam antígenos de micobactérias para os linfócitos T, que liberam IL-2. Esta interleucina estimula a proliferação de linfócitos TCD8⁺ citolíticos e linfócitos T CD4⁺ Th1 (Chiodini & Davis, 1992), e estes últimos, liberam mais IL-2, TNF- α , IFN- γ e Fator de Crescimento de Colônias de Granulócitos de Monócitos (GM-SCF), com o objetivo de ativar e aumentar o poder bactericida dos macrófagos (Kaufmann, 1995; Stabel, 1995; Lee et al, 2001; Zur et al, 2003).

A IL-12 é uma citocina secretada precocemente, sendo produzida principalmente pelos monócitos, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas. Estruturalmente, a IL-12 se encontra constituída por duas subunidades, a p35 e a p40 que se unem covalentemente para formar a molécula biologicamente ativa p70. Sua produção é induzida por algumas citocinas como IFN- γ , TNF- α e GM-CSF, enquanto que IL-10, IL-4 e TGF- β têm um efeito antagonista sobre as células que produzem estas citocinas (Cooper et al, 1993; Flynn et al, 1993; Salgame, 2005).

A produção de IL-12 ocorre logo após a fagocitose da micobactéria por macrófago ou células dendríticas. A IL-12 tem um papel importante no controle da infecção, pois favorece uma resposta imune celular contra micobactérias tendo funções importantes como: 1) induzir a produção de IFN- γ , pelos linfócitos T CD4, CD8 e NK (Fenton et al, 1997); 2) induzir a proliferação de linfócitos T CD4; 3) favorecer a expansão clonal de células Th1 e 4) aumentar a citotoxicidade dos linfócitos CD8 e das células NK (Trinchieri 1995; Sano et al, 1999; Xing & Santosuosso, 2000). Além desses efeitos, a IL-12 ativa células do sistema imune inato, mais diretamente as células NK que aumentam a secreção de IFN- γ (Maheshwari et al, 2002; Junqueira-Kipnis et al, 2003).

A produção de TNF- α por macrófagos, células dendríticas e linfócitos são importantes para a modulação da migração celular, influenciando a expressão de moléculas de adesão e quimiocinas, contribuindo para a contenção da infecção induzindo entre outras coisas a formação de granuloma, bem como aumentando o poder microbicida dos macrófagos para eliminação das micobactérias intracelulares (Flynn et al, 1995; Rook et al, 2005). Sendo que uma falha na produção de TNF- α , incluindo baixas de intermediários do nitrogênio, aumenta a susceptibilidade a infecções micobacterianas (Flynn et al, 1995).

O IFN- γ produzido por diferentes populações de linfócitos T e células NK interage com seu receptor, IFN- γ R, expresso na membrana dos macrófagos. O receptor do IFN- γ é formado por uma cadeia α e uma cadeia β (IFN- γ R1 e IFN- γ R2 respectivamente) e são responsáveis em iniciar os sinais intracelulares, o qual disparará a expressão de genes envolvidos na ativação dos mecanismos bactericidas das células fagocíticas. O IFN- γ induz

à produção de intermediários do oxigênio; intermediários do nitrogênio; a acidificação do fagossoma e a fusão do fago-lisossoma; a expressão de iNOS2; a redução de ferro intracelular para limitar o desenvolvimento da micobactéria através da desregulação do receptor para transferrina; o aumento das moléculas MHC I e II envolvidas na apresentação de antígenos; e o aumento da capacidade de fagocitar, além de induzir a produção de IL-12 (Boehm, 1997; Flynn & Chan, 2001).

Um dos mecanismos de citotoxicidade de macrófagos mediados por IFN- γ e TNF- α é a produção de Óxido Nítrico (NO) (Witte & Barbul, 2002). O NO é um radical livre, sintetizado a partir do grupo guanidino da L-arginina por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) (Maretta, 1993). Estas existem em três isoformas: duas constitutivas (endotelial e neuronal, eNOS e nNOS respectivamente) e uma induzida (iNOS). Esta última se expressa em macrófagos e em células ativadas por citocinas. O NO tem função microbicida, de inibição de agregação plaquetária e de favorecer adesão leucocitária dentre outros (Moncada et al, 1991; Marietta 1994).

O NO resultante da ativação de iNOS possui ação citotóxica e citostática levando a morte de microrganismos. Esta citotoxicidade resulta da sua ação direta ou reação com outros compostos químicos liberados durante o processo inflamatório. Tais como: íons superóxidos (O_2^-), formando um agente altamente tóxico e oxidante o peroxinitrito ($ONOO^-$), que pode ser protonado a ácido peroxinitroso ($ONOOH$) dissociando-se posteriormente em dióxido de nitrogênio (NO_2) e radical hidroxila e íon NO_2^+ , aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O_2^- (Beckman & Koppenol, 1996).

Está bem estabelecido que o NO resultante da eNOS tem um papel importante na proteção do vaso sanguíneo, sendo associado à manutenção do tônus vascular pela liberação de pequenas quantidades de NO sempre que há aumento do atrito entre as células circulantes no vaso sanguíneo, resultando numa discreta vasodilatação (Wennmalm, 1994). Além disso, a pressão sanguínea contribui para regular a liberação de NO em condições fisiológicas, pois a inibição de NO resulta no aumento da pressão arterial (Nava & Luscher, 1995).

Outras populações celulares também estão envolvidas na resposta imune contra micobactérias como linfócitos $T\gamma\delta$ (Thomssen et al, 1995) e células NKT reconhecedoras de antígenos lipídicos apresentados por moléculas CD1 (T CD1 restritas), todas elas secretam IFN- γ e possuem atividades citotóxicas (MacGregor et al, 1998). Acredita-se que as células $TCD4^+$, $CD8^+$, $T\gamma\delta$ e células NKT sejam as principais responsáveis pela proteção contra micobactérias, pois quando ativadas secretam IFN- γ o qual tem papel fundamental na ativação de macrófagos, que são descritas como as principais células efetoras da resposta imune contra micobactérias (Holland 1995; Dorman & Holland 1998; Liu 2003).

Durante infecções micobacterianas são ativadas populações celulares: IFN- γ e IL-17 positivas. Enquanto os linfócitos T IFN- γ^+ atuam na ativação do macrófago e na formação do granuloma, as células IL-17 $^+$ regulam as atividades dos mesmos, além de induzir a migração de neutrófilos. Foi demonstrado nas infecções micobacterianas, que tanto em humanos quanto em camundongos, as principais células produtoras de IL-17 são linfócitos $T\gamma\delta$ (Cruz et al, 2006; Lockhart et al, 2006; Peng et al, 2008). As células IL-17 $^+$ atuam

principalmente induzindo a produção de: CXCL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF (Jovanovic et al, 1998; Shwarzenberger et al, 2000).

Depois de ativados, os neutrófilos fagocitam as micobactérias que, assim como nos macrófagos, as micobactérias podem inibir a fusão do fagossoma com o lisossoma (Neufert et al, 2001). Mesmo não sendo capazes de formar o fagolisossoma, os neutrófilos são capazes de produzir e liberar moléculas bactericidas no sítio da infecção (Sharma et al, 2000), promovendo assim a morte das micobactérias (Kisich et al, 2002). Algumas destas moléculas bactericidas podem ser os peptídeos secretados por neutrófilos, por exemplo: α -defensinas (HPNs) 1-3, catelicidinas e um terceiro peptídeo lipocalina dois, que se liga aos siderofóros micobacterianos solúveis impedindo a captação de ferro pela bactéria (Kasahara et al, 1998; Martineau et al, 2007).

Os linfócitos CD4⁺ Th2 numa fase crônica de infecção por *M. tuberculosis* produzem citocinas (IL-4, IL-10 entre outras) que ativam a resposta imune humoral, com o aumento de linfócitos B (LB) e a produção de anticorpos estabelecendo assim uma resposta humoral (Burrells et al, 1999; Ostrowski et al 2003; Langelaar et al, 2005).

Com relação à resposta imune induzida por MA em camundongos, Ordway et al (2008) demonstraram que a resposta imune do camundongo C57BL/6 está relacionada à via de inoculação e quantidade de bactéria, e que as células T CD4⁺, T CD8⁺ e células NK são importantes populações celulares no controle da infecção com *M. abscessus*. Os autores demonstraram que camundongos C57BL/6 e com deficiência de leptina, infectados com

baixa dose de *M. abscessus*, via aerossol não desenvolviam infecção. No entanto, quando desafiados com alta dose de *M. abscessus*, via aerossol camundongos C57BL/6 e com deficiência de leptina desenvolviam infecção, que envolvia o influxo de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ para os pulmões, embora a eliminação da bactéria fosse mais demorada nos camundongos deficientes em leptina. Mostraram ainda que, em contraste, aos camundongos C57BL/6 e com deficiência de leptina, camundongos IFN- γ "knockout" desafiados com baixa e alta dose de bactéria desenvolviam infecção pulmonar progressiva, apesar de um alto influxo de células T, macrófagos e células dendríticas. E quando camundongos IFN- γ "knockout" eram desafiados com alta dose de bactéria surgiam nos pulmões células TCD4⁺ produzindo IL-10 e IL-4.

Para o nosso conhecimento não existe na literatura, trabalhos que descrevam a resposta imune induzida na infecção por *Mycobacterium massiliense*.

2 – Justificativa

Conforme demonstrado a resposta imune a infecções micobacterianas envolve vários aspectos inerentes tanto ao microrganismo quanto ao hospedeiro. No caso de micobactérias atípicas a infecção humana ocorre principalmente em indivíduos imunocomprometidos. O surto ocorrido na Cidade de Goiânia envolveu indivíduos saudáveis, que após cirurgias apresentaram lesões com presença de abscesso decorrentes de infecção por *Mycobacterium massiliense*. Então, diante destes fatos, justifica-se avaliar a patogenicidade de um isolado clínico, para analisar a virulência do microrganismo e sua capacidade de infectar um hospedeiro imunocompetente.

3 – Objetivos

3.1 Objetivo Geral:

- Avaliar a resposta imunológica aguda de camundongos C57BL/6 e BALB/c após infecção com *M. massiliense* por via intravenosa.

3.2 Objetivos Específicos:

- Analisar a virulência de *M. massiliense* em modelos murinos através da contagem de unidades formadoras de colônias do baço de animais infectados;
- Quantificar os anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para antígenos de *M. massiliense* no soro de animais infectados;
- Determinar os níveis de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias produzidas pelas células do baço após infecção com *M. massiliense*;
- Avaliar a produção de óxido nítrico produzidos por macrófagos peritoneais infectados “*in vitro*” com *M. massiliense*.

4 – Material e Métodos

4.1 Animais e divisão dos grupos experimentais

O estudo foi realizado em camundongos C57BL/6 e BALB/c, proveniente do biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG, divididos em grupos de cinco em gaiolas com água e dieta *ad libitum*. Grupo I (n=20) camundongos C57BL/6 . Grupo II (n=20) camundongos BALB/c, fêmeas, com idade entre 4-8 semanas. Os resultados representam três experimentos independentes.

4.2 Isolados de Micobactérias atípicas.

Foram caracterizados 18 isolados clínicos de infecções pós-cirúrgicas, recebidas pelo LACEN-GO, de diferentes laboratórios e hospitais, entre Maio e Dezembro de 2006, na cidade de Goiânia-Go. Estes isolados clínicos foram caracterizados como sendo micobactérias de crescimento rápido e identificados como sendo *M. abscessus*. Através de estudos moleculares, inclusive com o seqüenciamento parcial do gene *rpoB*, concluiu-se que os isolados pertenciam a um único clone que foram identificados como *M. massiliense* (Figura 03); (Cardoso et al, 2008).

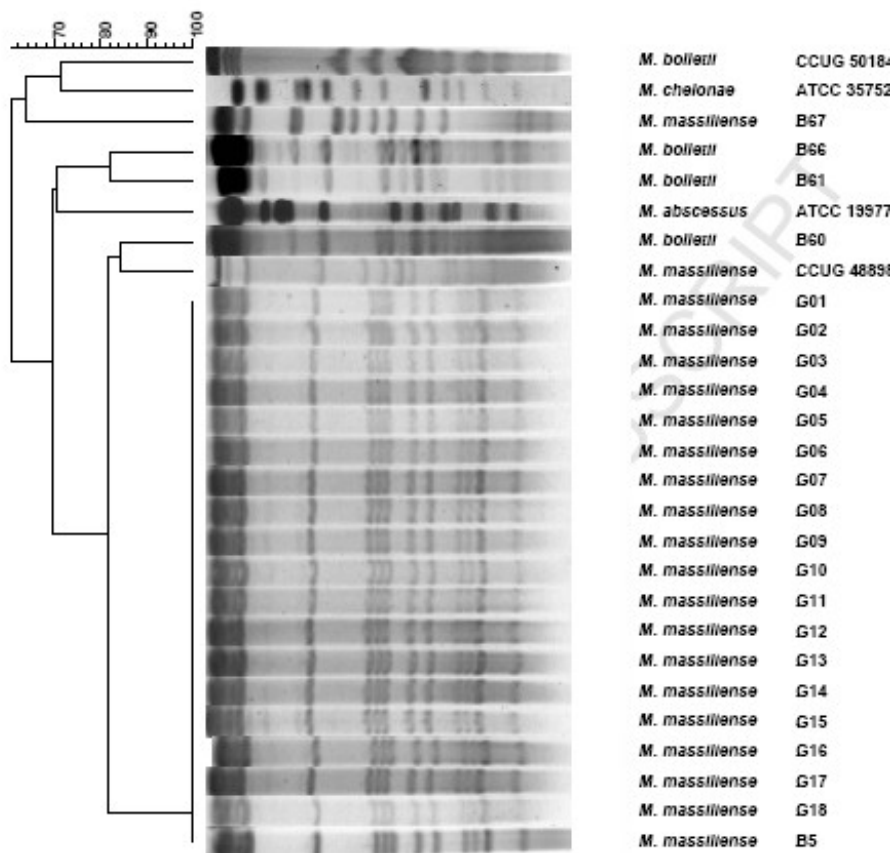


Figura 03. Genotipagem dos isolados clínicos por PFGE. Fonte: Cardoso et al, 2008.

Para avaliar a resposta imunológica de camundongos C57BL/6 e BALB/c foi escolhida aleatoriamente uma amostra dos 18 isolados clínicos, a qual foi utilizada para realização de todos os experimentos. A utilização do isolado clínico mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido, conforme aprovado pelo CEP HC/UFG.

4.3 Preparação do bacilo para inoculação em animais de laboratório.

A cepa foi cultivada em meio 7H11 enriquecido com OADC e incubada por três a quatro dias em estufa a 37°C. Após o crescimento bacteriano a cultura foi coletada e ressuspensa em 5 ml de solução salina 0,9% estéril e sonicada por 3 minutos. Após sedimentação para remoção dos grumos, a suspensão foi agitada vigorosamente, e sua concentração foi ajustada para uma densidade óptica (OD) de 0,20 em comprimento de onda de 625nm. Para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC), alíquotas de 100 µl foram plaqueadas no final da preparação em meio 7H11 enriquecido com OADC e contadas após 7 dias de crescimento.

4.4 – Inoculação dos animais.

Um inóculo correspondendo a 2×10^6 bactérias em salina estéril foi utilizado. Camundongos da linhagem C57BL/6 e BALB/c, durante os procedimentos para inoculação de 100µL de suspensão de bactérias por via venosa ou intraperitoneal, foram manejados e contidos de acordo com as orientações da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). Após a inoculação, alíquotas de 100µL das suspensões bacterianas foram plaqueadas em meio sólido 7H11 enriquecido com OADC para a confirmação da UFC.

4.5 Determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

Animais infectados foram sacrificados de acordo com os pontos experimentais e tiveram seus baços retirados e colocados em tubos contendo 2 mL de solução salina 0,9% estéril. Para obter uma suspensão celular, o baço foi transferido para um homogeneizador e macerado. A partir desta suspensão celular foram feitas diluições em salina 0,9% estéril de 10, 100, 1000 e 10000 vezes. Uma alíquota de 100 μ L de cada diluição foi plaqueada em meio sólido 7H11 enriquecido com OADC. As placas foram vedadas e incubadas a 37°C por 7 dias. Após o período de incubação as colônias foram contadas e as UFCs expressas em Log₁₀ do Baço, foram determinadas após correção com as diluições e volumes semeados.

4.6 Obtenção de Soro e sobrenadante celular.

Amostras de soro foram obtidas por punção retro-orbital, 14 dias após a infecção. As amostras foram incubadas por uma hora a 37°C e centrifugadas a 1200 xg, a 4°C por 15 minutos para retração do coágulo e separação do soro, e posteriormente armazenadas a menos 20°C. Os níveis de anticorpos anti-proteínas de *M. massiliense* (IgG2a e IgG1) foram determinados através da técnica de ELISA.

4.7 Ensaio Imunoenzimático (ELISA).

4.7.1 Obtenção de extrato protéico de *M. massiliense*.

As cepas foram inoculadas em 10 mL de caldo Muller-Hinton e após incubação por três a quatro dias em incubadora a 37°C com agitação, foram centrifugadas por 15 minutos a 1200 xg a 4°C. Após desprezar o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 5 mL de solução salina 0,9% estéril. Para obtenção do extrato protéico a suspensão bacteriana foi sonicada por 20 minutos seguidos de 3 minutos de incubação em gelo, foram realizados 20 ciclos, em seguida a suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 3000 xg a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em peneira de nylon 0,22 µm (Millipore®). A concentração protéica foi determinada pelo método de Bradford (Pierce BSA Protein Assay Kit) e armazenadas a -20°C.

4.7.2 Dosagem de Anticorpos

Placas de poliestireno (Nunc) de 96 poços foram inicialmente sensibilizadas com proteínas totais de *M. massiliense* (5 µg/mL) diluída em tampão carbonato / bicarbonato de sódio 0,05M (pH 9,6), e incubadas a 4°C por 16 horas. Posteriormente a placa foi lavada e incubada por uma hora a 37°C com tampão carbonato de sódio (PBS) 1X contendo 1% gelatina. A essa etapa seguiu-se a adição das amostras, incubando-se por 1 hora a 37°C. Os anticorpos conjugados à biotina, diluídos a 1:5000, foram adicionados: anti-IgG1 e anti-IgG2a de camundongo (Pharmingen). As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Foi

adicionada estreptoavidina peroxidase, diluída a 1:1000 foi adicionada e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a 37°C. A reação foi então revelada com o substrato orto-fenilenodiamina (OPD) e bloqueada adicionando-se ácido sulfúrico a 4N. A leitura da absorvância foi realiza em 492 nm em leitor de ELISA (Multiskan Thermo Labsystems®). Entre cada uma das etapas, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS 1X Tween 20-0,05%.

4.8 Obtenção de RNA total

Ácidos ribonucléicos (RNA) do baço foram obtidos utilizando reagente TRIZOL®. Foi usado 1 mL de TRIZOL® para cada 300 µg de tecido. As amostras de tecido foram colocadas diretamente no TRIZOL® e armazenadas a – 70°C. Para proceder à extração do RNA total as amostras foram descongeladas e maceradas com nitrogênio para lise celular. Então foram homogeneizadas incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (TA) para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas.

Adicionou-se 200 µL de clorofórmio para cada mL de TRIZOL® e o material foi agitado vigorosamente por 15 segundos e incubados por 10 minutos a TA. As amostras foram centrifugadas a 11000 xg, a 4°C durante 10 minutos. Após a centrifugação a fase aquosa foi cuidadosamente recuperada, transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição de 500 µL de isopropanol. Após 10 minutos a -20°C, o material foi centrifugado a 11000 xg, a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi removido e 1 mL

de etanol a 70% gelado foi adicionado ao sedimento. A amostra foi homogeneizada e centrifugada a 7500 xg, a 4°C durante 5 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 30 µL de água milli-Q livre de RNase e DNase.

4.8.1 Quantificação de RNA total

As amostras de RNA total obtidas foram diluídas 250 vezes em água Milli-Q e analisadas por espectrofotometria para quantificação e determinação da razão RNA/proteína ($r=A_{260}/A_{280}$).

4.9 Síntese de cDNA pelo método de transcrição reversa.

A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do volume de 10µl (2µg aprox.) do RNA total foi realizada pelo método de transcrição reversa (RT) utilizando a enzima transcriptase reversa. A reação foi feita em volume final de 20µl na presença dos seguintes reagentes: 0,8µl de dNTP mix 100nM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP), 2µl de tampão de reação 10x (Tris-HCl 100nM, KCl 150mM e MgCl 6mM), 2µl do *oligonucleotídeo iniciador* randômico Oligo dT, 1µl da enzima transcriptase reversa MultiScrib™ 50U/µl (Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription – Applied Biosystems) e 10µl de RNA_{total}. A amostra foi homogeneizada por pipetagem, evitando a formação de bolhas.

A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador com as seguintes etapas: ativação 25°C, 10 min; síntese, 37°C, 120 min; inativação, 85°C, 5 seg; resfriamento, 4°C, ∞. Após a reação de transcrição reversa, as amostras de cDNA foram conservadas a -20°C até o uso.

4.10 Ensaio de expressão gênica através da reação de polimerase em cadeia em tempo real

Na tabela 01 encontram-se os oligonucleotídeo iniciador para as citocinas IL-12, IL-17, TNF- α , iNOS, IFN- γ , IL-10, IL-4 e TGF- β utilizados na reação de polimerase em cadeia quantitativo em Tempo Real (qRT_PCR).

Foi feita padronização prévia dos oligonucleotídeo iniciador, utilizando ensaios como Curva de Diluição do Oligonucleotídeo iniciador, para conhecer a concentração ideal de reação de cada oligonucleotídeo iniciador com cDNA em uma concentração fixa, e Eficiência do Oligonucleotídeo iniciador, a fim de avaliar a eficiência da amplificação do cDNA em diferentes concentrações.

Para iniciar a PCR foi preparado um *Master Mix* contendo, a Taq DNA polimerase, tampão de reação, dNTP *mix*, *SYBR Green I dye* e MgCl₂. Para o preparo do *Mix* para a reação foram adicionados no capilar de vidro: 5 μ l de H₂O RNase free, 1 μ l de cada oligonucleotídeo iniciador (*sense e antisense*), 2 μ l do *Master Mix* e 1 μ l de cDNA (na

concentração de 360ng de cDNA_{total}). O capilar, então, foi fechado e centrifugado, a fim de concentrar a solução da amostra no fundo da coluna de vidro. Estes procedimentos foram realizados em gelo.

O programa empregado para a amplificação iniciava com uma incubação por 10min a 95°C, seguidos de 40 ciclos de incubação para desnaturação por 10 seg a 95°C, anelamento com temperatura 5°C abaixo da temperatura de desnaturação característico de cada *oligonucleotídeo* iniciador (tabela 01) e extensão a 72°C, com o tempo de extensão baseado na equação $T_e = [(C+G) \times 4s] / 25$. A fluorescência do reagente “SYBR Green” emitida à medida que a polimerização do cDNA específico era realizada, foi capturada empregando o aparelho LightCycler 1.0 (ROCHE). A especificidade da amplificação foi determinada através da análise das curvas de amplificação e dissociação na altura do *crossing point* (Cp), geradas pelo próprio programa. O cálculo da expressão relativa dos produtos amplificados para cada gene foi realizada empregando o gene da β -actina como gene referencial (gene de expressão constitutiva: β -actina), através do método do $\text{Ratio} = E_{\text{target}}^{\Delta CP} / E_{\text{ref}}^{\Delta CP}$ (Pfaffl, 2001; Pfaffl et al, 2002). As seqüências dos oligonucleotídeo iniciador desenhados e as características do amplicon estão detalhadas na Tabela 1.

Tabela 1. Genes analisados por qRT-PCR. A tabela mostra a seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados.

Gene	GeneBank	Seqüência Oligonucleotídeo iniciador	T [°] A	T _m [°]	Te [°]	Pb
β-actina	095208	S: GACGGCCAGGTCATCACTAT AS: ATGCCACAGGATTCCATAACC	54	59	3	92
IL12	008351	S: CCACTGGAACACTACACAAGAACG AS: GCACAGGGTCATCATCAAAG	55	59	4	11 1
IL17	43088	S: AACATGAGTCCAGGGAGAGC AS: GCTGAGCTTTGAGGGATGAT	54	59	4	10 4
TNF-α	013693	S: ATGGCCTCCCTCTCATCAGT AS: CACTTGGTGGTTTGCTACGA	54	59	4	10 7
iNOS	010927	S: TCAAGTGGCATAGATGTGGAAG AS: TGGGTCCCTCTGGTCAAACCTC	54	59	4	10 1
IFN-γ	1809553	S: CAAGTGGCATAGATGTGGAAG AS: TGGCTCTGCAGGATTTTCAT	55	60	3	92
IL10	010548	S: TCAGCCAGGTGAAGACTTTCT AS: TCATTTCCGATAAGGCTTGG	54	59	4	11 7
IL4	021283	S: GCAACGAAGAACCACACAGA AS: CTGCAGCTCCATGAGAACAC	54	59	5	12 6
TGF-β	011577	S: GCTGAACCAAGGAGACGGAAT AS: GCTGATCCCGTTGATTTCCA	53	58	4	10 0

G.I.=número de acesso ao “GeneBank”; S=”oligonucleotídeo iniciador” senso 5’-3’; AS:”oligonucleotídeo iniciador” antisenso 5’-3’; T[°]A=Temperatura da anelamento da reação; T_m=Temperatura melting; Te=Tempo de extensão; Pb=Tamanho do amplicon em pares de bases.

4.11 Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.

Os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, e feito uma anti-sepsia do camundongo com álcool 70%. Os procedimentos seguintes foram

realizados em câmara de fluxo laminar. Para obtenção dos macrófagos dos camundongos, utilizou-se seringa e agulha descartáveis e esterilizadas, introduziu-se na cavidade abdominal 5,0ml de solução salina 0,9% estéril e gelada. Após massagem da cavidade abdominal, o conteúdo foi recuperado com seringa e agulha, e transferido para tubo de centrífuga, esterilizado, com capacidade para 15 ml. O lavado peritoneal de cada animal, foi centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Após o desprezo do sobrenadante, 1 mL de solução de lise de hemácias com cloreto de amônio (NH₄Cl) + Bicarbonato de potássio (KHCO₃) foi acrescentada e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, completou-se o volume para 10 mL com solução salina 0,9% estéril feita nova homogeneização e centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI-1640 (Sigma, St. Louis, USA), contendo 100U/ml de penicilina (Sigma), 100 µg/ ml de estreptomicina (Sigma), 2µg de L-glutamina (Sigma) e 5,0% de soro fetal bovino A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer, para obtenção de uma concentração de 1x10⁶ células/mL.

4.12 Cultura de macrófagos

Alíquotas de 100µl da suspensão contendo as células na concentração de 1x10⁶ células/mL foram colocadas em placa de cultura de tecido estéreis com 96 poços (Corning, New York 14831, USA) fez-se incubação por 2 horas, a 37°C, em 5% de CO₂, retirou 90µl do sobrenadante, adicionando imediatamente 90µl de meio RPMI completo. Em seguida adicionou-se 100 µl de solução de bactérias contendo 1x10⁶ bacilos viáveis à placa de cultura e incubou-se por 48 horas, a 37°C, em 5% de CO₂.

4.13 Dosagem de Óxido Nítrico.

Após estimulação dos macrófagos com *M. massiliense* por 48hs, 50µl do sobrenadante da cultura de células foram removidos e colocados em outra placa de 96 poços (Corning, New York 14831, USA), para quantificação do produto de oxidação estável do óxido nítrico o nitrito. A concentração de nitrito (NO_2^-) foi mensurada pelo método colorimétrico de Griess (Green et al, 1982), por comparação com uma curva padrão contendo diluições seriadas de solução de nitrato de sódio (NaNO_2) em duplicatas de 50 µL em placa de 96 poços (Corning, New York 14831, USA). A revelação foi feita através da adição de solução de Greiss (1:1) contendo 50 µL sulfanilamida a 1% e 50 µL N.naftil-etilenodiamina a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%. Após dez minutos à temperatura ambiente, procedeu-se à determinação da concentração de óxido nítrico utilizando um leitor ELISA (Multiskan Thermo Labsystems®) automático com um filtro de 595 nanômetros.

4.14 Análise Estatística

Nos casos com distribuição normal foram utilizados testes paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste "t" de Student. Nos outros casos foram utilizados testes não-paramétricos, na comparação entre dois grupos, o teste de Mann-Whitney.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando a probabilidade de rejeição da hipótese de nulidade foi menor que 5%.

5 – RESULTADOS

5.1 Avaliação da virulência em camundongos.

Inicialmente foi analisada a virulência, comparando diferentes vias de inoculação, através da recuperação de bactérias viáveis a partir dos baços de camundongos C57BL/6. Os resultados expressos na Figura 04 mostram as unidades formadoras de colônia de bactérias recuperadas do baço, comparando-se a via intraperitoneal (I.P.) e a via intravenosa (I.V.). A carga bacteriana foi de $4,75 \pm 0,09 \text{ Log}_{10}$ quando inoculada por I.V. e de $3,01 \pm 0,04 \text{ Log}_{10}$ quando inoculado I.P após um dia de infecção. A partir do 3º dia a UFC em ambas as vias de inoculação foram decrescendo regularmente até o 14º dia ($3,38 \pm 0,03 \text{ Log}_{10}$ por via I.V. e $2,24 \pm 0,1 \text{ Log}_{10}$ por via I.P). Em todos os pontos experimentais a via intravenosa apresentou maior número de UFCs ($p < 0,05$).

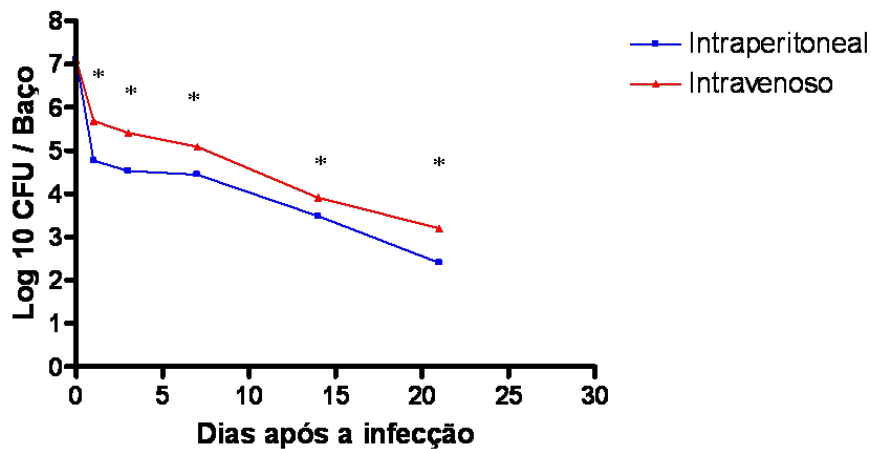


Figura 4. Determinação de unidades formadoras de colônias do baço de camundongos C57BL/6 após 1, 3, 7, 14 e 21 dias de inoculação via intraperitoneal e intravenosa com 10^6 bacilos viáveis de *M. massiliense*. * $p < 0,05$.

Utilizando a via intravenosa para comparar a virulência de *Mycobacterium massiliense* em camundongos BALB/c e C57BL/6, as unidades formadoras de colônias foram determinadas no baço. Após um dia de infecção, os baços apresentaram respectivamente: $5,74 \pm 0,01$ e $5,61 \pm 0,01 \text{ Log}_{10}$, para BALB/c e para C57BL/6. No 3º dia foram recuperados no baço $5,65 \pm 0,01 \text{ Log}_{10}$ em camundongos BALB/c e $5,53 \pm 0,005 \text{ Log}_{10}$ em camundongos C57BL/6. No 7º dia foram recuperados no baço $5,80 \pm 0,005 \text{ Log}_{10}$ em camundongos BALB/c e $5,61 \pm 0,0 \text{ Log}_{10}$ em camundongos C57BL/6. No 14º dia foram recuperados no baço $4,78 \pm 0,02 \text{ Log}_{10}$ em camundongos BALB/c e $4,39 \pm 0,01 \text{ Log}_{10}$ em camundongos C57BL/6. Com 30 dias após a infecção os baços apresentaram respectivamente: $0,5 \pm 0,02 \text{ Log}_{10}$ em camundongos BALB/c e $0,3 \pm 0,01 \text{ Log}_{10}$ em camundongos C57BL/6. Os camundongos BALB/c apresentaram durante o período estudado maior número de bactérias viáveis no baço do que os camundongos C57BL/6 ($p < 0,05$).

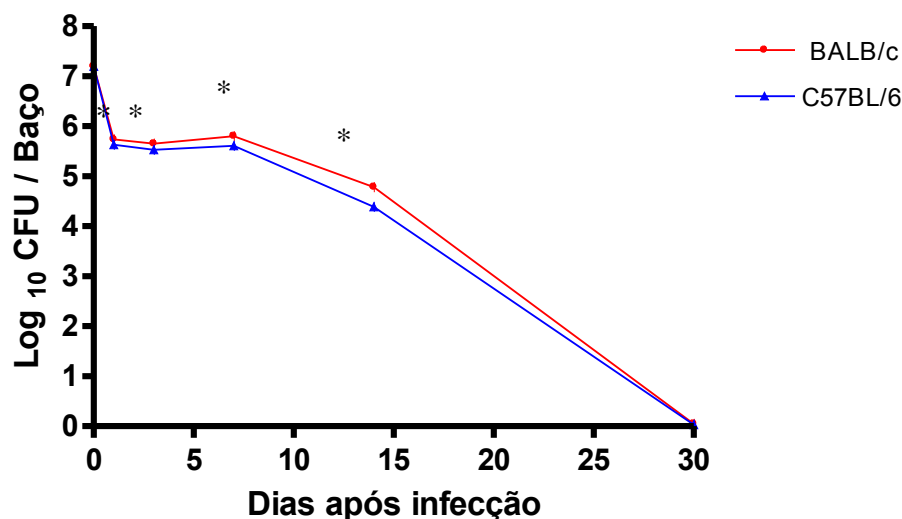


Figura 5. Determinação de unidades formadoras de colônias do baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c após 1, 3, 7, 14 e 30 dias de inoculação via intravenosa com 10^6 bacilos viáveis do isolado clínico dois de *M. massilienses*. * $p < 0,05$

5.2 Avaliação da resposta imune específica.

A resposta imune humoral foi caracterizada avaliando-se os níveis séricos de imunoglobulinas IgG1 e IgG2a específicas para o extrato protéico de micobactérias atípicas. Os níveis de IgG1 em camundongos BALB/c foram maiores que nos camundongos C57BL/6 após quatorze dias de infecção (OD=1,394±0,01; e OD=0,693±0,008, respectivamente, p=0,001). As duas linhagens de camundongos apresentaram níveis séricos tanto de IgG1 e de IgG2a maiores que o controle (0,072±0,03) foi observada diferença estatística significativa (p<0,05). Em relação a IgG2a tanto os camundongos BALB/c quanto os camundongos C57BL/6 apresentaram níveis similares (BALB/c = 0,576±0,2; C57BL/6 = 0,436±0,08) (Figura 6).

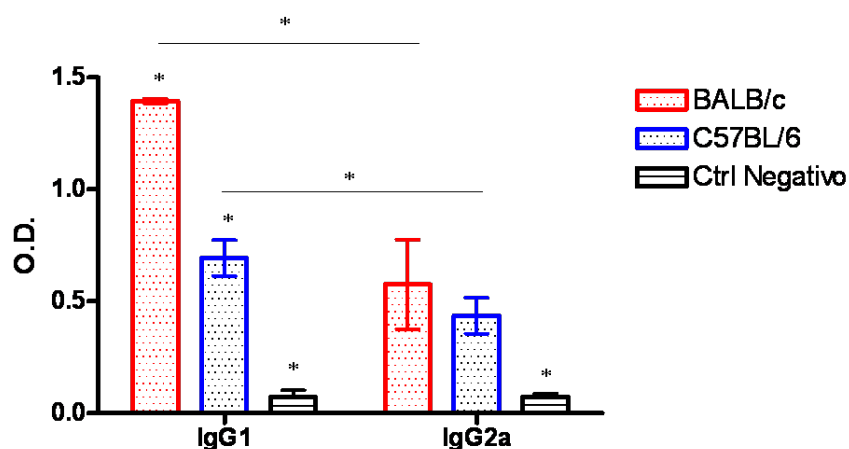


Figura 6. Detecção de IgG1 e IgG2a específicos anti-extrato protéico de *M. massiliense* no soro de camundongos BALB/c e C57BL/6 após 14 dias de infecção com *M. massilienses*. (* p < 0,05).

Para avaliar a capacidade funcional das células do baço em produzir citocinas em resposta à inoculação com 10^6 bacilos procedemos a PCR em tempo real. Observou-se

entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6 um perfil misto (Th1 e Th2) na produção de citocinas (Figura 7).

As citocinas e quimiocinas induzidas no baço foram determinadas durante a fase aguda da infecção. No terceiro dia após a infecção, tanto em camundongos BALB/c quanto em C57BL/6, foi possível detectar a presença de mRNA para IL-17, TGF- β , TNF- α , IL-10, sem distinção entre as linhagens de camundongos. O nível relativo de IFN- γ e iNOS foram maiores nos camundongos C57BL/6 que nos camundongos BALB/c ($p=0,001$). Já para IL-12 os níveis de mRNA foram maiores nos camundongos BALB/c que nos camundongos C57BL/6. ($p=0,001$). Foi interessante notar que para a IL-4, os camundongos C57BL/6 apresentaram os maiores níveis de mRNA (BALB/c = $0,346\pm 0,04$; C57BL/6 = $1,205\pm 0,11$; $p = 0,005$).

No sétimo dia após a infecção observou-se os maiores níveis de mRNA do experimento, onde os camundongos C57BL/6 ultrapassavam dez mil unidades relativas para IFN- γ , seguidos dos níveis relativos de IL-4 e iNOS. Os níveis relativos de mRNA para IL-17 triplicaram nesses camundongos. Os camundongos BALB/c apresentaram no baço baixos níveis de mRNA para as citocinas neste período. ($p = 0,0001$).

No décimo quarto dia de infecção, no baço dos camundongos BALB/c detectou-se altos níveis de mRNA para IL-12 quando comparados as outras citocinas, e aos baços dos camundongos C57BL/6 infectados ($p=0,001$; $p = 0,007$). Nesta fase observou-se no baço

dos camundongos BALB/c, níveis maiores de todas as citocinas testadas do que aos três dias de infecção ($p=0,01$).

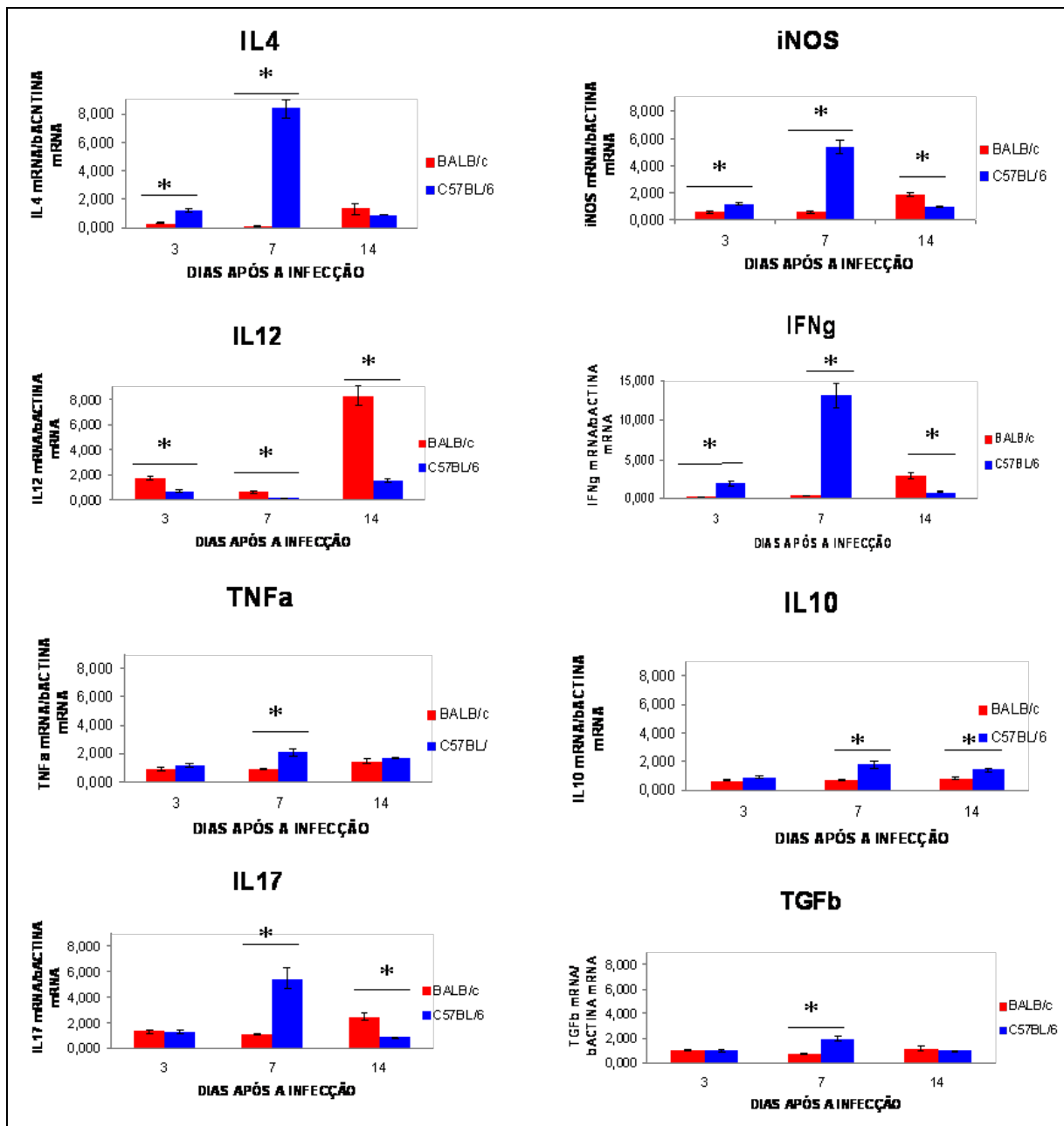


Figura 7: Expressão de mRNA de citocinas em relação a expressão de mRNA de β -actina em camundongos BALB/c e C57BL/6 após 3, 7 e 14 dias infecção com 10^6 bacilos viáveis de *M. massilienses* (* $p < 0,05$).

5.3 Avaliação da produção de Óxido Nítrico

Macrófagos peritoneais de camundongos foram estimulados com *M. massiliense* e depois de 48 horas de cultura o NO foi quantificado. Macrófagos de camundongos BALB/c e C57BL/6 controles e infectados “*in vitro*” com *M. massiliense* produziram NO ($0,73 \pm 0,005$ e $2,51 \pm 0,007$; $p = 0,01$), respectivamente (Figura 8). A quantidade de NO produzida pelos macrófagos peritoneais também foi avaliada após a infecção com *M. massiliense*, e cultivo por 48 horas na presença de *M. massiliense*. Tanto camundongos BALB/c quanto camundongos C57BL/6 dobraram a quantidade de NO produzida pelos macrófagos peritoneais em relação à produção de NO produzida pelas células dos animais controles, um dia após a infecção (BALB/c= $3,88 \pm 0,03$; C57BL/6= $5,75 \pm 0,005$).

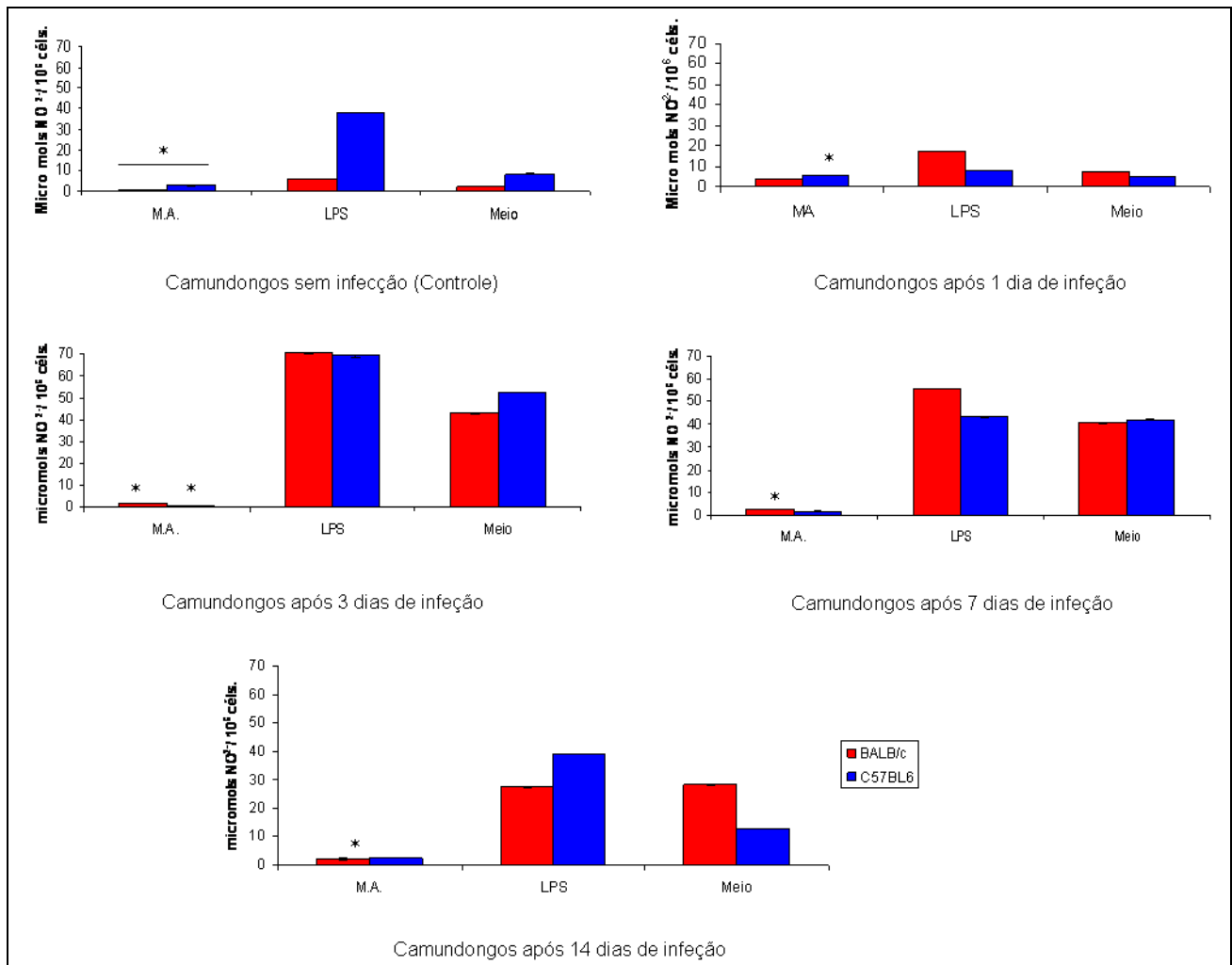


Figura 8. Produção de Óxido Nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 após estimulação com *M. massaliense*. * p=0,01 quando comparado a produção de NO entre as linhagens de camundongos BALB/c e C57BL/6. * p< 0,05 quando comparada a produção de NO pela linhagem de camundongo BALB/c e C57BL/6, entre os camundongos controles (sem infecção) com camundongos após a infecção. MA: Micobactéria Atípica; LPS: Lipopolissacárides; Meio: Meio RPMI completo.

6 – Discussão

O presente trabalho apresentou o perfil da resposta imune frente à infecção intravenosa com *M. massiliense* em camundongos BALB/c e C57BL/6. Os resultados mostraram que a infecção via intravenosa apresentava maior quantidade de bactérias que a infecção por via intraperitoneal e devido a isto a via intravenosa foi utilizada para avaliação da virulência. Outros trabalhos, utilizando diferentes espécies de micobactérias, também demonstraram a importância da via de inoculação no estabelecimento da infecção e na indução da resposta imune (Lyons & Byrd, 1999; Roupie et al, 2008).

Também demonstrou-se que os camundongos da linhagem C57BL/6 controlavam melhor a carga bacteriana no baço que os camundongos BALB/c. No entanto, apesar da redução da UFC no baço ser estatisticamente significativa, esta diferença não refletiu em resistência à infecção, pois as duas linhagens controlaram o crescimento bacteriano no período estudado.

Rottman et al.(2007) demonstraram que micobactérias atípicas como o *M. abscessus* e o *M. chelonae* quando inoculados por via intravenosa em camundongos C57BL/6 apresentavam perfil de recuperação de bactérias viáveis no baço próximo ao encontrado no presente trabalho. Vários trabalhos mostram que a via de inoculação pode interferir diretamente com a patogenicidade da micobactéria, Cardona et al (1999) e Ordway et al (2008) sugeriram que a patogenicidade do agente apresenta uma relação inversa a indução da resposta imune. Portanto, a via intravenosa induziria uma rápida resposta imune que eliminaria o agente infeccioso de forma mais eficaz.

A resposta imune humoral apesar de não desempenhar papel fundamental na defesa do hospedeiro frente às infecções por micobactérias exerce uma função auxiliar no *clearance* dos microrganismos. Ao avaliar os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a contra *M. massiliense*, observou-se um predomínio de IgG1 (Figura 5), anticorpos correlacionados ao padrão Th2 de resposta imune. Na fase aguda da infecção murina por *M. massiliense*, a resposta imune do tipo Th2 contribuiu para a proteção dos camundongos, uma vez que a carga bacteriana diminuiu com 30 dias de infecção. Bai et al. (2008), Wang et al. (2008), embora avaliando candidatos a vacina para *M. tuberculosis*, também demonstraram que após 2 semanas da estimulação com antígenos micobacterianos, os camundongos apresentavam altos níveis de IgG específicas, que se mantinham após o desafio.

A presença de citocinas tem papel no recrutamento e ativação de células durante reações inflamatórias às infecções micobacterianas. No presente estudo foi detectada a expressão relativa de citocinas nas células do baço de camundongos infectados com *M. massiliense* durante a fase aguda da infecção. Nos camundongos C57BL/6 observou-se no baço, precocemente (aos 3 dias de infecção), altos níveis de IL-12, TNF- α , iNOS, IL-4, IL-17 e IL-10, enquanto que em camundongos BALB/c notou-se esta indução mais tardiamente (7 dias após a infecção).

Apesar de não haver muitos trabalhos caracterizando a resposta imune para infecções experimentais por micobactérias atípicas, a resposta elucidada por estes agentes se assemelha à tuberculose, onde de acordo com Orme & Cooper (1998) citocinas do tipo Th1 desempenham um papel importante na proteção. Em um dos trabalhos com

micobacterias atípicas Rottman et al (2007) demonstraram a participação e a importância dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e das citocinas IFN- γ e TNF- α na infecção murina por *M. abscessus* e *M. chelonae*. Ordway et al (2008) também demonstrou que células T CD25⁺ INF- γ ⁺ expressando CD4 ou CD8 e células NKT estão envolvidas no controle e eliminação de infecção por *M. abscessus*.

No presente estudo observou-se que os níveis de citocinas do perfil Th1 como IL-12, iNOS aumentaram com o decorrer da infecção podendo estar relacionados ao controle da micobactéria. Cooper et al. (2002) mostraram que o aumento na secreção de IL-12 em camundongos C57BL/6 é fundamental para o controle da infecção por *M. tuberculosis* e uma vez que esta citocina ativa células NK, células TCD4⁺ e TCD8⁺ para produzirem IFN- γ , conferem resistência frente a infecções por micobactérias pela ativação secundária dos macrófagos, as células efetoras principais.

A indução de mRNA para IL-10 foi semelhante em todo o período estudado, o que pode explicar a susceptibilidade a infecção por *M. massiliense*. Junqueira-Kipnis et al, (2005) demonstraram que, quando camundongos BALB/c são infectados com *M. tuberculosis* observa-se a secreção de IL-10 e esta relaciona-se com a susceptibilidade na fase inicial da infecção. Esta susceptibilidade deve-se a inibição da ativação de macrófagos, o que contribuiu para um aumento da carga bacteriana no início da infecção, não influenciando, no entanto, na evolução da doença. Sullivan et al, (2005) e Beamer et al, (2008), entretanto, relacionam a IL-10 com a reativação de infecção por *M. tuberculosis* na fase crônica.

A principal citocina produzida pelos animais com três dias de infecção foi a IL-17. Cruz et al, (2006) observaram que camundongos C57BL/6 IFN- γ “*knockout*” quando infectados via IV com BCG, apresentaram células T que secretaram IL-17 que foram responsáveis pela infiltração neutrófila. Neste trabalho não observou alterações histopatológicas no baço que pudessem ser correlacionadas com o aumento da secreção de IL-17 (dados não mostrados). No entanto não podemos descartar esta hipótese uma vez que bacilos álcool-ácido resistentes foram observados, mas de maneira difusa neste órgão linfóide (polpa vermelha, dados não mostrados).

Segundo Davis et al. (2007) o NO é um poderoso mecanismo de defesa antimicobacteriana. Foi avaliado os níveis de NO liberado pelos macrófagos após o desafio. Observou-se que os macrófagos das duas linhagens de camundongos produziram NO de maneira similar e que após a infecção dos camundongos por via IV estes animais dobraram a produção de NO. De acordo com Neufert et al. (2001) este aumento na produção de NO pelos macrófagos peritoneais dos animais previamente infectados, talvez seja devido à ativação prévia dos mesmos através de TLR2 por lipopeptídeos bacterianos como a lipoproteína de 19 kDa. Estas lipoproteínas são capazes de induzir iNOS e consequentemente a produção de NO nos macrófagos. Em consonância com a idéia de que NO é fundamental na eliminação de micobactérias, MacMicking et al. (1997) e Darwin et al. (2003) demonstraram que camundongos com deleção de NOS2^{-/-} são mais susceptíveis as infecções por *M. tuberculosis* e de acordo com Chan et al. (1995) a inibição da produção de NO também induz aumento exponencial na carga bacteriana .

7 – Conclusões:

7.1 Conclusão Geral:

- O isolado de *M. massiliense* utilizado neste estudo foi capaz de infectar camundongos imunocompetentes, que controlaram completamente a carga bacteriana antes dos 30 dias de infecção. Os mecanismos pelos quais estes animais eliminaram as micobactérias foram: produção de NO por macrófagos peritoneais, presença de IgG1 específica e indução de mRNA para citocinas inflamatórias, assim como de citocinas reguladoras da inflamação.

7.2 Conclusões Específicas:

- O isolado clínico analisado apresentou alta infectividade e baixa virulência em ambas as linhagens de camundongos.
- A infecção induziu maiores níveis dos anticorpos da classe IgG1 específicos para *M. massiliense* do que anticorpos da classe IgG2a tanto para os camundongos BALB/c quanto para os camundongos C57BL/6.
- Independente da linhagem de camundongo aos três dias após a infecção houve indução de mRNA para IL-17. A infecção de camundongos C57BL/6 induziu aumento dos níveis relativos de mRNA de todas as citocinas inflamatórias avaliadas aos três dias de infecção, com predomínio de IFN- γ .

Camundongos BALB/c quando infectados produziram principalmente IL-12 e somente aos quatorze dias de infecção.

- A maior produção de NO pelos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e C57BL/6 foi observada após um dia de infecção.

8 - Referências Bibliográficas

Abel B, Thieblemont N, Quesniaux VJ, Brown N, Mpagi J, Miyake K, Bihl F & Ryffel B. 2002. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* Sep 15;169(6):3155-62.

Adékambi T, Reynaud-Gaubert M, Greub G, Gevaudan MJ, La Scola B, Raoult D & Drancourt M. 2004. Amoebal Coculture of “*Mycobacterium massiliense*” sp. nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia. *J Clin Microbiol.* Dec; 42(12): 5493–5501.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 2007. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2007/070307.htm>, acessado em 26 de dezembro de 2007.

Anank PK & Kaul D. 2005. Downregulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. *FEMS Microbiol Lett.* Sep 1;250(1):137-44.

Bai Y, Xue Y, Gao H, Wang L, Ding T, Bai W, Fan A, Zhang J, An Q & Xu Z. 2008. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model. *Protein Expression and Purification* 59: 189–196.

Bange FC, Brown BA, Smaczny C, Wallace-Jr RJ & Bottger FC. 2001. Lack of transmission of *Mycobacterium abscessus* among patients with cystic fibrosis attending a single clinic. *Clin. Infect. Dis.* 32:1648–1650.

Barrow WW & Brennan PJ. 1982. Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. *J. Bacteriol.* 150:381–384.

Beamer GL, Flaherty DK, Assogba BD, Stromberg P, Gonzalez-Juarrero M, de Waal Malefyt R, Vesosky B & Turner J. 2008. Interleukin-10 promotes *Mycobacterium tuberculosis* disease progression in CBA/J mice. *J Immunol.* 18:5545-50.

Beckman IS & Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271:C1424-37.

Belisle JT, McNeil MR, Chatterjee D, Inamine JM & Brennan PJ. 1993. Expression of the core lipopeptide of the glycopeptidolipid surface antigens in rough mutants of *Mycobacterium avium*. *J. Biol. Chem.* 268: 10510–10516.

Boehm U, Klamp T, Groot M & Howard JC. 1997. Cellular response to interferon- γ , *Annu Review Immunology*: 15:749-795

Brennan PJ. 2003. The Emb proteins of mycobacteria direct arabinosylation of lipoarabinomannan and arabinogalactan via an N-terminal recognition region and a C-terminal synthetic region. *Mol Microbiol.* 50(1):69-76.

Brown-Elliott BA, Griffith DE & Wallace RJ. 2002. Newly described emerging human species of nontuberculous mycobacteria. *Infect Dis Clin N Am.* 16:187-220.

Brown-Elliott BA & Wallace RJ Jr. 2002. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 15(4): 716-46.

Burrells C, Clarke CJ, Colston A, Kay JM, Porter J, Little D & Sharp JM. 1999. Interferon-gamma and interleukin-2 release by lymphocytes derived from the blood, mesenteric lymph nodes and intestines of normal sheep and those affected with paratuberculosis (Johne's disease). *Vet.Immunol.Immunopathol.* 68:139-48.

Byrd TF & Lyons CR. 1999. Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection. *Infect Immun* 67(9):4700.

Cardona PJ, Cooper A, Luqui M, Ariza A, Filipos , Orme IM & Ausuna V. 1999. The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity. *Scand. J. Immunol.* 49,362-366

Cardoso AM, Sousa EM, Viana-Niero C, Bortoli FB, Neves ZCP, Leão SC, Junqueira-Kipnis AP & Kipnis A. 2008. Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goiás, Brazil. *Microbes and Infection*. Nov-Dec; 10(14-15):1552-7.

Casal M & Picazzo JJ. 1999. Procedimientos en microbiología clínica. Recomendación de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

Catherinot E, Clarissou J, Etienne G, Ripoll F, Emile J-F, Daffé M, Perronne C, Soudais C, Gaillard JL & Rottman M. 2007. Hypervirulence of a Rough Variant of the *Mycobacterium abscessus* Type Strain. *Infection and Immunity*, 1055–1058.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J & Bloom BR. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*. Feb;63(2):736-40

Chiodini RJ & Davis W. 1992. The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4+ activity. *Microb. Pathog.*,13:447-63.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG & Orme IM. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med*. Dec 1;178(6):2243-7 .

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J & Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. 2002. *Journal of Immunol.* 168:1322-27.

Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Ouse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins DM, Butler WR, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano MI, Alito A, Zumarraga M & Bernardelli A. 2003. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 53: 1305-14.

Cruz A, Khader SA, Torrado E, Fraga A, Pearl JE, Pedrosa J, Cooper AM & Castro AG. 2006. IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during Mycobacterial Infection. *Journal of Immunology,* 177:1416-20.

Darwin KH, Ehrt S, Gutierrez-Ramos JC, Weich N & Nathan CF. 2003. The proteasome of *Mycobacterium tuberculosis* is required for resistance to nitric oxide. *Science.* 12;302(5652):1963-6

Davidson PT. 1989. The diagnosis and management of disease caused by *M. avium* complex, *M. kansasii*, and other mycobacteria. *Clin Chest Med.* 10(3):431-43.

Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J & Deretic V. 2007. Mechanism of Inducible Nitric Oxide Synthase Exclusion from Mycobacterial Phagosomes. *PLoS Pathog* 3(12): e186.

Dorman SE & Holland SM. 1998. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. *J Clin Invest.* 1; 101(11):2364-9.

Drennan MB, Nicolle D, Quesniaux VJ, Jacobs M, Allie N, Mpagi J, Frémond C, Wagner H, Kirschning C & Ryffel B. 2004. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection *Am J Pathol*;164(1):49-57.

Ernest, JD. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*: 66; 1277-81.

Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, Majorov KB, Scheglov IV, Orlova MO & Apt AS. 2005. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infection and Immunity*, 1744-1753.

Etienne GC, Villeneuve H, Billman-Jacobe C, Astarie-Dequeker MA, Dupont & M. Daffe. 2002. The impact of the absence of glycopeptidolipids on the ultrastructure, cell surface and cell wall properties, and phagocytosis of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology* 148:3089–3100.

Euzéby JP. List of procaryotic names with standing in nomenclature: genus *Mycobacterium*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>, Acessado em: 23 de novembro de 2006.

Falkinham JO, 1996: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9, 177-215.

Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, Burdick M, Strieter RM & Kornfeld H. 1997. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun;65(12):5149-56.

Flynn JL & Chan J. 2005. What's good for the host is good for the bug. Trends Microbiol. 13(3):98-102. Review.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA & Bloom BR. 1993. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med 1;178(6):2249-54

Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mak TW & Bloom BR. 1995. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. Immunity;2(6):561-72.

Flynn JL & Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. Annu Review Immunology; 19: 93-129

Fossiez, F., O. Djossou, P. Chomarat, L. Flores-Romo, S. Ait-Yahia, C. Maat, J. J. Pin, P. Garrone, E. Garcia & S. Saeland. 1996. T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J. Exp. Med.* 183: 2593–2603.

Fratti RA, Chua J & Deretic V. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* glycosylated phosphatidylinositol causes phagosome maturation arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29;100(9):5437-42.

Freitas D, Alvarenga L, Sampaio J, Mannis M, Sato E, Sousa L, Vieira L, YuMC, Martins MC, Hofling-Lima A & Belfort R Jr 2003. An outbreak of *Mycobacterium chelonae* infection after LASIL. *Ophthalmology*, 110:276-285.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS & Tannenbaum SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal biochem*, 126: 131-138.

Griffith DE, Girard WM & Wallace RJ, Jr. 1993: Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients. *Am. Rev Respir Dis* 147(5):1271.

Guidry TV, Hunter RL Jr & Actor JK. 2007. Mycobacterial glycolipid trehalose 6,6'-dimycolate-induced hypersensitive granulomas: contribution of CD4⁺ lymphocytes. *Microbiology*;153 (Pt 10):3360-9

Hance AJ, Grandchamp B & Vincent LF.1989. Detection and identification of mycobacteria by amplification of mycobacterial DNA. *Molecul Microbiol* 1989; 3:843-49.

Happel K, Zheng E, Young LJ, Quinton E, Lockhart AJ, Ramsay JE, Shellito JR, Schurr GJ, Bagby S, Nelson & Kolls JK. 2003. Roles of Toll-like receptor 4 and IL-23 in IL-17 expression in response to *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Immunol.* 170: 4432–4436.

Hector JSR, Pang Y, Mazurek GH, Zhang Y, Brown BA & Wallace-Jr RJ. 1992. Large restriction fragment patterns of genomic *Mycobacterium fortuitum* DNA as strain-specific markers and their use in epidemiologic investigation of four nosocomial outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 30:1250–1255.

Herrman JL & Lagrange PH. 2005. Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse? *Pathol. Biol.* 53: 35-40.

Hines ME, Kreeger JM & Herron AJ. 1995. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. *Laboratory Animal Science*, 45(4):334-351.

Holland SM. 1995. Host defense against nontuberculous mycobacterial infections. *Semin Respir Infect*; 11(4):217-30.

Howard ST, Byrd TF & Lyons CR. 2002. A polymorphic region in *Mycobacterium abscessus* contains a novel insertion sequence element. *Microbiology* 148, 2987–2996.

Howard ST, Rhoades E, Recht J, Pang X, Alsup A, Kolter R, Lyons CR & Byrd TF. 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiology*.152, 1581-1590

<http://oregonstate.edu/%7Emahmudt/pictures/Mycobacterium%20cell%20envelope.jpg>,
acessado em agosto de 2008.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J & Bloom BR. 1995. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*, *Infect Immun* 63,736–740.

Jenkins PA, Campbell IA, Banks J, Gelder CM, Prescott RJ & Smith AP. 2008. Clarithromycin vs ciprofloxacin as adjuncts to rifampicin and ethambutol in the treatment of Opportunist Mycobacterial pulmonary diseases and an assessment of the value of immunotherapy with *M.vaccae*: a pragmatic, randomised trial by The British Thoracic Society. *Thorax*. Feb 4 [Epub ahead of print]

Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, & Pelletier JP. 1998. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-1 β and TNF- α , by human macrophages. *J. Immunol*. 160: 3513–3521.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Jamieson A, Juarrero MG, Diefenbach A, Raulet DH, Turner J & Orme IM. 2003. NK cells respond to pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis*, but play a minimal role in protection. *J Immunol.* 1;171(11):6039-45.

Junqueira-Kipnis AP, Kipnis A, Tamayo MH, Harton M, Gonzalez-Juarrero M, Basaraba RJ & Orme IM. 2005. Interleukin-10 production by lung macrophages in CBA xid mutant mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology.* 115:246-252.

Kasahara K, Sato I, Ogura K, Takeuchi H, Kobayashi K & Adachi M. 1998. Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Infect. Dis.* 178: 127–137.

Kaufmann SH & Schaible UE. 2003. A dangerous liaison between two major killers: *Mycobacterium tuberculosis* and HIV target dendritic cells through DC-SIGN. *J Exp Med.* 197(1):1-5.

Kaufmann SH. 1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today,* 16(7):338-42.

Kaufmann SH. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat. Rev. Immunol.,* 1(1): 20-30.

Kawamura I. 2008. Advances in understanding of the virulence mechanism of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi;* 77(3):219-24.

Khoor A, Leslie KO , Tazelaar HD, Helmers RA & Helmers TV. 2001. Diffuse Pulmonary Disease Caused by Nontuberculous Mycobacteria in Immunocompetent People (Hot Tub Lung). *Am J Clin Pathol* ;115:755-762

Kisich KO, Higgins M, Diamond G & Heifets L. 2002. Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect Immun*; 70(8):4591-9.

Koneman EW *et al* 2001. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI.

Langelaar MF, Weber CN, Overdijk MB, Muller KE, Koets AP & Rutten VP. 2005. Cytokine gene expression profiles of bovine dendritic cells after interaction with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* (M.a.p.), *Escherichia coli* (E. coli) or recombinant M.a.p. heat shock protein 70. *Vet.Immunol.Immunopathol.* 107(1-2):153-61.

Lee H, Stabel JR & Kehrl ME, Jr. 2001. Cytokine gene expression in ileal tissues of cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 82(1-2): 73-85.

Lepper AWD & Corner LA 1983. Naturally occurring mycobacterioses of animals. In.: Ratledge C, Stanford J. The biology of the mycobacteria. London:Academic Press, 2.417 – 521.

Liu MA. 2003. DNA vaccines: a review. J. Intern. Med., 253(4): 402-10.

Lockhat E, Green AM & Flynn JL. 2006. IL-17 production is dominated by gammadelta T cells rather than CD4 T cells during Mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol.177(7):4662-9.

Lowry PW, Jarvis WR, Oberle AD, Bland LA, Silberman R, Bocchini-Jr JA, Dean HD, Swenson JM & Wallace-Jr RJ. 1988. *Mycobacterium chelonae* causing otitis media in an ear-nose-and-throat practice. N. Engl. J. Med. 319:978–982.

MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. 1998. First humans trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. J. Infect. Dis., 178(1): 92-100.

MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK & Nathan CF. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A; 94(10): 5243–5248.

Maheshwari A, Han S, Mahato RI & Kim SW. 2002. Biodegradable polymer-based interleukin-12 gene delivery: role of induced cytokines, tumor infiltrating cells and nitric oxide in anti-tumor activity. *Gene Therapy* 9: 1075–1084.

Marietta MA. 1993. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*, 268(17): 12231-4.

Marietta MA. 1994. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell.*, 78: 927-30.

Martineau AR, Newton SM, Wilkinson KA, Kampmann B, Hall BM, Nawroly N, Packe GE, Davidson RN, Griffiths CJ & Wilkinson RJ. 2007. Neutrophil-mediated innate immune resistance to micobacteria. *J Clin Invest*; 117(7): 1988–1994.

McKenna S & Evans G. 2001. Canadian Infectious Disease Society Antimicrobial Agents Committee. Macrolides: A Canadian Infectious Disease Society position paper. *Can J Infect Dis.*; 12(4):218-31.

Moncada S. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43(2):109-42.

Nakae, S., Y. Komiyama, A. Nambu, K. Sudo, M. Iwase, I. Homma, K. Sekikawa, M. Asano & Y. Iwakura. 2002. Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-

deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17: 375–387.

Nava E & Luscher TF. 1995. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypert.*, 13(2):39-48.

Neufert C, Pai RK, Noss EH, Berger M, Boom WH & Harding CV. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein promotes neutrophil activation. *J. Immunol.* Aug 1;167(3):1542-9.

Nolte FS & Netchock B 1995. *Mycobacterium*. In: MURRAY, P. R. *et al.* Manual of clinical microbiology. 6th. ed. Washington: ASM PRESS, . p. 400-437.

Ordway D, Henao-Tamayo M, Smith E, Shanley C, Harton M, Troutt J, Bai X, Basaraba RJ, Orme IM & Chan ED. 2008. Animal Model of *Mycobacterium abscessus* lung infection. *Journal of Leukocyte Biology.* 83:1502-09.

Orme IM & Cooper AM. 1999. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. *Immunol Today.* 20(7):307-12.

Ostrowski M, Mundo SL, Harris NB, Barletta RG & Lopez OJ. 2003. B-cell epitopes in the immunodominant p34 antigen of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* recognized by antibodies from infected cattle. *Scand.J.Immunol.*, 58(5):511-21.

Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, Orme IM, Silva MT & Cooper AM 2000. Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 68: 577-583

Peng M, Wang Z, Yao C, Jiang L, Jin Q, Wang J & Li B. 2008. Interleukin 17-producing γ δ T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cellular & Molecular Immunology*, 5(3):203-08.

Petrini B 2006. *Mycobacterium abscessus*: an emerging rapid-growing potential pathogen. *Apmis* 114(5):319.

Pfaffl MW, Horgan GW & Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (rest©) for group-wise comparison and statistical analysis relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* .30 (9):1-10.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*.29 (9): 2002-07.

Phillips MS & Von Reyn CF. 2001. Nosocomial infections due to nontuberculous mycobacteria. *Clin Infect Dis*; 33: 1363-74.

Pollock JM, McNair J, Welsh MD, Girvin RM, Kennedy HE, Mackie DP & Neill SD. 2001. Immune response in bovine tuberculosis. *Tuberculosis*: 103-107.

Ramos MC, Moraes MJ, Calisni AL, Roscani GN & Picolli EA. 2000. A retrospective bacteriological study of mycobacterial infections in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Br J Infect.* 4:86-90.

Rastogi N, Legrand E & Sola C. 2001. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev.- Off. Int. Epizoot.*, 20(1):21-54.

Roberts GD. 1991. Manual of clinical microbiology. Mycobacterium. Washington DC. Book; 304-39.

Rook GA, Dheda K & Zumla A. 2005. Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine*; 23(17-18):2115-20. Review.

Rottman M, Catherinot E, Hochedez P, Emile JF, Casanova JL, Gaillard JL & Soudais C. 2007. Importance of T cells, gamma interferon, and Tumor Necrosis Factor in Immune Control of the Rapid Grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice. *Infection and Immunity*. 75(12): 5898-5907.

Roupie V, Rosseels V, Piersoel V, Zinniel DK, Barletta RG & Huygen K. 2008, Genetic resistance of mice to *Mycobacterium paratuberculosis* is influenced by *Slc11a1* at the early but not at the late stage of infection. *Infection and Immunity*. 76:2099-2105.

Runyon EH. 1959. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. North Am.*43: 273-290.

Saito H, Tomioka H, Sato K et al 1990. *Identification of various serovar strains of Mycobacterium avium complex using DNA probes specific for M.avium and M. intracellulare.* *J Clin Microb* ;28 (8):1694-7.

Salgame P. 2005. Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol.* Aug;17(4):374-80. Review.

Sano K, Handea K, Tamura G & Shirato K. 1999. Ovoalbumin (OVA) AND *Mycobacterium tuberculosis* bacilli cooperatively polarize anti-OVA T-helper cells forward a Th1-dominant phenotype and ameliorate murine tracheal eosinophilia. *Am J Resp Cell Mol Biol*, v.20, p.1260-1267.

Schwarzenberger, P., W. Huang, P. Ye, P. Oliver, M. Manuel, Z. Zhang, G. Bagby, S. Nelson, & J. K. Kolls. 2000. Requirement of endogenous stem cell factor and granulocyte-colony-stimulating factor for IL-17-mediated granulopoiesis. *J. Immunol.* 164: 4783–4789.

Sharma S, Verma I & Khuller GK. 2000. Antibacterial activity of human neutrophil peptide-1 against *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: in vitro and ex vivo study. *Eur Respir J.*;16(1):112-7.

Shinnick TM & Good RC 1994: Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13(11):884.

Simmon KE, Pounder JI, Greene JN, Walsh F, Anderson CM, Cohen S & Petti CA. 2007. *J Clin Microbiol.*; 45(6):1978-80. Epub 2007 Apr 4.

Sinha S, Kosalai K, Arora S, Namane A, Sharma P, Gaikwad AN, Brodin P & Cole ST. 2005. Immunogenic membrane-associated proteins of *Mycobacterium tuberculosis* revealed by proteomics. *Microbiology.*;151(Pt 7):2411-9.

Stabel JR. 1995. Temporal effects of tumor necrosis factor-alpha on intracellular survival of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 45(3-4):321-32.

Stabel JR. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.*, 77(3-4):465-73.

Sturgill-Kosycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, et al 1994. Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science*. 263:678-81.

Sullivan BM, Jobe O, Lazarevic V, Vasquez K, Bronson R, Blimcher LH & Kramnil I. 2005. Increased Susceptibility of Mice Lacking T-bet to infection with *Mycobacterium*

tuberculosis Correlates with Increased IL-10 and Decrease IFN- γ Production. J. Immunol. 175:4593-4602.

Taylor JL & Palmer SM 2006: *Mycobacterium abscessus* chest wall and pulmonary infection in a cystic fibrosis lung transplant recipient. J Heart Lung Transplant 25(8):985.

Thomssen H, Ivanyi J, Espitia C, Arya A & Londei M. 1995. Human CD4-CD8- alpha beta + T-cell receptor T cells recognize different mycobacteria strains in the context of CD1b. Immunology.;85(1):33-40.

Timpe A & Runyon EH. 1954. Relationship of atypical acid-fast bacilli to human disease: Preliminary report. J. Lab. Clin. Med.44:202-209.

Trinchieri G 1995. Interleukin-12: A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. Annu Rev Immunol; 13:251-276.

Turner J, Gonzalez-Juarrero M, Ellis DL, Basaraba RJ, Kipnis A, Orme IM & Cooper AM.2002. In vivo IL-10 production reactivates chronic pulmonary Tuberculosis in C57BL/6 mice. The Journal of Immunology. 169:6343-6351.

Umemura M, Yahagi A, Hamada S, Begum MD, Watanabe H, Kawakami K, Suda T, Sudo K, Nakae S, Iwakura Y & Matsuzaki G. 2007. IL-17 mediated regulation of innate and

acquired immune response against pulmonary *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guérin infection. *Journal of Immunology*, 178:3786-96.

Vasconcelos SA 1979. Epidemiologia da tuberculose. *Comunicações Científicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, 3(1/2): 81-89.

Viana-Niero C, Lima KVB, Lopes ML, Rabello MCS, Marsola LR, Brilhante VCR, Durham AM & Leão SC. 2008. Molecular characterization of *Mycobacterium massiliense* and *Mycobacterium bolletii* in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures. *Journal of Clinical Microbiology*.46:850-55.

Villanueva A, Calderon RV, Vargas BA, Ruiz F, Aguero S, Zhang Y, Brown BA & Wallace-Jr RJ. 1997. Report on an outbreak of post-injection abscesses due to *Mycobacterium abscessus*, including management with surgery and clarithromycin therapy and comparison of strains by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Clin. Infect. Dis.* 24:1147–1153.

Vincent VLF & Portaels F 1992. Proposed minimal standards for the genus *Mycobacterium* and for the description of new slowly growing *Mycobacterium* species. *Int J Syst Bacteriol* ;42:315-23.

Vossler JL 2000. *Mycobacterium tuberculosis* and other nontuberculous mycobacteria. In : MAHON, C. R. ; MANUSELIS, G. *Textbook of diagnostic microbiology*. 2nd. ed. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 667-707.

Wallace-Jr RJ, Brown BA & Griffith DE. 1998. Nosocomial outbreaks/pseudo outbreaks caused by nontuberculous micobacteria. *Annual Review of Microbiology*. 52: 453-490

Wallace-Jr RJ, Musser JM, Hull SI, Silcox VA, Steele JC, Forrester GD, Labidi A & Selander RK. 1989. Diversity and sources of rapidly growing mycobacteria associated with infections following cardiac bypass surgery. *J. Infect. Dis.* 159:708–716.

Wang JL, Qie Yq, Zhu Bd, Zhang Hm, Xu Y, Wang Qz, Chen Jz, Liu W & Wang Hh. 2008. Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of *Mycobacterium tuberculosis* in C57BL/6 mice. *Med Microbiol Immunol*.

Wayne LG & Sramek HA.1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*5:1-25.

Wennmalm A. 1994. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J. Int. Med.*, 235: 317-27.

Winthrop KL, Steinberg EB, Holmes G, Kainer MA, Werner SB, Winquist A & Vugia DJ. 2003. Epidemic and sporadic cases of nontuberculous mycobacterial keratitis associated with laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* ;135: 223-4.

Witte MB & Barbul A. 2002. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surg.*, 183:406-12.

Wolinsky E. 1992. *Mycobacterial Diseases Other Than Tuberculosis (State-of-the-art)*. *Clin Infect Dis* ;15:1-12.

Xing Z & Santosuosso M. 2000. Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol*,897-902.

Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA & Wallace-Jr RJ. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35:3132–3139.

Zur LS, Goethe R; Darji A; Valentin-Weigand P & Weiss S. 2003. Activation of macrophages and interference with CD4+ T-cell stimulation by *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis and *Mycobacterium avium* subspecies avium. *Immunology*, 108(1): 62-9.