

**JANAINA MITIE SERIKAWA**

**Estudo de isolados de *Mycobacterium*  
*abscessus* subsp. *massiliense* ambientais e  
de surto em modelo *in vivo* e *ex vivo***

Tese apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo para obtenção  
do título de Mestre em Ciências

**SÃO PAULO**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JANAINA MITIE SERIKAWA**

**Estudo de isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* ambientais e de surto em modelo *in vivo* e *ex vivo***

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Orientadora: Profa. Dra. Sylvia Luisa Pincherle Cardoso Leão

Co-orientadora: Profa. Dra. Célia Regina Whitaker Carneiro

**SÃO PAULO**

**2009**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Serikawa, Janaina Mitie

**Estudo de isolados de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* ambientais e de surto em modelo *in vivo* e *ex vivo***/Janaina Mitie Serikawa. -- São Paulo, 2009.

xiv, 71f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Imunologia e  
Parasitologia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**

**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA,  
IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA**

Pró-Reitor de Pós-Graduação:  
**Prof. Dr. Arnaldo Lopes Colombo**

Chefe do Departamento:  
**Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner**

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:  
**Prof. Dr. Renato Arruda Mortara**

*Aos meus queridos pais, Nice e Luis, meus mestres não-acadêmicos, cujo amor se faz presente e essencial para o que sou hoje.*

*Ao meu avô, Sadayoshi Serikawa (in memoriam), que ansiava por comemorar e participar de todas minhas conquistas.*

*Ao Sergio, companheiro inestimável, que tornou esses anos mais leves e agradáveis. Serei sempre grata pela compreensão e carinho.*



*À Profa. Dra. Célia Regina  
Whitaker Carneiro, mestre e amiga,  
cuja sabedoria não se mede em  
livros, com quem tive o prazer de  
aprender e crescer.*

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Sylvia Luiza Pincherle Cardoso Leão, pela excelente orientação e confiança depositada em meu trabalho.

Aos professores da Disciplina de Imunologia e Microbiologia, Profa. Dra. Ieda Longo Maugéri, Profa. Dra. Zulma Peixinho, Prof. Dr. Mário Mariano e Profa. Dra. Rosa Maria Silva, Prof. Dr. José Daniel Lopes, Prof. Dr. Marcelo Briones, pela sempre excelente convivência.

Agradeço a todos os alunos das Disciplinas de Imunologia e Microbiologia – as muitas conversas, as muitas amizades, os momentos de confraternização: Márcia, Bruno, Camila, Juliana Maricato, Juliana, Carla, Fernanda, Rony, Helena, Adriana, Érika, Fabiana, Maiko, Ricardo, Melissa, Silvia, Martin, Richard, Denize. Em especial, aos companheiros de laboratório com quem tanto aprendi: Michele, Cristianne, Cristina e Jéssica.

Aos grandes amigos que fiz durante esses anos Carol e André, com quem ri e chorei, aprendi com vocês e admiro a garra e competência que vocês sempre tiveram.

Aos funcionários da Imunologia e Microbiologia, cujo auxílio é fundamental e com quem sempre podemos contar: Dadá, Cristina, Magda, Paola, Creuza, Geová, e em especial à minha querida Neta, que sempre me ajudou em todos os sentidos.

À minha família, por serem amigos em momentos difíceis, por me darem suporte, apoio e momentos inesquecíveis. À minha irmã Sabine, por ser minha amiga e companheira de cafés e de risadas, muitas risadas.

A todos os meus amigos, em especial a todos da Bio 37, que tornaram estes seis anos os melhores da minha vida; ao meu amigo Júnior que sempre acreditou em mim e foi ombro amigo e todo ouvido quando precisei.

À Universidade Federal de São Paulo, aos seus professores, funcionários e alunos, que construíram, nestes anos, uma instituição excepcional, capaz de apaixonar a todos que a ela se dedicam.

A todos os docentes que ajudaram na minha formação. Acredito que se sou uma boa profissional, devo muito a eles, que aguçaram meu senso crítico e me fizeram aprender a questionar.

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

***“Como a abelha que constrói os alvéolos de sua colméia e logo os preenche com mel, a ciência trabalha incansavelmente no seu grande columbário de conceitos que é o cemitério das intuições, constrói ininterruptamente novos e mais elevados estágios, escora, limpa e renova os velhos compartimentos e se esforça sobretudo para preencher este colossal andaime até a desmedida e para fazer entrar e arrumar aí a totalidade do mundo empírico, isto é, o mundo antropomórfico. Enquanto o homem de ação chega a ligar sua existência à razão e a seus conceitos, a fim de não se ver arrastado e não se perder, o pesquisador constrói o seu tugúrio ao pé da torre da ciência para buscar auxílio no seu trabalho e encontrar proteção sob o baluarte já edificado. Ele tem necessidade de fato de proteção, pois há poderes terríveis que o ameaçam constantemente e que opõem à verdade científica verdades de um tipo totalmente diferente, com os sinais mais diversos.”***

Friedrich Nietzsche: Verdade e Mentira no sentido extramoral, 1873.

# SUMÁRIO

Dedicatórias .....	v
<u>Agradecimentos</u> .....	ix
<u>Lista de figuras</u> .....	xii
<u>Resumo</u> .....	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Gênero <i>Mycobacterium</i> .....	2
1.2. Identificação molecular de micobactérias .....	4
1.3. <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> .....	6
1.4. Infecções causadas por MCRs .....	8
1.5. Biologia das infecções por MCRs .....	9
1.6. O granuloma na infecção por micobactérias.....	10
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	14
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
3.1. Animais .....	17
3.2. Lavagem das lamínulas para cultivo de macrófagos.....	17
3.3. Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos e CEs-like .....	17
3.4. Isolamento de variantes lisas e rugosas de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> .....	19
3.5. Genotipagem bacteriana .....	20
3.6. Curva de crescimento das micobactérias de crescimento rápido .....	20
3.7. Ensaio de infecção intraperitoneal .....	21
3.8. Ensaio de infecção endovenosa .....	22
3.9. Ensaio de infecção <i>ex vivo</i> .....	22
3.10. Dosagem de citocinas pró-inflamatórias .....	24
3.11. Dosagem de TGF- $\beta$ .....	24
3.12. Análise histopatológica.....	25
3.13. Análise estatística .....	26
<b>4. RESULTADOS</b> .....	27
4.1. Isolamento de variantes lisas e rugosas de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> .....	28
4.2. Curvas de crescimento.....	31
4.3. Ensaio de infecção intraperitoneal .....	35
4.4. Ensaio de infecção endovenosa .....	43
4.5. Experimento de infecção <i>ex vivo</i> .....	46
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	62
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	64
Abstract .....	71

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Morfologia das colônias dos isolados B47 e B7 de <i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>massiliense</i> do surto de Belém 2003-2004.....	29
<b>Figura 2.</b> Identificação dos isolados por PRA- <i>hsp65</i> .....	29
<b>Figura 3.</b> <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE).....	30
<b>Figura 4.</b> Relação entre D.O. <sub>.560</sub> e UFCs do isolado B47 .....	30
<b>Figura 5.</b> Relação entre D.O. <sub>.560</sub> e UFCs do isolado B7 .....	32
<b>Figura 6.</b> Relação entre D.O. <sub>.560</sub> e UFCs B67 e MG3-6 .....	33
<b>Figura 7.</b> Quantificação do infiltrado celular peritoneal e cinética de eliminação das micobactérias no peritônio de animais infectados via intraperitoneal .....	36
<b>Figura 8.</b> Análise da infecção intraperitoneal no baço dos animais .....	38
<b>Figura 9.</b> Análise histológica dos baços dos animais infectados via intraperitoneal pelos isolados B7 L e R (HE) .....	40
<b>Figura 10.</b> Análise histológica dos baços dos animais infectados via intraperitoneal pelos isolados B7 L e R (Ziehl Neelsen).....	41
<b>Figura 11.</b> Dosagem de citocinas pró-inflamatórias nos soros de camundongos Balb/c infectados via intraperitoneal pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6 .....	42
<b>Figura 12.</b> Análise da infecção endovenosa de camundongos Balb/c pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6.....	44
<b>Figura 13.</b> Dosagem de TGF- $\beta$ produzido em resposta à infecção endovenosa de camundongos Balb/c pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6 .....	45
<b>Figura 14.</b> Imagem representativa da recuperação de colônias rugosas de animais infectados com isolados de fenótipo liso .....	45
<b>Figura 15.</b> Análise da infecção <i>ex vivo</i> por B7 L e R (10 bacilos/célula) .....	47
<b>Figura 16.</b> Análise da infecção <i>ex vivo</i> por B67 e MG3-6 (10 bacilos/célula) .....	48

<b>Figura 17.</b> Análise da infecção <i>ex vivo</i> por B7 L e R (2 bacilos/célula) .....	49
<b>Figura 18.</b> Análise da infecção <i>ex vivo</i> por B67 e MG3-6 (2 bacilos/célula) .....	50
<b>Figura 19.</b> Quantificação da infecção <i>ex vivo</i> pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6, utilizando 0,5 bacilos/célula .....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dosagem de TGF- $\beta$ do sobrenadante das culturas de macrófagos e CEs- <i>like</i> após infecção pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6 .....	53
--	----

## RESUMO

Micobactérias de crescimento rápido (MCR) têm sido frequentemente descritas em surtos de infecções em seres humanos. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* é uma MCR que foi descrita pela primeira vez em 2004, e desde então, 10 trabalhos identificando essa espécie em surtos e casos clínicos esporádicos são os relatos presentes na literatura. Assim, a interação *M. abscessus* subsp. *massiliense*-hospedeiro foi o objetivo principal deste trabalho. Para isso, variantes de colônia lisa e rugosa de um isolado do surto que ocorreu em Belém, entre 2004 e 2005 (B7 L e R), e de 2 isolados não relacionados a surtos (B67 (L) e MG3-6 (R)) foram utilizadas em infecções intraperitoneal e endovenosa de camundongos e *ex vivo* em macrófagos peritoneais e células epitelióides-*like*. No que tange à resposta imunológica após a infecção intraperitoneal, o nível de citocinas foi semelhante para os 4 isolados. Entretanto, após 14 dias da infecção os baços dos animais infectados pelos isolados B7 R e MG3-6 apresentavam um aumento significativo de peso em relação aos demais grupos. Após 90 dias, esta diferença se manteve apenas para o grupo infectado com B7 R. A histologia dos baços destes animais mostrou que a resposta proliferativa nos folículos linfóides foi mais pronunciada para a infecção por B7 R, levando à necrose central dos mesmos após 14 dias. Nestes, bacilos álcool-ácido resistentes foram encontrados penetrando a zona perifolicular, e também em vasos de maior calibre, sugerindo disseminação via corrente sanguínea. A infecção endovenosa corroborou os resultados obtidos para a infecção intraperitoneal. Após 2 dias de infecção, a recuperação de unidades formadoras de colônia (UFCs) do baço foi significativamente maior para os animais infectados por B7 R. Entretanto, a infecção foi igualmente controlada em todos os grupos, semelhantemente à infecção intraperitoneal. A infecção de culturas de macrófagos e CEs-*like* corroborou os achados *in vivo*, pois B7 R foi capaz de se proliferar no interior de macrófagos e, apenas para este isolado, houve o aumento na porcentagem de CEs-*like* infectadas. Adicionalmente, o isolado B7 R estimulou uma produção menor de TGF- $\beta$  nas culturas quando comparado ao isolado de fenótipo liso. CEs-*like* não foram capazes de conter a infecção causada pelo isolado B7 R, talvez pela interação micobactéria-CEs-*like* resultar em menor produção de TGF- $\beta$ . Tomados em conjunto, os resultados apresentados sugerem que micobactérias formadoras de colônias rugosas associadas a surtos são mais patogênicas que as de fenótipo liso e que aquelas presentes no ambiente. Os mecanismos subjacentes responsáveis por estes achados estão sendo estudados.

# 1. INTRODUÇÃO

---



### **1.1. Gênero *Mycobacterium***

Micobactérias são bactérias aeróbias, álcool-ácido resistentes, pertencentes à família *Mycobacteriaceae* (Pitulle e cols. 1992; Shinnick e Good 1994). Além da resistência a álcool-ácido, evidenciada nos métodos de coloração, as espécies do gênero *Mycobacterium* possuem DNA com alto conteúdo G-C (61-71%) e ácidos micólicos em sua parede celular (Shinnick e Good 1994).

Atualmente já foram descritas mais de 140 espécies (J. P. Euzéby) que são usualmente classificadas em 2 grandes grupos segundo o tempo necessário para a formação de colônias visíveis em meio sólido. Espécies cujo tempo de aparecimento de colônias é superior a 7 dias são classificadas como micobactérias de crescimento lento (MCL); enquanto aquelas cujo tempo de aparecimento de colônias é inferior a 7 dias são classificadas como micobactérias de crescimento rápido (MCR) (Shinnick e Good, 1994).

O gênero *Mycobacterium* pode ser dividido, também, em 3 grupos de acordo com a significância clínica. O primeiro grupo inclui patógenos obrigatórios para animais e o homem, como as espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* e *Mycobacterium lepraemurium*. O segundo inclui micobactérias que são potencialmente patogênicas para o homem e animais. Essas espécies foram isoladas de diversas fontes em ambientes terrestres e aquáticos, e podem causar doença em certas circunstâncias pré-existentes, como lesões de pele, imunodeficiências e doenças crônicas, como no caso das espécies do complexo *Mycobacterium avium*. O terceiro grupo consiste de

espécies saprofiticas que não são consideradas patogênicas, ou o são apenas em casos excepcionais (Vaerewijck e cols. 2005).

Espécies de crescimento lento, não incluídas no complexo *M. tuberculosis*, juntamente com todas as MCR são comumente denominadas micobactérias não-tuberculosas (*Non-tuberculous mycobacteria - NTM*), MOTT (*Mycobacteria Other Than Tuberculosis*) ou micobactérias atípicas e são incluídas no segundo e terceiro grupos quanto à relevância clínica (Falkinham 1996; Vaerewijck e cols. 2005).

Micobactérias não-tuberculosas estão amplamente distribuídas na natureza, em especial no solo e ambientes aquáticos. Podem contaminar o ser humano pela ingestão, inalação ou inoculação de bacilos advindos de fontes ambientais (Falkinham, 1996), sendo que vários autores já demonstraram a presença de NTMs em sistemas públicos de distribuição de água e em hospitais (Mankiewicz e Majdaniw 1982; Havelaar e cols. 1985; Carson e cols. 1988; Covert e cols. 1999; Falkinham e cols. 2001; Hussein e cols. 2009).

Dentre as MCR, as principais espécies relacionadas a infecções em humanos pertencem aos grupos *Mycobacterium chelonae-abscessus* e *Mycobacterium fortuitum* (Brown-Elliott e Wallace 2002). Além destas espécies, outras apresentam riscos menores de infecção e novos estudos têm contribuído para o aumento do número de espécies conhecidas com potencial patogênico (Howard e Byrd 2000; Primm e cols. 2004; Tortoli 2006).

Por serem bactérias ubíquas, capazes de formar biofilmes (Hall-Stoodley e Lappin-Scott 1998; Hall-Stoodley e Stoodley 2005) e resistentes aos desinfetantes comumente usados (Wallace e cols. 1998), MCRs podem causar

infecções iatrogênicas e nosocomiais, que estão se tornando mais frequentes nos últimos anos (Nagore e cols. 2001; Meyers e cols. 2002; Woo e cols. 2002; Tiwari e cols. 2003).

A contaminação de equipamentos hospitalares e reagentes por MCRs tem sido associada a surtos e pseudo-surtos de infecções em casos de implantes cirúrgicos, procedimentos estéticos e cirurgias oftalmológicas (Wallace e cols. 1998; Wilson e cols. 2001; Sampaio e cols. 2006; Padoveze e cols. 2007; Chroneou e cols. 2008; Carbonne e cols. 2009; Del-Castillo e cols. 2009). A identificação rápida e precisa da espécie causadora é fundamental para o direcionamento do tratamento e de medidas de controle, uma vez que MCRs apresentam diferenças na susceptibilidade a antimicrobianos (Brown-Elliott e Wallace 2002).

## **1.2. Identificação molecular de micobactérias**

A identificação molecular tem como base a detecção, dentro do genoma, de regiões altamente conservadas que possuam sequências hipervariáveis, nas quais estejam presentes deleções, inserções ou substituições de nucleotídeos de forma espécie-específica (Tortoli 2003).

Durante muitos anos, o gene que codifica o RNA ribossomal 16S foi o alvo primário em estudos de classificação e identificação de micobactérias (Tortoli 2003). Entretanto, no gênero *Mycobacterium* a similaridade inter-espécies deste alvo molecular varia de 94 a 100%, e assim, algumas espécies possuem alto grau de similaridade ou possuem sequências idênticas, como *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium gastri*, *M. chelonae* e *M. abscessus*,

*Mycobacterium marinum* e *Mycobacterium ulcerans*, entre outras (Adekambi e cols. 2004; Devulder e cols. 2005; Adekambi e cols. 2006), dificultando ou mesmo impedindo a distinção entre as mesmas usando este alvo molecular.

Considerando que a análise do gene RNAr 16S não é capaz de discriminar espécies de micobactérias geneticamente próximas, e que resultados ambíguos podem ser obtidos devido à possível presença de duas cópias do gene RNAr 16S com sequências distintas (Ninet e cols. 1996; Reischl e cols. 1998; Adekambi e Drancourt 2004), outros alvos moleculares para identificação de NTMs estão sendo estudados, como ferramenta para aumentar o poder discriminatório entre espécies altamente relacionadas, como *recA* (Blackwood e cols. 2000), *rpoB* (Gingeras e cols. 1998; Kim e cols. 1999; Adekambi e cols. 2006), ITS (Roth e cols. 1998), *hsp65* (Telenti e cols. 1993; Brunello e cols. 2001), *sod* (Zolg e Philippi-Schulz 1994) e *gyrB* (Kasai e cols. 2000).

O método denominado PRA (*PCR-Restriction Enzyme Analysis*) (Telenti e cols. 1993) é rápido e acessível para identificação de micobactérias. Consiste na amplificação de 441 pb do gene da proteína de choque-térmico de 65kD (*hsp65*), seguida da análise do perfil de fragmentos obtidos pela restrição da região amplificada com Bst EII e Hae III. A identificação é baseada na comparação com perfis depositados em bancos de dados como o PRAsite (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>), sendo que o perfil de 113 espécies está disponível neste banco.

O sequenciamento parcial do gene *rpoB*, que codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase bacteriana, tem sido utilizado como uma ferramenta

complementar ao sequenciamento do gene RNAr 16S, e da utilização do PRA-*hsp65* (Gingeras e cols. 1998; Kim e cols. 1999; Adekambi e Drancourt 2004; Adekambi e cols. 2006). A região V do gene *rpoB* é a região de escolha para o sequenciamento por ser mais polimórfica. A divergência inter-espécies proposta para essa região é >3%, e isolados com menos que 1,7% de divergência de sequência são considerados da mesma espécie (Adekambi e cols. 2003; Adekambi e cols. 2006).

Abordagens utilizando o sequenciamento de vários alvos genéticos aumentam a sensibilidade da análise, permitindo a identificação mais precisa, principalmente de espécies que foram recentemente descritas (Adekambi e Drancourt 2004; Devulder e cols. 2005; Adekambi e cols. 2006; Rahav e cols. 2006; Gomila e cols. 2007; Viana-Niero e cols. 2008; Zelazny e cols. 2009).

### **1.3. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense***

A utilização do sequenciamento de genes como *rpoB* propiciou a descrição de novas espécies de micobactérias. Em 2004 uma nova espécie de MCR pertencente ao grupo *M. chelonae-abscessus* foi descrita, e denominada *M. massiliense* (Adekambi e cols. 2004; Euzeby 2006). Pela análise da sequência parcial de *rpoB*, esta nova espécie apresentou 96% de similaridade com *M. abscessus*, porém a sequência do gene RNAr 16S das duas espécies apresentou 100% de identidade, além de ambas apresentarem perfis fenotípicos semelhantes (Adekambi e cols. 2004).

*M. massiliense* foi identificada pela primeira vez em uma paciente com quadro prolongado de bronquiectasia e hemoptise, que durante 2 anos

recebeu tratamento de corticosteróides, e que apresentava lesões micronodulares no lobo superior do pulmão direito, função pulmonar prejudicada e nódulos no antebraço. O exame de amostras de escarro e lavado brônquico levou à caracterização fenotípica da espécie como sendo bacilo estritamente aeróbio, sem motilidade, incapaz de formar esporos, gram-positivo e álcool-ácido resistente. Outras características são a formação colônias não-fotocromógenas cujo fenótipo é intermediário entre liso e rugoso. Testes de susceptibilidade a drogas revelaram que a cepa foi resistente a amicacina (MIC 32µg/ml), mas foi sensível a claritromicina (MIC 0,064 µg/ml), minociclina (MIC 4 µg/ml) e doxiciclina (MIC 0,75 µg/ml) (Adekambi e cols. 2004).

Após sua descrição, *M. massiliense* foi identificada em casos de surtos de infecções associadas a injeções intramusculares (Kim e cols. 2007); surtos de infecções pós-cirurgias laparoscópicas ou artroscópicas e procedimentos cosméticos (Cardoso e cols. 2008; Viana-Niero e cols. 2008; Duarte e cols. 2009); em um caso de micobacteriose cutânea em gato (Albini e cols. 2007) e na sepse letal de um paciente na Itália (Tortoli e cols. 2008). Além disso, grupos identificaram esta nova espécie em isolados anteriormente identificados como *M. chelonae* ou *M. abscessus* usando sequenciamento de *rpoB* (Simmon e cols. 2007; Kim e cols. 2008; Zelazny e cols. 2009).

Recentemente foi realizado um estudo mais detalhado e utilizando diversas ferramentas fenotípicas e moleculares a fim de melhor caracterizar as diferenças entre as espécies pertencentes ao grupo *M. chelonae-abscessus*. Neste estudo, foram utilizadas cepas de referência de *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. immunogenum*, *M. massiliense* e *M. bolletii* e isolados provenientes do surto de infecções relacionadas a procedimentos cirúrgicos

que vem ocorrendo no Brasil desde 2004. Utilizando a técnica de hibridização DNA-DNA, considerada padrão ouro no delineamento de espécies bacterianas, o trabalho demonstrou que duas espécies recentemente descritas, *M. massiliense* e *M. bolletii*, não são geneticamente diferentes de *M. abscessus*. Esta conclusão foi corroborada pelos resultados obtidos com testes fenotípicos e genotípicos de identificação. Desta forma, ambas as espécies foram agrupadas em uma subespécie, *M. abscessus* subsp. *massiliense*, que difere de *M. abscessus* subsp. *abscessus* por possuir um padrão de bandas de PRA distinto e por diferenças nas sequências de *rpoB* e *hsp65*. (Leao e cols. 2009).

#### **1.4. Infecções causadas por MCRs**

Os tipos de infecções causadas por MCRs são diversos, sendo mais comuns as infecções cutâneas e de tecidos moles e infecções pulmonares, disseminadas ou então relacionadas à presença de cateteres (Brown-Elliott e Wallace 2002; Schinsky e cols. 2004; Colombo e Olivier 2008). As infecções são frequentemente caracterizadas por uma inflamação granulomatosa progressiva, podendo evoluir para a forma caseosa (Rodriguez e cols. 1997; Bartralot e cols. 2000; De Groote e Huitt 2006).

Os casos descritos de infecções por *M. abscessus* subsp. *massiliense* foram caracterizados por hiperemia local, formação de abscesso acompanhado de reação inflamatória aguda de evolução ulcerativa ou crônica, fistulação com secreção, dificuldade de cicatrização e ausência de resposta a tratamentos convencionais para infecções cutâneas (Cardoso e cols. 2008; Viana-Niero e cols. 2008).

## 1.5. Biologia das infecções por MCRs

No que tange às MCRs, a literatura é rica em trabalhos envolvendo aspectos clínicos e epidemiológicos (Falkinham 1996; Tortoli 2006), mas há uma carência inquestionável de trabalhos que investiguem a biologia da infecção causada por essas micobactérias.

Os trabalhos existentes que exploram a infecção *ex vivo* e *in vivo* por MCRs se concentram em 3 espécies principais: *M. abscessus*, *M. chelonae* e *M. fortuitum*. Encontram-se apenas 9 trabalhos publicados até o momento, nos quais a infecção por *M. abscessus* foi estudada em modelos animais e ensaios *ex vivo* (Saito e Tasaka 1969; Byrd e Lyons 1999; Howard e cols. 2006; Catherinot e cols. 2007; Chan e cols. 2007; Rottman e cols. 2007; Oberley-Deegan e cols. 2008; Ordway e cols. 2008; Shin e cols. 2008).

Em 1999, Byrd e Lyons observaram que a variante rugosa de um isolado clínico de *M. abscessus* causava infecção pulmonar persistente em modelo murino de animal imunodeficiente, enquanto a variante lisa era rapidamente eliminada dos pulmões. Além disso, apenas a variante rugosa foi capaz de se disseminar para o baço destes animais. Em paralelo, em ensaio de crescimento desta subespécie em monócitos humanos, a variante rugosa foi capaz de infectar e se multiplicar na cultura, enquanto que a lisa não infectou as células humanas.

O estudo posterior do mesmo grupo mostrou que, após passagens sucessivas da variante lisa em cultura sólida, um morfotipo rugoso revertente foi obtido, o qual readquiriu a habilidade de causar uma infecção persistente



em monócitos humanos e em pulmões de camundongos imunodeficientes (Howard e cols. 2006). Este trabalho indica que a habilidade de variar entre os morfotipos liso e rugoso pode permitir que *M. abscessus* transite entre um fenótipo apenas colonizante e uma forma mais virulenta e invasiva.

Mais recentemente, o estudo realizado por Catherinot e cols, 2007, demonstrou que uma variante rugosa de *M. abscessus* foi letal quando injetada endovenosamente em camundongos *knock-out*, em função de ser forte indutora da produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos murinos, sugerindo associação entre o fenótipo rugoso e patogenicidade.

Esse mesmo grupo estudou mais detalhadamente a resposta imune desencadeada e necessária para a contenção da infecção por *M. abscessus*. Utilizando animais *knock-out* para células T e B, IFN- $\gamma$  e TNF, foi demonstrado que esses componentes da resposta imune desempenham papel fundamental no controle da infecção no baço e fígado dos animais infectados (Rottman e cols. 2007). O aparecimento de colônias rugosas em camundongos *knock-out* para a cadeia  $\mu$  de imunoglobulina sugere que os glicopeptidolipídios, presentes apenas na parede de micobactérias que formam colônia lisa (Howard e cols. 2006), são o alvo principal da imunidade mediada por células B contra *M. abscessus*.

## **1.6. O granuloma na infecção por micobactérias**

Quando a infecção micobacteriana se estabelece, sua principal representação anatomo-patológica é a lesão granulomatosa (Davis e Ramakrishnan 2009). Granulomas são lesões inflamatórias crônicas focais,

sendo um importante componente das respostas imunes desencadeadas por patógenos tais como micobactérias, fungos, parasitas e helmintos. Além disso, esse tipo de reação inflamatória pode também se desenvolver pela exposição a partículas inertes, como a sílica (Adams 1976; Williams e Williams 1983).

O granuloma formado diante da infecção por micobactérias, em especial por *M. tuberculosis*, começa com o recrutamento de monócitos para um sítio de infecção periférica, onde eles internalizam os bacilos e migram para tecidos mais profundos. Há então a agregação de macrófagos e outras células do sistema imune com as células infectadas formando a estrutura granulomatosa. (Clay e cols., 2007; Wolf e cols., 2007)

A formação do granuloma é tida também como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Entretanto, a visualização da formação de granulomas em modelo de larvas de *zebrafish* infectadas com *M. marinum* revelou que o granuloma inicial é utilizado pela bactéria para sua expansão e evasão dos mecanismos do sistema imune (Volkman e cols., 2004; Davis e Ramakrishnan, 2009).

Com o objetivo de estudar melhor a capacidade de apresentação de antígenos de CEs, Cipriano e colaboradores descreveram em 2003 um modelo para a geração *in vitro* de CEs-*like*. Resumidamente, macrófagos murinos residentes de peritônio cultivados na presença de rIL-4 (*recombinant Interleukin-4*) por 7 dias assumem características morfológicas e funcionais semelhantes às anteriormente descritas para CEs encontradas em granulomas (Cipriano e cols. 2003). A disponibilidade desse modelo permitiu demonstrar a capacidade de apresentação de antígenos de CEs-*like*, corroborando que essa possa ser uma função relevante de CEs em granulomas.

Posteriormente foi avaliada a interação de CEs-*like* com *M. avium*, sempre em comparação com macrófagos residentes de peritônio (Chinen e cols. 2006). *M. avium* é uma micobactéria de crescimento lento que pode ser patogênica para o ser humano e que induz a formação de granulomas (Pierce 2009). Utilizando esta micobactéria como modelo, foi verificado que enquanto macrófagos residentes de peritônio permitiram a replicação bacilar, as CEs-*like* a impediram. Além disso, grande parte dos macrófagos morreu quando infectada (redução da cultura em aproximadamente 36% do número inicial de macrófagos, depois de 72 h de infecção), enquanto o número de CEs-*like* permaneceu constante. Vale ressaltar que o nível de infecção inicial (número de bacilos interiorizados por célula) foi o mesmo para as duas culturas celulares.

O envolvimento de citocinas no comportamento distinto da infecção nas culturas foi estudado e, corroborando dados da literatura, observou-se o aumento da liberação de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos peritoneais durante as 96 horas de infecção (Furney e cols. 1992; Ehlers e cols. 1999; Roach e Schorey 2002), enquanto que CEs-*like* mantiveram os níveis de liberação desta citocina constantes. Entretanto, CEs-*like* apresentaram um aumento da liberação de TGF- $\beta$  no decorrer das 96 horas, sendo que o mesmo não foi observado nas culturas de macrófagos controle. A explicação sugerida foi que os macrófagos controle tenham entrado em apoptose pela ação de TNF- $\alpha$ , cuja concentração foi aumentando no sobrenadante das culturas ao longo da infecção, o que não foi observado com CEs-*like*. Em contrapartida, TGF- $\beta$  produzido em grande quantidade pelas CEs-*like* pode ter desempenhado um papel na diminuição da produção de TNF- $\alpha$  e, muito provavelmente, na sua sobrevivência frente à

infecção. Diante disso concluiu-se que CEs-like são capazes de albergar *M. avium*, embora inibam sua replicação, enquanto macrófagos não modificados pela rIL-4 permitem a multiplicação bacilar e morrem.

Sendo *M. abscessus* subsp. *massiliense* uma subespécie recentemente descrita, não há na literatura, até o momento, trabalhos que abordem os aspectos imunobiológicos da infecção por ela causada. Juntamente com a escassez de trabalhos abordando a biologia da infecção por MCRs, há o fato de que não há um modelo estabelecido para tal investigação. Os trabalhos existentes divergem quanto à forma de inoculação *in vivo*, a linhagem de camundongos mais apropriada, assim como nos modelos de infecção de culturas celulares, *ex vivo*.

Os relatos associando *M. abscessus* subsp. *massiliense* a surtos são sugestivos de que cepas ambientais possam ter sofrido pressão seletiva e se tornado mais patogênicas. Considerando o exposto, é pertinente a comparação da infecção por *M. abscessus* subsp. *massiliense* no modelo de CEs-like e em modelo *in vivo*, a fim de elucidar aspectos de virulência e patogenicidade de isolados relacionados a surto e ambientais.

## **2. OBJETIVOS**

---

### **Objetivo geral:**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a patogenicidade e virulência de isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* relacionados ou não a surtos em modelos de infecção *in vivo* e *ex vivo*.

### **Objetivos específicos:**

1. Isolar colônias lisas e rugosas de isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* relacionados ou não a surtos;
2. Analisar a progressão da infecção pelos isolados selecionados em camundongos com relação à produção de citocinas e à cinética de eliminação dos bacilos ou estabelecimento da infecção.
3. Avaliar a evolução da infecção de macrófagos e de CEs-*like* pelos isolados de colônias lisas e rugosas assim como a produção de citocinas nessas culturas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### **3.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Balb/c machos com 8 a 12 semanas de idade, obtidos do CEDEME da UNIFESP e mantidos no biotério da Disciplina de Imunologia, com água e ração *ad libitum*.

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFESP-EPM sob o número 0924/07.

### **3.2. Lavagem das lamínulas para cultivo de macrófagos**

O cultivo de macrófagos peritoneais murinos foi feito sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasstécnica®, Brasil), previamente higienizadas pela manutenção por 30 minutos em detergente Extran® (MERCK, Alemanha) diluído 2000 vezes em água destilada. Foram feitas 10 lavagens com água destilada, com intervalo de 30 minutos entre cada, e mais duas, com água Milli-Q® (Millipore). As lamínulas foram secas com lenço de papel e autoclavadas.

### **3.3. Obtenção e cultivo de macrófagos peritoneais murinos e CEs-like**

Após o sacrifício dos camundongos em câmara de CO<sub>2</sub>, macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal pela injeção de aproximadamente 6 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Cultilab, Campinas-SP) gelado e estéril, com o auxílio de seringa e agulha. O número de células recuperadas foi estimado pela contagem em câmara de Neubauer (Inlab, Brasil) e o tubo contendo o lavado foi centrifugado por 6 minutos a 250 x g (LS-



3, CELM, Brasil). As células foram ressuspensas em meio RPMI-1640 em volume necessário para uma concentração final de células igual a  $2 \times 10^6$  células/ml.

Subsequentemente  $5 \times 10^5$  células foram plaqueadas sobre lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro (Glasstécnica®, Brasil) acomodadas em placas de 24 orifícios (Costar, EUA). Foram colocados 250  $\mu$ l da suspensão de células sobre cada lamínula, de forma a não permitir aderência dos macrófagos fora dos limites da mesma.

As placas contendo os macrófagos foram levadas à estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 30 minutos, para que os macrófagos aderissem às lamínulas. Após este tempo, foi feita a lavagem dos orifícios com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 3 vezes, para a retirada das células não aderentes.

À metade da placa contendo as lamínulas foram adicionados 500  $\mu$ l/poço de meio RPMI-1640 suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Campinas) e L-glutamina 2 mM (Sigma Chemical Co, EUA) por nós denominado R-5, e à outra metade, o mesmo volume de solução de rIL-4 (PeproTech Inc., EUA) 50 ng/ml em R-5. As placas foram mantidas por sete dias em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os macrófagos, cultivados em meio completo (R-5) e sem adição de rIL-4, foram utilizados como controles dos experimentos.

As mudanças morfológicas foram monitoradas diariamente usando microscópio invertido de contraste de fase (Axiovert S100, ZEISS, Germany).

### **3.4. Isolamento de variantes lisas e rugosas de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense***

Foram selecionados cinco isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* do surto que ocorreu em Belém-PA (2004-2005), aleatoriamente. Destes, 4 eram provenientes de cirurgia laparoscópica (isolados B47, B7, 735 e B41) e um de mamoplastia (isolado B22) (Viana-Niero e cols., 2008).

As bactérias foram plaqueadas em meio Luria-Bertani (LB), acrescido de 1,5% de Agar (Becton, Dickinson e Cia, EUA), e mantidas a 37°C até que formassem colônias visíveis.

Isolados que apresentavam colônias com morfologia lisa e rugosa misturadas foram escolhidos. Colônias das diferentes morfologias foram isoladas e cultivadas em meio sólido por 10 passagens, a fim de observar a manutenção do fenótipo. As bactérias das passagens iniciais foram mantidas a -80°C em meio LB acrescido de 15% de glicerol, para utilização posterior.

Em paralelo, os isolados de ambiente disponíveis no laboratório D16R27, D16Q19, D16Q13, D16Q14, D16Q16, D16Q20, D16R24 e D17A2 (gentilmente cedidos pela Profa. Françoise Portaels do Instituto de Medicina Tropical Príncipe Leopoldo, Antuérpia, Bélgica); um isolado de esgoto tratado, proveniente de Vitória-ES (isolado MG3-6); e um isolado de paciente não relacionado a nenhum surto (isolado B67) foram descongelados e plaqueados em meio LB-ágar. As culturas foram mantidas a 37°C ou à temperatura ambiente. As culturas com colônias de fenótipo liso ou rugoso foram congeladas em meio LB acrescido de 15% de glicerol, para uso posterior.

### **3.5. Identificação bacteriana**

A identificação das bactérias foi realizada usando o método molecular de identificação denominado PRA-*hsp65* (*PCR-Restriction Enzyme Analysis*) conforme descrito por Leão e cols., 2005. Em resumo, foi feita a amplificação do gene *hsp65* e a digestão do produto da reação com as enzimas Bst EII (Promega, EUA) e Hae III (Invitrogen Life Technologies, EUA). Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 4% (Bioamerica Inc, EUA), e o perfil de bandas obtido foi comparado ao algoritmo de PRA-*hsp65* do PRAsite (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>). Os isolados foram também genotipados por *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) como descrito por Viana-Niero e cols., 2008.

### **3.6. Curva de crescimento das micobactérias de crescimento rápido**

Uma colônia individualizada de cada variante fenotípica dos isolados B47, B7, MG3-6 e B67 foi colocada em 1 ml de meio LB líquido juntamente com pérolas de vidro (para o rompimento dos grumos de bactérias), e este pré-inóculo foi cultivado a 37°C sob agitação (TE420, Tecnal, Brasil). No dia seguinte, foram acrescentados mais 9 ml de meio LB e feita a leitura da densidade óptica a 560 nm (D.O.<sub>560</sub>) em espectrofotômetro UV1601 (Shimadzu, Japão). Cem microlitros do inóculo foram diluídos seriadamente e as últimas diluições plaqueadas em meio LB-agar. As culturas foram mantidas a 37°C até a formação de colônias visíveis para contagem das unidades formadoras de colônia (UFCs). A leitura da densidade óptica e o plaqueamento das diluições

foram feitos em intervalos de 24 h, e o gráfico relacionando o número de bactérias/ml x D.O.<sub>560nm</sub> foi feito com base na contagem das UFCs.

### **3.7. Ensaio de infecção intraperitoneal**

O pré-inóculo de bactérias e a determinação da concentração foram feitos da mesma forma que no item 3.6. Camundongos Balb/c machos, de aproximadamente oito semanas, foram infectados intraperitonealmente com  $1 \times 10^7$  bactérias/500  $\mu$ l de solução fisiológica estéril e livre de pirógenos. Após 1, 2, 4, 7, 14 e 90 dias, foi coletado sangue dos animais pelo plexo ocular, e o soro foi separado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Em seguida os animais foram sacrificados em câmara de  $\text{CO}_2$ . Foi feito o lavado peritoneal de cada animal com meio RPMI-1640. As células recuperadas foram contadas, e o lavado foi diluído seriadamente e semeado sobre meio LB sólido. Também, 1 ml do lavado foi centrifugado a  $90 \times g$  por 5 minutos, e o sedimento ressuspendido em  $\text{H}_2\text{O}$  MilliQ<sup>®</sup> para a lise das células. Amostras dos sobrenadantes dos tubos foram plaqueadas para que se assegurasse a inexistência de bactérias livres. O baço dos animais foi retirado assepticamente, pesado, macerado e diluições da suspensão obtida foram plaqueadas em meio LB sólido. Baços escolhidos aleatoriamente foram fixados em solução de formaldeído 10% (Quimex, Brasil) para posterior análise histopatológica.

Como controle, camundongos Balb/c de aproximadamente oito semanas foram inoculados com 500  $\mu$ l de solução fisiológica por via intraperitoneal.

As colônias recuperadas do lavado peritoneal e do baço dos animais infectados foram identificadas por PRA-*hsp65* para confirmação da espécie.

### **3.8. Ensaio de infecção endovenosa**

A fim de melhor avaliar a infecção *in vivo* dos isolados utilizados, experimentos adicionais foram realizados. Para tal, 4-5 camundongos Balb/c de aproximadamente oito semanas foram infectados pela veia lateral da cauda, com aproximadamente  $1 \times 10^7$  bacilos/200  $\mu$ l de solução fisiológica estéril e livre de pirógenos. Após 1, 2, 7 e 14 dias, o sangue dos animais foi coletado do plexo ocular, e o soro separado e armazenado a -20°C para posterior dosagem de citocinas. Em seguida, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, e os baços e os fígados foram removidos assepticamente. O macerado dos órgãos foi diluído seriadamente e plaqueado em meio LB-ágar, para quantificação das UFCs.

Como controles, foram utilizados camundongos Balb/c de aproximadamente oito semanas, inoculados com 200  $\mu$ l de solução fisiológica pela veia lateral da cauda.

### **3.9. Ensaio de infecção *ex vivo***

Para os experimentos de infecção, os isolados B7 (L e R), MG3-6 e B67 foram escolhidos. Bactérias da segunda passagem em meio sólido, descongeladas previamente, foram utilizadas em todos os experimentos. Após aproximadamente seis dias em cultura, uma colônia individualizada de cada

isolado foi cultivada por 24 h em 1 ml de meio LB líquido contendo pérolas de vidro. Então, foram adicionados 9 ml de meio líquido, e o pré-inóculo foi mantido por mais 2 dias a 37°C sob agitação (TE420, Tecnal, Brasil). No dia da infecção foi feita a leitura da D.O.<sub>560</sub>, e a concentração de bactérias do pré-inóculo foi estimada de acordo com a equação obtida a partir da curva de crescimento de cada variante. As culturas de macrófagos e CEs-*like* foram co-cultivadas com as variantes de micobactéria na proporção de 10:1, 5:1 e 0,5:1 bactérias por célula, em meio RPMI-1640 sem antibiótico por 1 ou 4 h. Em seguida, as culturas foram lavadas 4 vezes com PBS, e meio R-5 contendo amicacina (30 µg/ml) (Eurofarma, Brasil) foi adicionado. As células foram fixadas com metanol (Quimex, Brasil), a 4°C por 5 minutos, logo após o tempo de co-cultura, assim como depois de 24 e 48 h as lamínulas foram coradas pelo método de Ziehl-Neelsen, e observadas sob microscopia óptica de luz, no aumento de 1000x. Nesses mesmos tempos, foi coletado sobrenadante das culturas para posterior dosagem de citocinas.

Concomitantemente à infecção, 100 µl do pré-inóculo foram diluídos seriadamente, e 50 µl das últimas diluições foram semeados sobre placas de LB-ágar em triplicata, para confirmação da concentração de bactérias viáveis do pré-inóculo utilizado.

A quantificação da infecção foi feita com base na contagem da porcentagem de células infectadas, e o número de bacilos presentes em, no mínimo, 100 células por lamínula.

### **3.10. Dosagem de citocinas pró-inflamatórias**

Foi utilizado o *kit* comercial BD<sup>TM</sup> Cytometric Bead Array (CBA) – *Mouse Inflammation Kit* (BD Biosciences, EUA), conforme especificações do fabricante, para dosar a produção de TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , MCP-1, IL-10 e IL-6.

Brevemente, o padrão foi reconstituído e diluído em série. Em seguida, 10 ml de cada suspensão de pérolas fluoresceinadas (distintas umas das outras pela intensidade de fluorescência emitida) e adsorvidas com anticorpos para captura das diferentes citocinas foram misturadas em um tubo de ensaio. Na sequência, 50 ml dessa mistura foram transferidos para cada tubo contendo a amostra a ser analisada. Após, o reagente de detecção composto por anticorpos de detecção conjugados a fluoresceína ou ficoeritrina (50 ml/tubo) foi adicionado. Os tubos foram incubados por 2 h a temperatura ambiente, protegidos da luz. As pérolas foram então lavadas com 1 ml de tampão de lavagem (fornecido pelo fabricante) e centrifugadas a 200 x g por 5 minutos (Sorval® RT6000D). Os sobrenadantes foram cuidadosamente aspirados e descartados. As pérolas foram ressuspensas em 300 ml de tampão de lavagem e a reação foi lida em citômetro, segundo orientação do fabricante (Becton Dickinson FACSCalibur, BD Bioscience, EUA).

### **3.11. Dosagem de TGF- $\beta$**

A concentração de TGF- $\beta$  produzida após as infecções *in vivo* e *ex vivo* foi dosada utilizando o *kit* comercial DuoSet® ELISA (R&D Systems, EUA) para dosagem de TGF- $\beta$ 1, conforme especificações do fabricante. Brevemente,

placas de poliestireno para ensaios de ELISA (Costar, EUA) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (2,0 µg/ml). Todas as etapas subsequentes foram precedidas de 3 lavagens das placas com tampão de lavagem (Tween<sup>®</sup>20 0,05% em PBS, pH 7,2-7,4) (Sigma Chemical Co., EUA). Os sítios inespecíficos foram bloqueados com uma solução de 5% de Tween<sup>®</sup>20 em PBS contendo 0,05% de NaN<sub>3</sub> (Sigma Chemical Co., EUA).

Para as amostras de soro, uma diluição prévia de 20 vezes foi realizada. As amostras foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente, e um anticorpo de galinha anti-TGFβ1 biotilado (300 ng/ml) foi utilizado. Posteriormente foi adicionada estreptavidina-HRP por 20 minutos, seguida da adição do substrato cromogênico OPD (orto-fenilenodiamina; 3 µg/mL) na presença de peróxido de hidrogênio a 0,03 % (v/v) em tampão citrato de sódio 4N. A quantificação da reação foi feita pela leitura espectrofotométrica da absorbância a 492nm de comprimento de onda.

A curva padrão foi confeccionada com o auxílio do programa computacional GraphPad Prism<sup>®</sup>, utilizando uma curva de 4 parâmetros logísticos, e as concentrações correspondentes aos valores de leitura obtidos foram calculados por interpolação.

### **3.12. Análise histopatológica**

Os baços dos animais infectados por via intraperitoneal foram fixados com formaldeído 10% (Nuclear, Brasil) e processados para análise histológica. Cortes sequenciais foram feitos e corados com hematoxilina-eosina e Ziehl-Neelsen. A análise foi realizada em colaboração com a patologista Dra.



Maria da Glória Mattosinho de Castro Ferraz, do Departamento de Patologia da UNIFESP.

### **3.13. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. Para determinação das diferenças estatísticas entre duas médias, foi aplicado o teste “t” de Student. Para determinação das diferenças estatísticas entre 3 ou mais médias, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. As análises foram realizadas no programa computacional GraphPad Prism<sup>®</sup> para Windows (versão 5.01). O nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## **4. RESULTADOS**

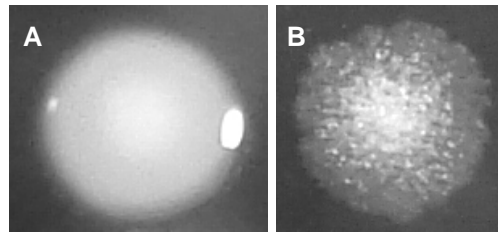
---

#### **4.1. Isolamento de variantes lisas e rugosas de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense***

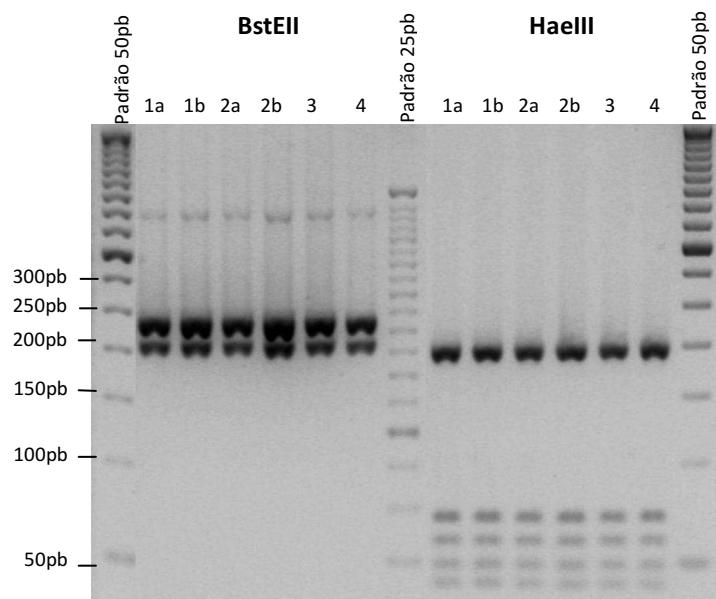
Dentre os cinco isolados do surto de Belém testados, apenas os isolados B47 e B7 apresentaram no primeiro plaqueamento uma mistura de colônias lisas e rugosas, sendo que havia predominância de colônias lisas em ambos. Entretanto, o isolado MG3-6, proveniente de amostra de esgoto de Vitória-ES, assim como o obtido de abscesso pós-injeção B67, apresentavam colônias rugosas ou lisas, respectivamente, não apresentando colônias de diferentes fenótipos misturadas. Todos os isolados provenientes da Bélgica foram identificados como *M. chelonae* e, portanto, descartados da nossa amostragem.

As colônias foram separadas e mantiveram seu fenótipo após 10 passagens em meio sólido. Foram consideradas lisas, as colônias com borda bem definida e superfície úmida e lisa; e rugosas, as colônias com borda irregular, superfície seca e enrugada (Figura 1). Além disso, após o congelamento das bactérias e posterior descongelamento e cultivo, não houve reversão da morfologia da colônia de nenhum isolado.

Foi feita a identificação de ambas as variantes de colônia dos isolados B47 e B7, e dos isolados B67 e MG3-6 pelo método de PRA-*hsp65*, tanto na primeira, quanto na décima passagem, e a análise mostrou que tanto as colônias lisas quanto as rugosas mantiveram o perfil de *M. abscessus* 2 (Figura 2), e portanto a diferença na morfologia das colônias não era devido à possível mistura de diferentes espécies.

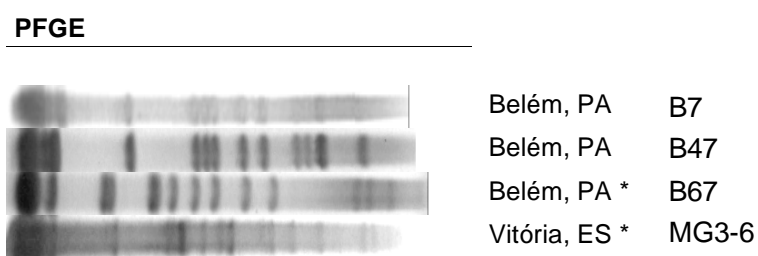


**Figura 1** – Morfologia das colônias dos isolados B47 e B7 de *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* do surto de Belém 2003-2004. Colônias isoladas após 10 passagens em meio sólido. **A.** Colônia lisa, com borda definida e superfície úmida e lisa. **B.** Colônia rugosa, com borda irregular e superfície seca e enrugada. Aumento de 10x.



**Figura 2** – Identificação dos isolados de *Mycobacterium abscessus* subs. *massiliense* por PRA-*hsp65*. Após 10 passagens em meio sólido, os isolados B47 (1) e B7(2), ambos do surto de Belém 2004-2005; B67 (3), de abscesso pós-injeção de um paciente; e MG3-6 (4), de amostra de esgoto tratado de Vitória, apresentaram o perfil de *M. abscessus* 2, não havendo diferença de identificação para as bactérias de colônia lisa (1a, 2a e 3) ou as de colônia rugosa (1b, 2b e 4).

Todos os isolados do surto de Belém e o isolado B67 foram analisados por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e por análise da sequência do gene *rpoB*. Os resultados mostraram que os 2 isolados do surto pertenciam a uma mesma cepa e que o isolado B67 pertencia a uma cepa distinta (Viana-Niero e cols, 2008). Posteriormente, o isolado MG3-6 foi analisado pela pós-doutoranda Cristina Viana-Niero (Bolsa FAPESP de PD proc. nº 04/07394-5) pela mesma metodologia e também apresentou perfil de bandas de PFGE distinto, mostrando que esta cepa é distinta daquela do surto de Belém (Figura 3).



**Figura 3** – *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis* (PFGE) - Genotipagem dos isolados do surto de Belém, B67, e MG3-6. \* isolados não relacionados ao surto.

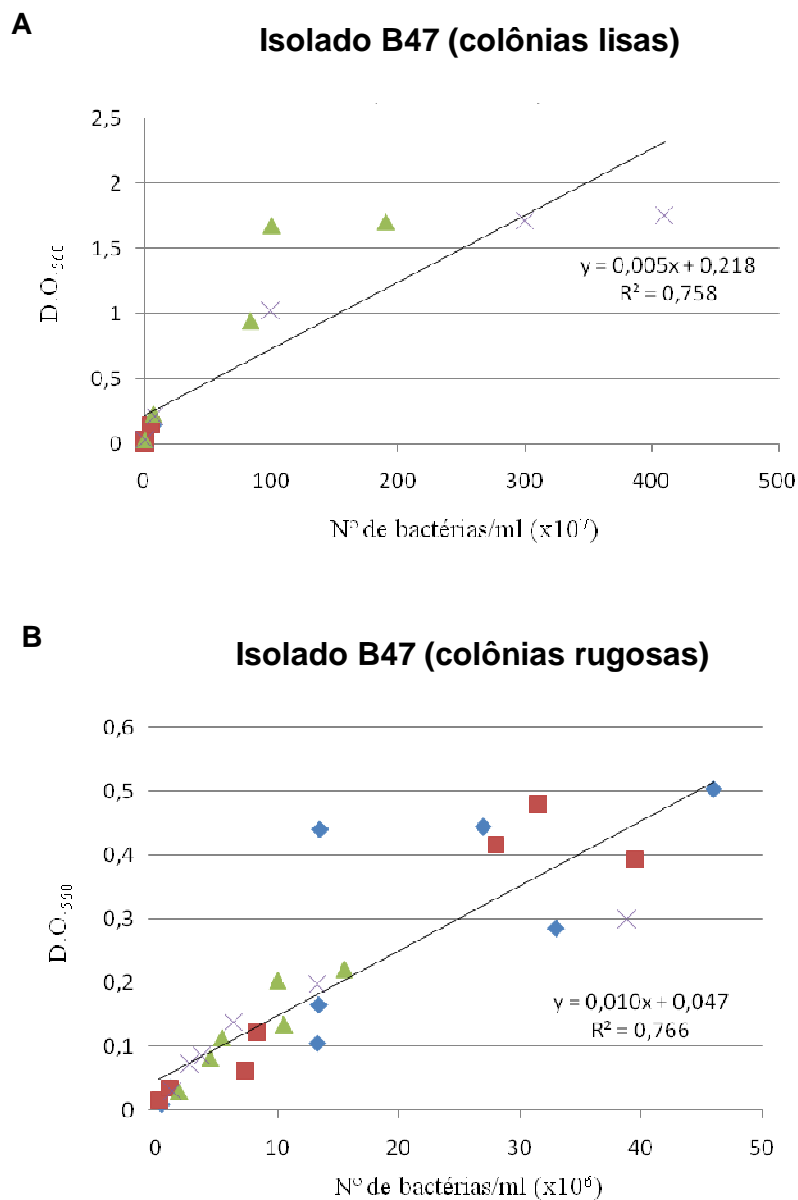
Desta forma, neste trabalho utilizamos 4 isolados, correspondendo a 3 cepas diferentes, sendo uma cepa relacionada ao surto de Belém, e duas cepas distintas e não relacionadas ao surto.

## 4.2. Curvas de crescimento

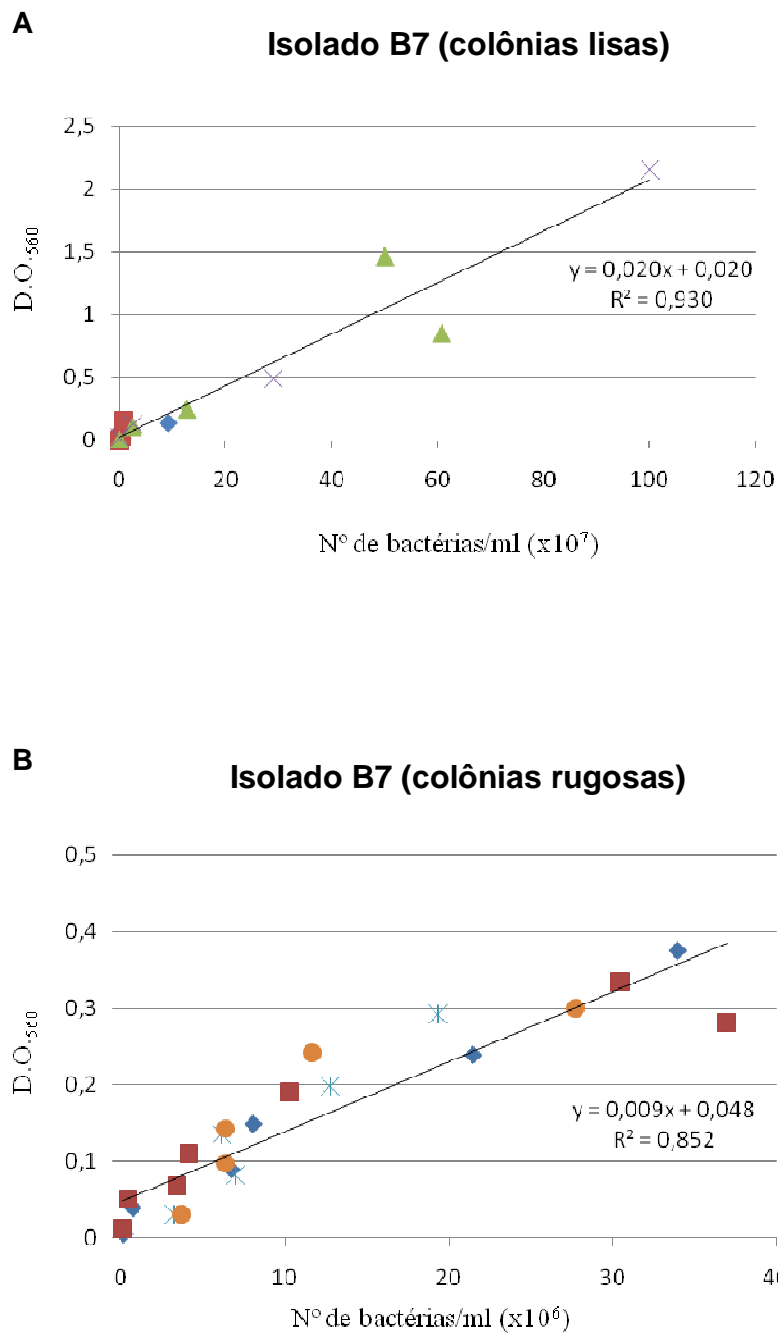
Uma vez que nos experimentos de infecção *in vivo* e *ex vivo* foram utilizados inóculos de bactéria fresca, foi feita a curva de crescimento dos isolados B47 (liso e rugoso) e B7 (liso e rugoso), MG3-6 e B67. Os resultados dos experimentos foram analisados com base na leitura da absorbância dos inóculos a 560 nm e na contagem das UFCs das diluições plaqueadas.

Ao relacionar a densidade óptica com o tempo decorrido do início do cultivo em meio líquido (tempo 0), foi observado que os inóculos de bactéria de colônia rugosa levaram mais tempo (aproximadamente 150 h) que aqueles das lisas (cerca de 80 h) para alcançar a fase estacionária de crescimento. Além disso, o platô era alcançado em densidades ópticas distintas, lidas a 560 nm de comprimento de onda, sendo aproximadamente 1,5 o máximo alcançado pelos inóculos de bactérias lisas, e 0,5 pelas rugosas. Devido a essas diferenças, a curva de crescimento das bactérias lisas foi feita em cinco dias, e a das rugosas, em nove dias (Figuras 4, 5 e 6).

As curvas de crescimento obtidas utilizando o isolado B7 tiveram o valor de  $R^2$  mais próximo de 1 (Figura 5, **A** e **B**), ou seja, o grau de correlação entre as variáveis é positivo e alto. Biologicamente, isso indica que este isolado apresentou um crescimento mais homogêneo em meio líquido, de forma que, ao utilizarmos inóculos frescos destas bactérias poderíamos estimar o número de bacilos/ml pela leitura da sua densidade óptica. Assim, utilizamos este isolado como representante do surto de Belém, assim como os isolados B67 e MG3-6 para os experimentos de infecção *in vivo* e *ex vivo*.

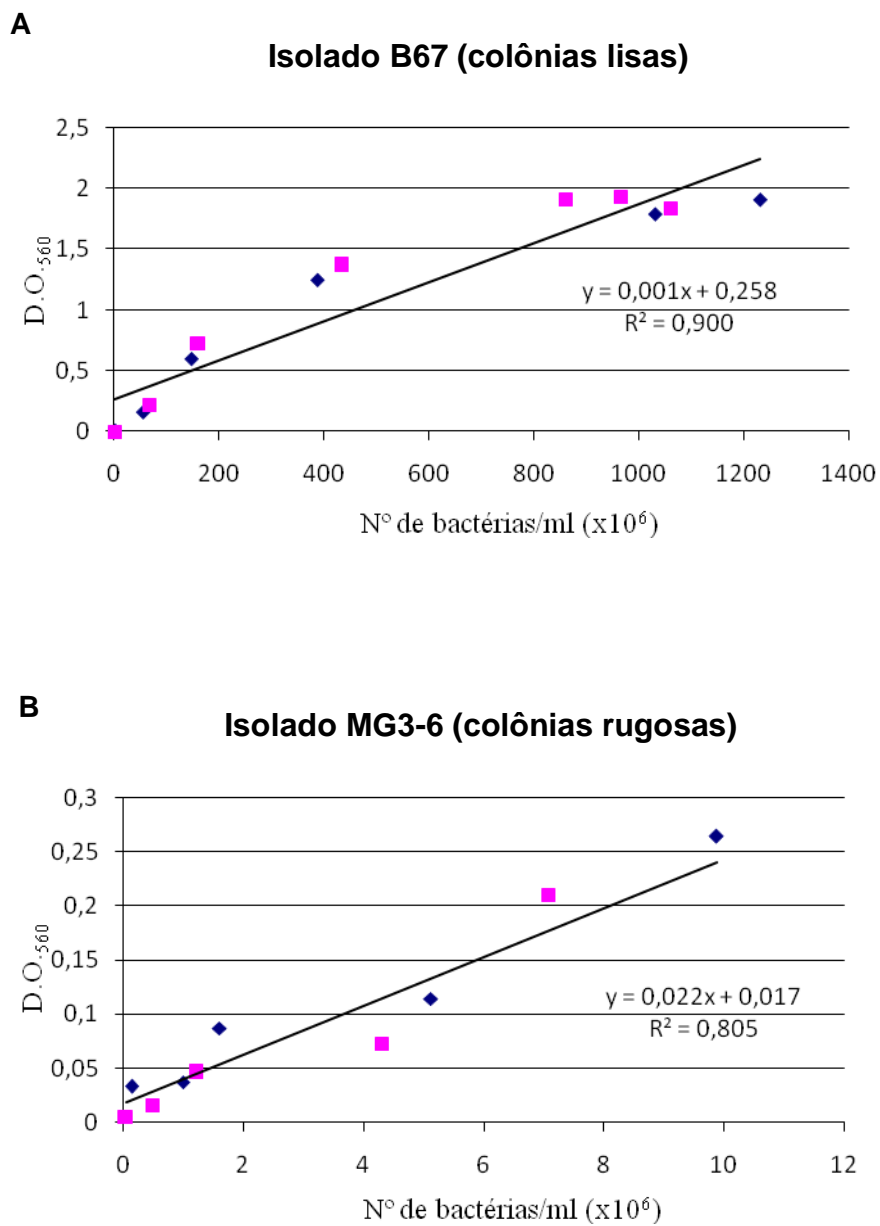


**Figura 4** – Relação entre D.O. <sub>560</sub> e UFCs do isolado B47: colônias lisas (**A**) e rugosas (**B**). Os gráficos representam os resultados obtidos em 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. A equação da reta foi obtida pela média das retas de cada experimento.  $R^2$ : quadrado do coeficiente de correlação de Pearson.



**Figura 5** – Relação entre D.O.<sub>560</sub> e UFCs do isolado B7: colônias lisas (**A**) e rugosas (**B**). Os gráficos representam os resultados obtidos em 2 experimentos independentes feitos em duplicatas. A equação da reta foi obtida pela média das retas de cada experimento.  $R^2$ : quadrado do coeficiente de correlação de Pearson.





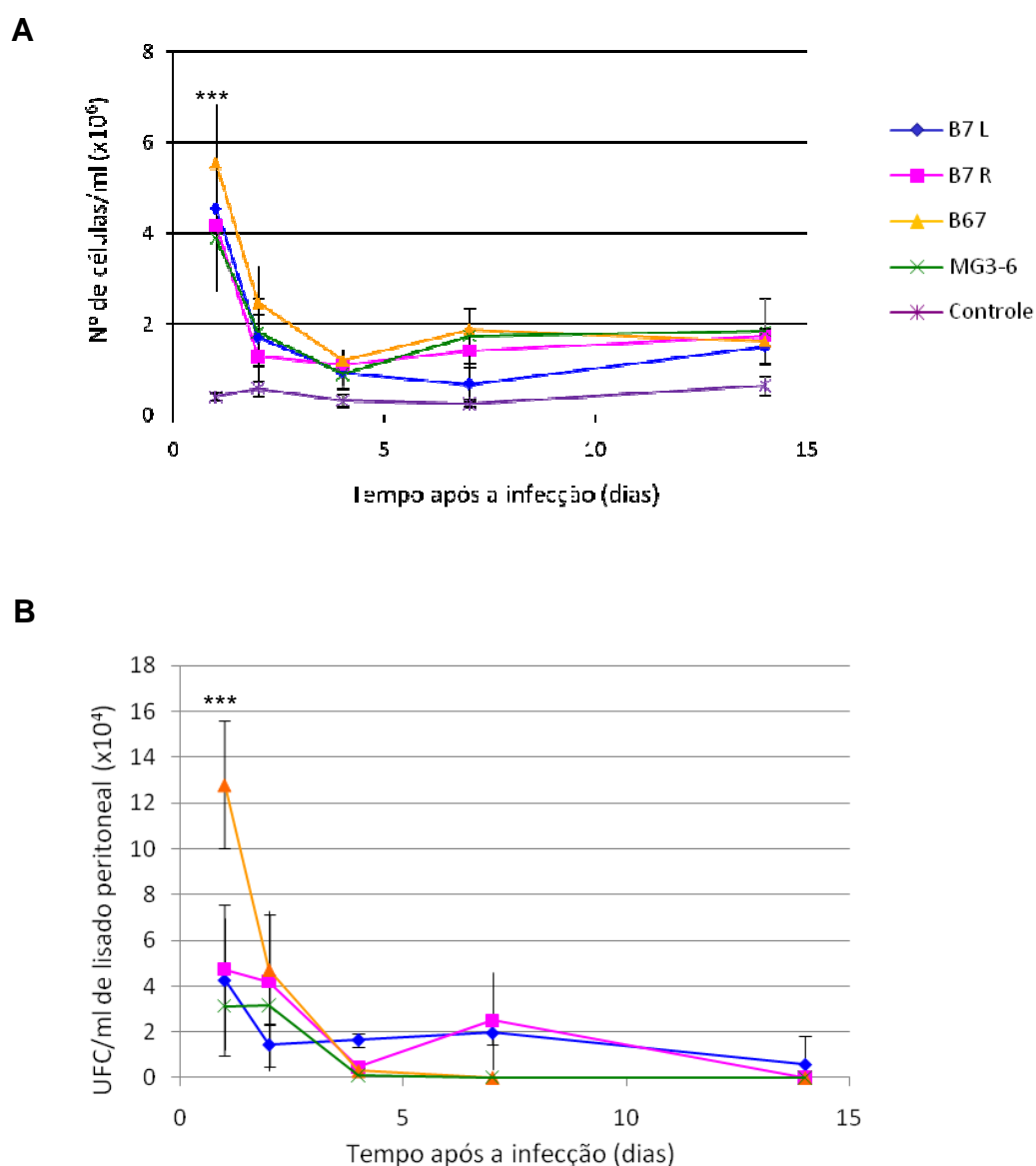
**Figura 6** – Relação entre D.O.<sub>560</sub> e UFCs dos isolados: B67 (A) e MG3-6 (B). Os gráficos representam os resultados obtidos em um experimento feito em duplicatas. A equação da reta foi obtida pela média das retas.  $R^2$ : quadrado do coeficiente de correlação de Pearson.

### 4.3. Ensaio de infecção intraperitoneal

Alguns dos trabalhos existentes na literatura, que envolvem a inoculação de micobactéria por via intraperitoneal, utilizam desde  $10^3$  UFCs até  $5 \times 10^7$  UFCs/ animal (Hogan e cols, 2001; Ghosh e cols, 2004; Viegas e cols, 2007; Biketov e cols, 2007). Em nossos experimentos, utilizamos sempre  $10^7$  UFCs/animal.

Um dia após a infecção houve o aumento significativo da concentração de células obtidas pela lavagem da cavidade peritoneal dos animais ( $p < 0,001$ ) quando comparada à concentração de células do grupo controle, porém não houve diferença estatística entre os isolados (B7 L, B7 R, B67 e MG3-6). Durante os 13 dias subsequentes estudados, a concentração de células peritoneais manteve-se estatisticamente igual à concentração de células do grupo controle (Figura 7 A).

Para quantificar as bactérias livres no peritônio, e também aquelas que foram internalizadas por células residentes, foi feita lise celular do precipitado obtido pela centrifugação do lavado peritoneal. Os resultados obtidos quando os animais foram infectados com B7 L, B7 R e MG3-6 foram estatisticamente iguais, e diferiram daqueles obtidos com B67, apenas após 1 e 2 dias da infecção ( $p < 0,001$ ). Observamos também que após 14 dias da infecção o número de bacilos presentes no peritônio, livres ou no interior de células, foi muito inferior a  $10^3$  UFCs/ml de lisado celular para todos os grupos (Figura 7 B).



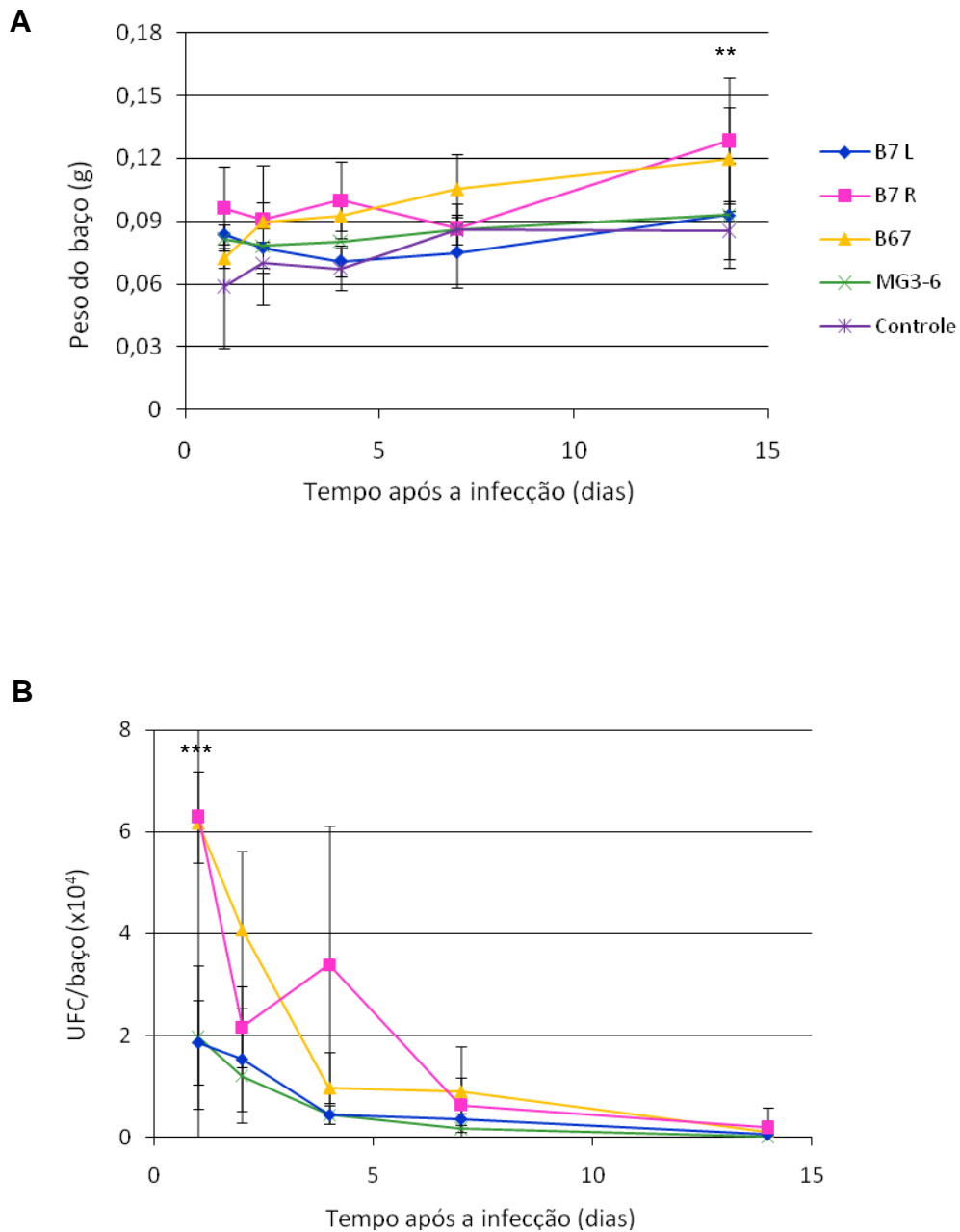
**Figura 7** – Quantificação do infiltrado celular peritoneal e cinética de eliminação das micobactérias no peritônio de animais infectados via intraperitoneal. Camundongos Balb/c foram infectados com os isolados B7 L e R, do surto de Belém; B67 de abscesso pós-injeção; e MG3-6 de esgoto pós-tratamento ( $n=7$ ). **(A)** Concentração celular no lavado peritoneal dos animais infectados e do grupo controle. **(B)** Número de bactérias viáveis recuperadas do lisado do lavado peritoneal dos animais infectados. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni e representam a média  $\pm$  desvio padrão ( $***p < 0,001$ ).

A princípio, tínhamos como objetivo apenas observar a cinética de eliminação das bactérias presentes no peritônio, e a resposta imune estimulada frente à infecção por análise de citocinas. Entretanto, no 7º dia do primeiro experimento, o baço do animal infectado com o isolado B7 R era significativamente maior que o do animal infectado com o isolado B7 L. Assim, nos experimentos seguintes também analisamos a infecção no baço dos animais.

Apenas após 14 dias de infecção observamos uma diferença estatisticamente significativa no tamanho dos baços quando os animais foram infectados com os isolados B7 R e MG3-6, com relação ao controle ( $p < 0,01$ ) (Figura 8 A). Animais infectados com B7 R por 90 dias apresentaram baços maiores (peso médio de 0,1629g,  $p < 0,001$ ) que os demais grupos, sendo esta diferença significativa.

Após este tempo não foram recuperados bacilos viáveis do baço e do fígado dos animais infectados, mostrando que, apesar das diferenças observadas nos tempos iniciais estudados, em longo prazo, todos os grupos foram capazes de eliminar as bactérias.

Após a infecção peritoneal de camundongos Balb/c com *M. abscessus* subsp. *massiliense*, as bactérias migraram para o baço, onde permaneceram vivas por pelo menos 14 dias, embora poucos bacilos fossem viáveis neste período. No dia seguinte ao da infecção, a quantidade de bacilos viáveis recuperados dos baços dos animais infectados com B7 R e B67 foi estatisticamente diferente daquela recuperada dos animais infectados por B7 L e MG3-6 ( $p < 0,001$ ) (Figura 8 B).



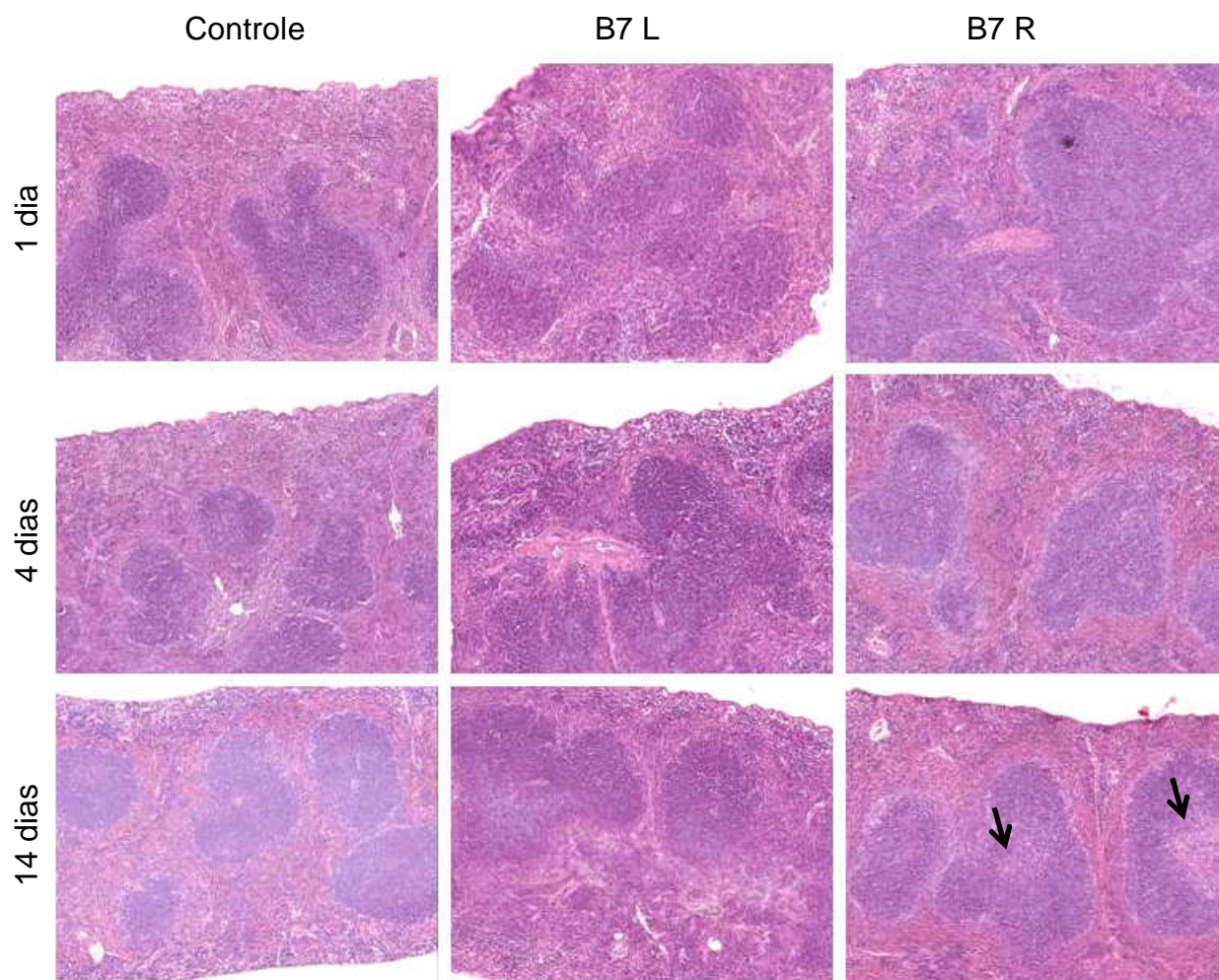
**Figura 8** – Análise da infecção intraperitoneal no baço dos animais. **(A)** Peso dos baços dos animais infectados. **(B)** Quantificação da presença de bacilos viáveis no baço dos animais infectados. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni e representam a média  $\pm$  desvio padrão. (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ )

A análise histológica dos baços mostrou que logo após um dia da infecção, os folículos linfóides apresentavam uma hipertrofia evidente, a qual se manteve durante os 14 dias estudados para todos os grupos. Após 14 dias da infecção, os animais infectados com o isolado B7 R apresentavam necrose folicular central aguda, sendo que o mesmo não foi observado para os demais grupos (Figura 9).

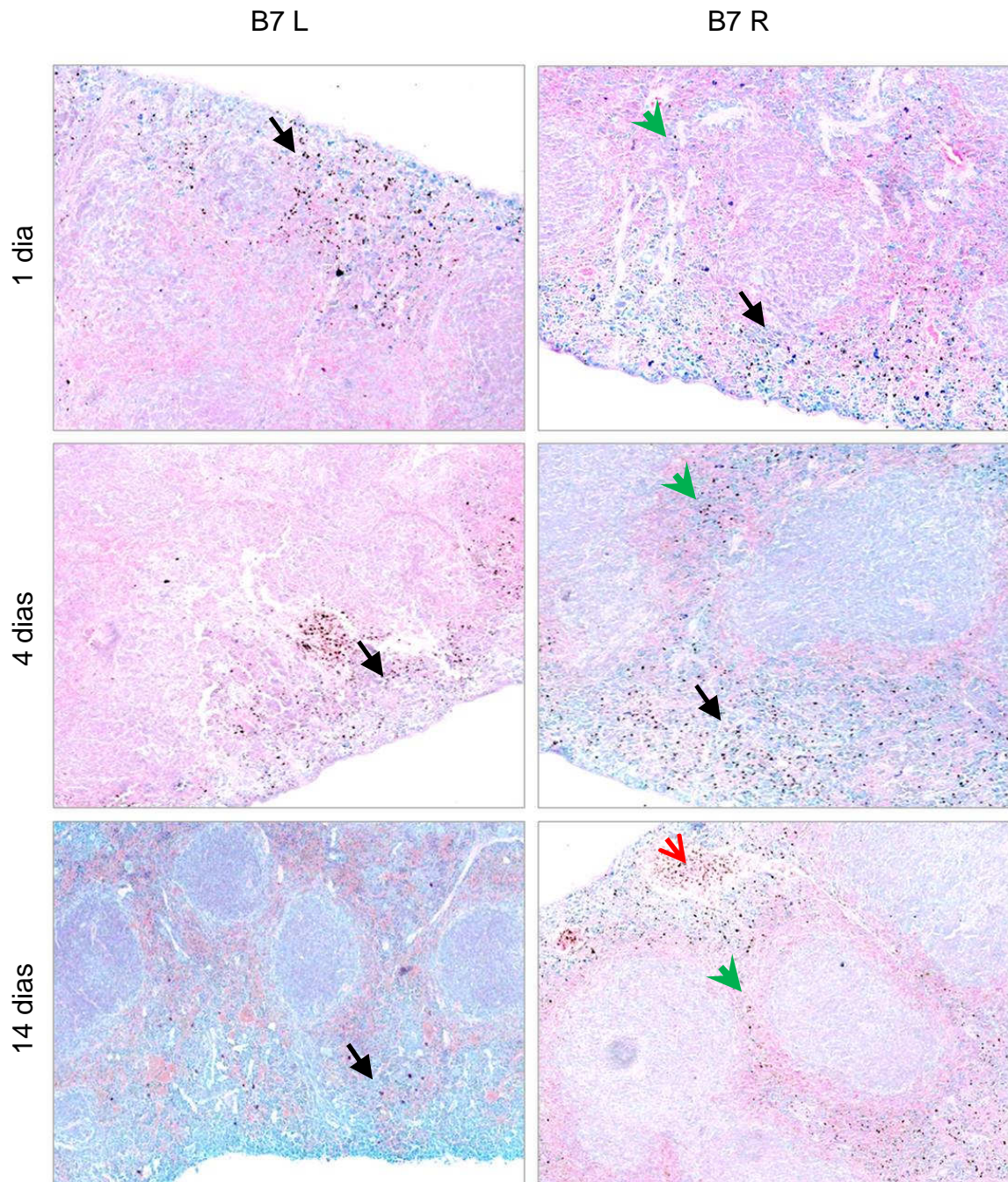
A maior diferença observada foi quanto à localização dos bacilos, que ficaram restritos à região da polpa vermelha para os animais infectados pelos isolados B7 L, B67 e MG3-6, sendo que se espalharam para a zona perifolicular após 4 dias de infecção pelo isolado B7 R, atingindo vasos de maior calibre após 14 dias (Figura 10).

Para alguns animais infectados com os isolados B7 L e B67, houve a recuperação de micobactérias de fenótipo rugoso após 14 dias da infecção.

A dosagem de citocinas dos soros dos camundongos infectados por via intraperitoneal mostrou que a resposta estimulada foi, do ponto de vista das citocinas analisadas, a mesma (Figura 11). Adicionalmente, a produção de TGF- $\beta$  não foi estimulada diferentemente pela infecção por nenhum dos isolados.

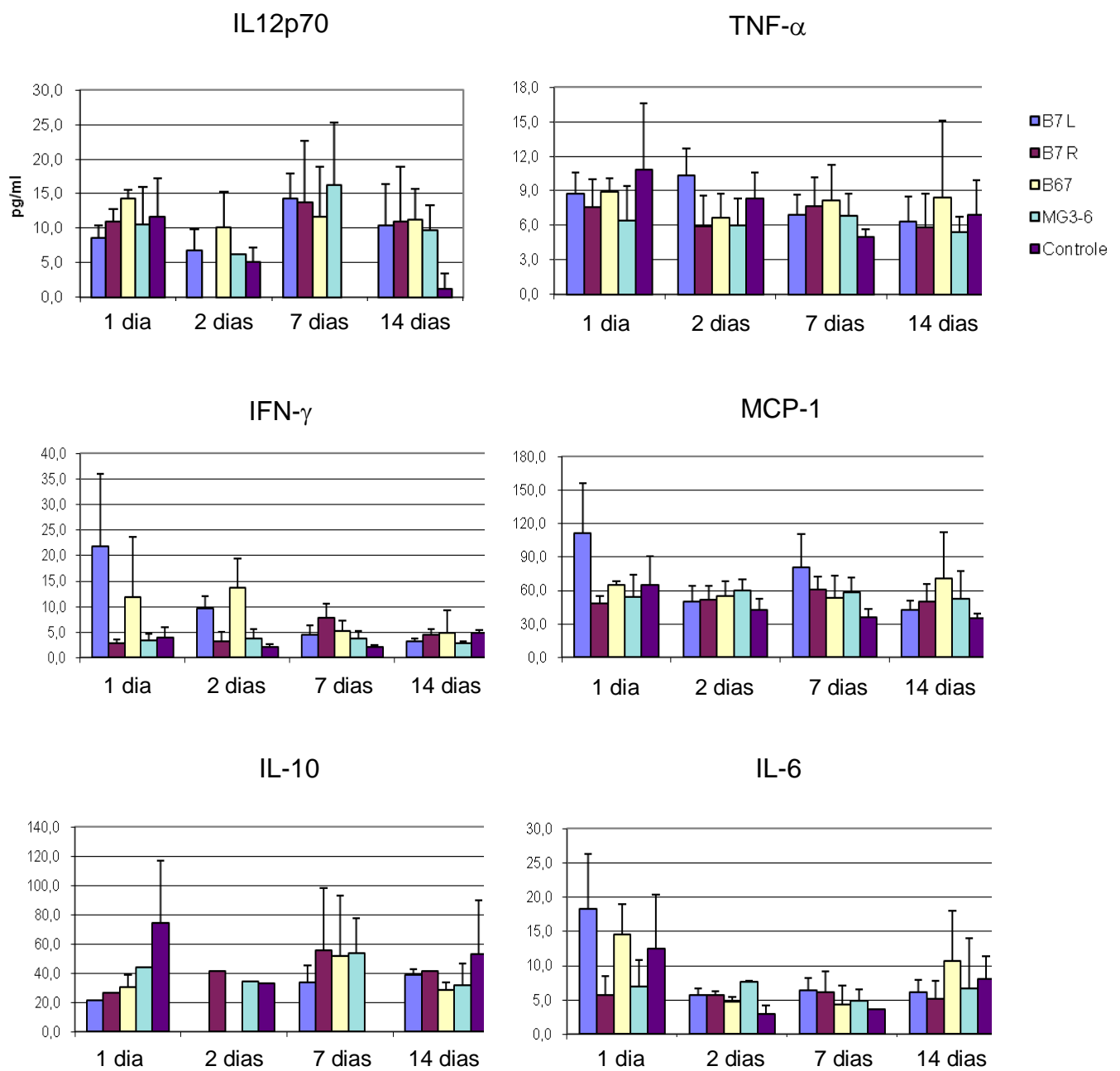


**Figura 9** – Análise histológica dos baços dos animais infectados via intraperitoneal pelos isolados B7L e R. Coloração por HE para visualização das estruturas do tecido. Após 14 dias de infecção, os baços dos animais infectados com o isolado B7 R apresentam necrose folicular aguda (setas). Os animais infectados com os isolados B67 e MG3-6 apresentaram mesma evolução da infecção observada para B7 L.



**Figura 10** – Análise histológica dos baços dos animais infectados via intraperitoneal pelos isolados B7 L e R, utilizando coloração de Ziehl-Neelsen para evidenciação da presença de bacilos no órgão. Bacilos localizados na polpa vermelha (setas pretas), zona perifolicular (setas verdes) e em vasos de maior calibre (seta vermelha). Para B67 e MG3-6 foram obtidas imagens semelhantes às obtidas para B7 L.





**Figura 11** – Dosagem de citocinas pró-inflamatórias nos soros de camundongos Balb/c infectados via intraperitoneal pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6. Como controle, solução fisiológica foi injetada por via intraperitoneal em camundongos Balb/c. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni e representam a média  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.4. Ensaio de infecção endovenosa

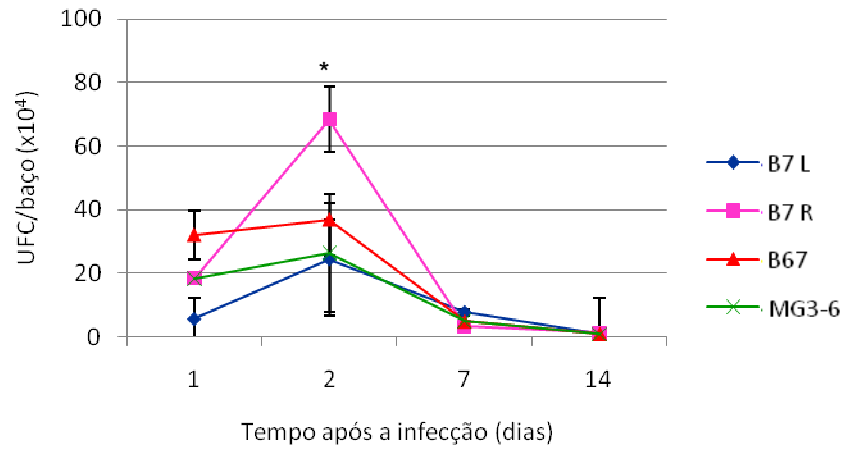
Considerando os trabalhos que abordaram o estudo da infecção de *M. abscessus* em camundongos por via endovenosa, foram realizados experimentos com delineamento experimental semelhante, utilizando  $1 \times 10^7$  bactérias/animal.

Utilizando camundongos Balb/c, após 14 dias da infecção o número de bacilos recuperados do baço e do fígado dos animais foi semelhante. Apenas após 2 dias da infecção foi observada diferença significativa para os animais infectados com o isolado B7 R, dos quais foi recuperado um número estatisticamente maior de bacilos viáveis (Figura 12 A).

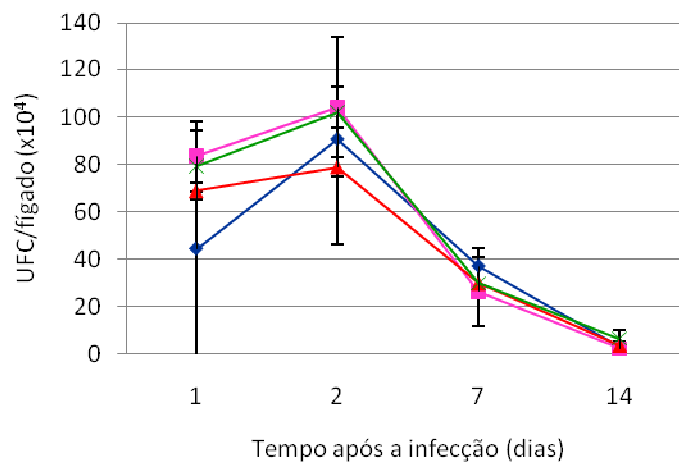
A mudança de estratégia de infecção mostrou que nos tempos iniciais, os animais infectados pelos isolados B7 L, B67 e MG3-6 apresentavam concentrações séricas de TGF- $\beta$  significativamente menores, quando comparadas com as apresentadas pelo controle. Após os 14 dias observados, as concentrações desta citocina retomaram os níveis observados para animais não infectados (Figura 13).

Interessantemente, colônias rugosas foram recuperadas de baços e fígados de animais infectados pelos isolados B7 L e B67 após 14 dias da infecção, assim como observado para a infecção intraperitoneal (Figura 14), lembrando que este fenômeno não foi observado *in vitro* após 10 passagens.

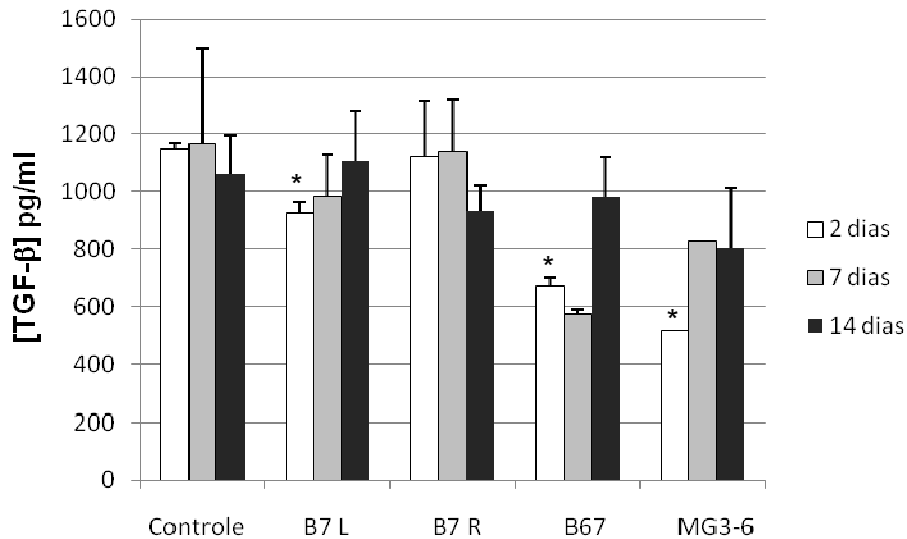
**A**



**B**



**Figura 12** – Análise da infecção endovenosa de camundongos Balb/c pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6 (n=5). Como controle, solução fisiológica foi injetada pela veia lateral da cauda de camundongos Balb/c. Os resultados foram analisados por ANOVA de duas vias, seguido do pós-teste de Bonferroni e representam a média  $\pm$  desvio padrão. ( $p < 0,05$ )



**Figura 13** – Dosagem de TGF- $\beta$  produzido em resposta à infecção endovenosa de camundongos Balb/c pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6. Os resultados obtidos foram analisados comparando com a concentração de TGF- $\beta$  em animais controle, que receberam injeção de salina e foram mantidos nas mesmas condições que os grupos experimentais. O gráfico representa a média  $\pm$  desvio padrão dos resultados obtidos da dosagem do soro de 4-5 animais, e foram analisados pelo teste “t” de Student. (\* $p < 0,05$ )



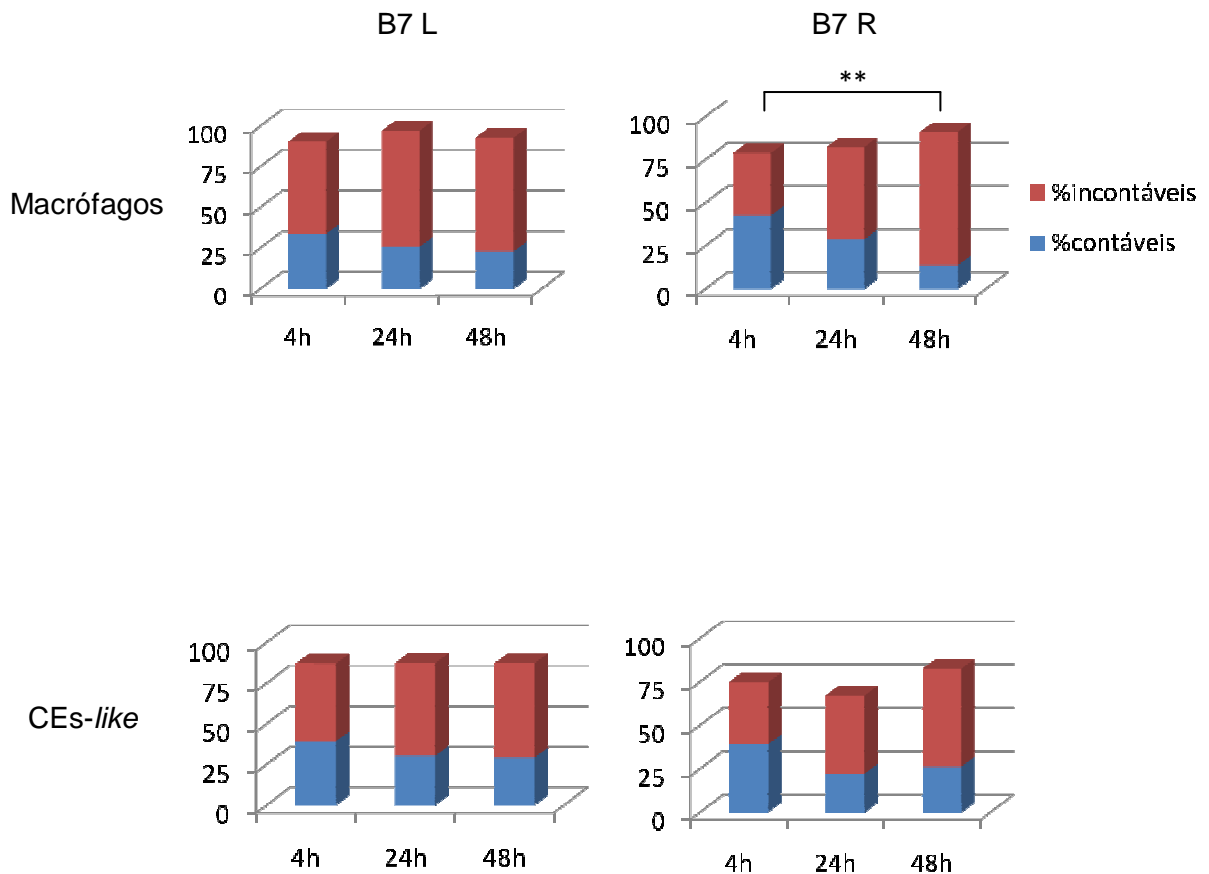
**Figura 14** – Imagem representativa da recuperação de colônias rugosas (setas) de animais infectados com os isolados de fenótipo liso. Colônias recuperadas de baços e fígados de animais infectados pelos isolados B7 L e B67, após 14 dias da inoculação intraperitoneal e/ou endovenosa de bacilos.

#### 4.5. Experimento de infecção *ex vivo*

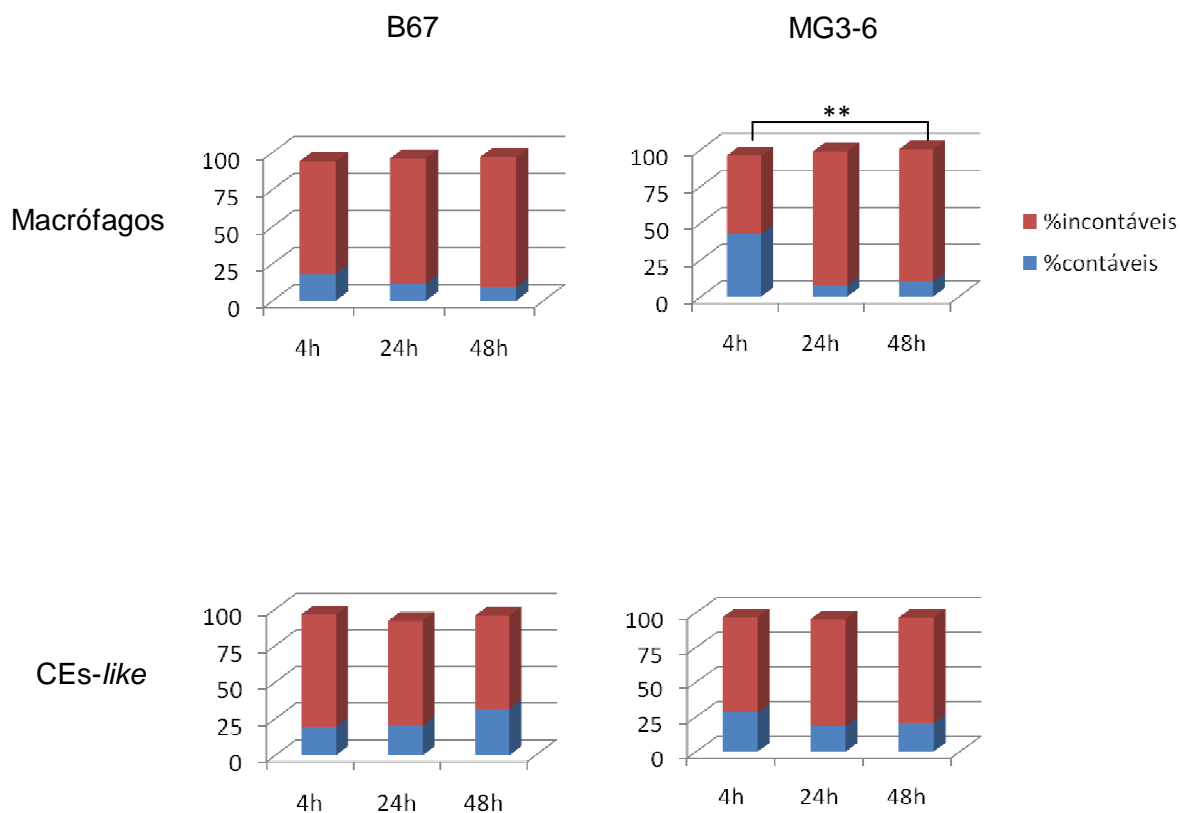
Nos experimentos de infecção de culturas de macrófagos e de CEs-*like* com *M. abscessus* subsp. *massiliense* onde foram utilizadas as proporções 10:1 e 2:1, com co-incubação de 4 h, grande parte das células infectadas continha um número incontável de bacilos em seu interior. Conseqüentemente, os resultados foram analisados apenas quanto à porcentagem de células contendo número mensurável (% contáveis) e incomensurável (% incontáveis) de bacilos.

Nas infecções com B7 R e MG3-6, a 10 bacilos/célula, houve o aumento da porcentagem de macrófagos com número incontável de bacilos em seu interior ao longo do tempo de infecção estudado. O mesmo não foi observado para a infecção de culturas de CEs-*like* por estes mesmos isolados. Além disso, a infecção de macrófagos e CEs-*like*, nesta proporção, por isolados de fenótipo liso não mostrou nenhuma diferença estatística após as 48 h de estudo (Figuras 15 e 16).

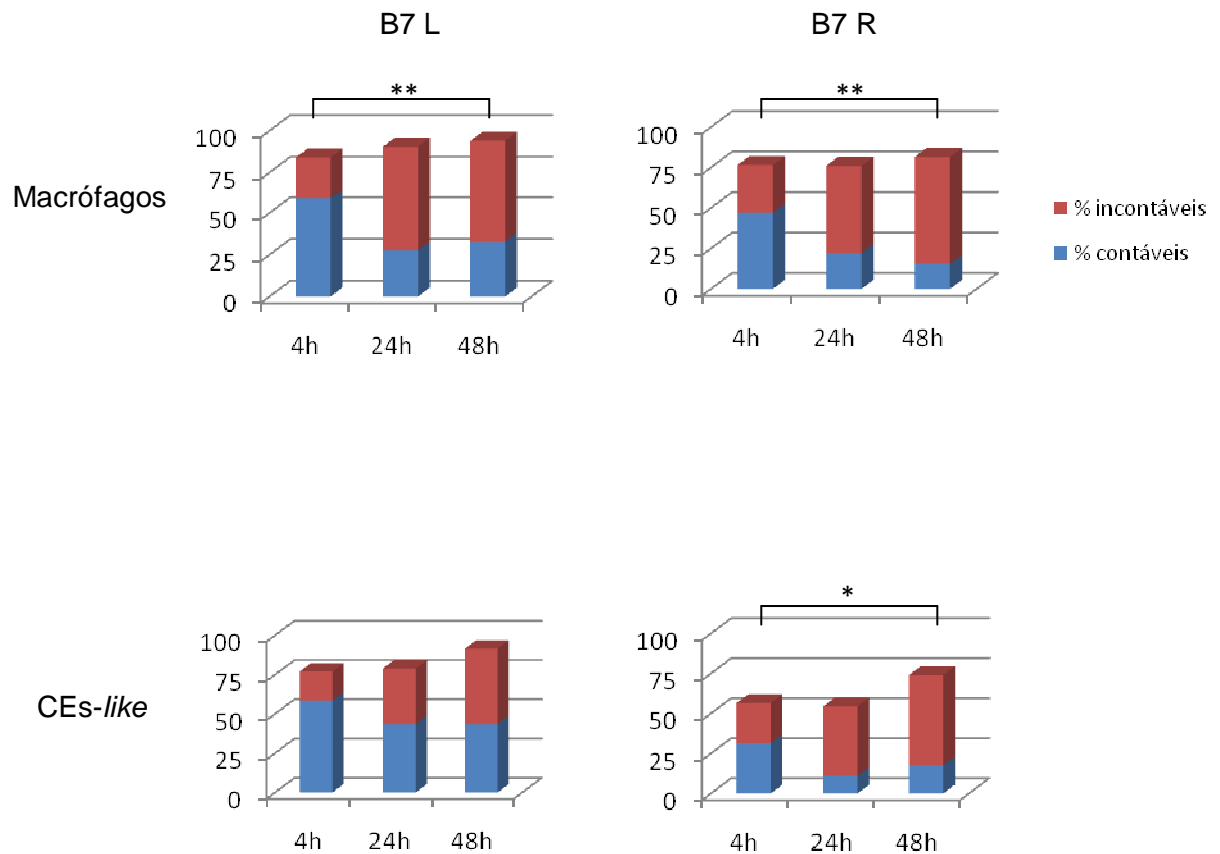
A diminuição da proporção para 2 bacilos/célula, com co-incubação de 4h, mostrou que macrófagos permitem a multiplicação das variantes do isolado de surto B7 e do isolado MG3-6 e que CEs-*like* mantêm estável a infecção por B7 L, B67 e MG3-6 durante o tempo estudado. Essa abordagem experimental nos permitiu concluir que diante dos 4 isolados aqui testados, CEs-*like* são incapazes de controlar apenas a infecção pelo isolado B7 R (Figuras 17 e 18).



**Figura 15** – Análise da infecção *ex vivo* por B7 L e R, utilizando 10 bacilos/célula, e tempo de co-incubação de 4 horas. Os gráficos representam a porcentagem de infecção de macrófagos peritoneais murinos e CEs-*like* pelo isolado B7 de *M. abscessus* subsp. *massiliense* de fenótipo de colônia liso (B7 L) e rugoso (B7 R). As barras indicam a porcentagem de células contendo número quantificável (% contáveis) ou não (% incontáveis) de bacilos. Os gráficos representam os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. (\*  $p < 0,05$ )

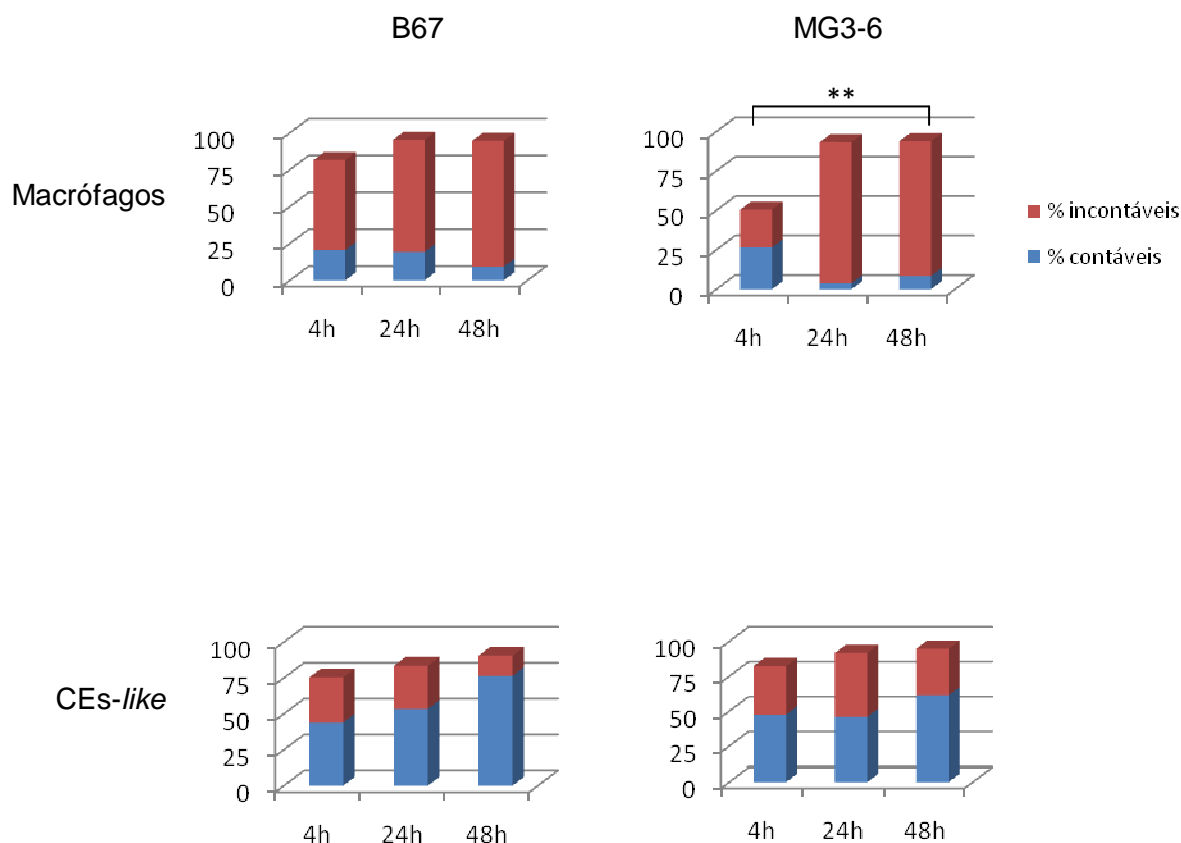


**Figura 16** – Análise da infecção *ex vivo* por B67 e MG3-6, utilizando **10** bacilos/célula, e tempo de co-incubação de 4 horas. Os gráficos representam a porcentagem de infecção de macrófagos peritoneais murinos e CEs-*like* pelo isolado B67 e MG3-6 de *M. abscessus* subsp. *massiliense*. As barras indicam a porcentagem de células contendo número quantificável (% contáveis) ou não (% incontáveis) de bacilos. Os gráficos representam os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. (\*\* $p < 0,01$ )



**Figura 17** – Análise da infecção *ex vivo* por B7 L e R, utilizando 2 bacilos/célula, e tempo de co-incubação de 4 horas. Os gráficos representam a porcentagem de infecção de macrófagos peritoneais murinos e CEs-*like* pelo isolado B7 de *M. abscessus* subsp. *massiliense* de fenótipo de colônia liso (B7 L) e rugoso (B7 R). As barras indicam a porcentagem de células contendo número quantificável (% contáveis) ou não de bacilos (% incontáveis). Os gráficos representam os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )





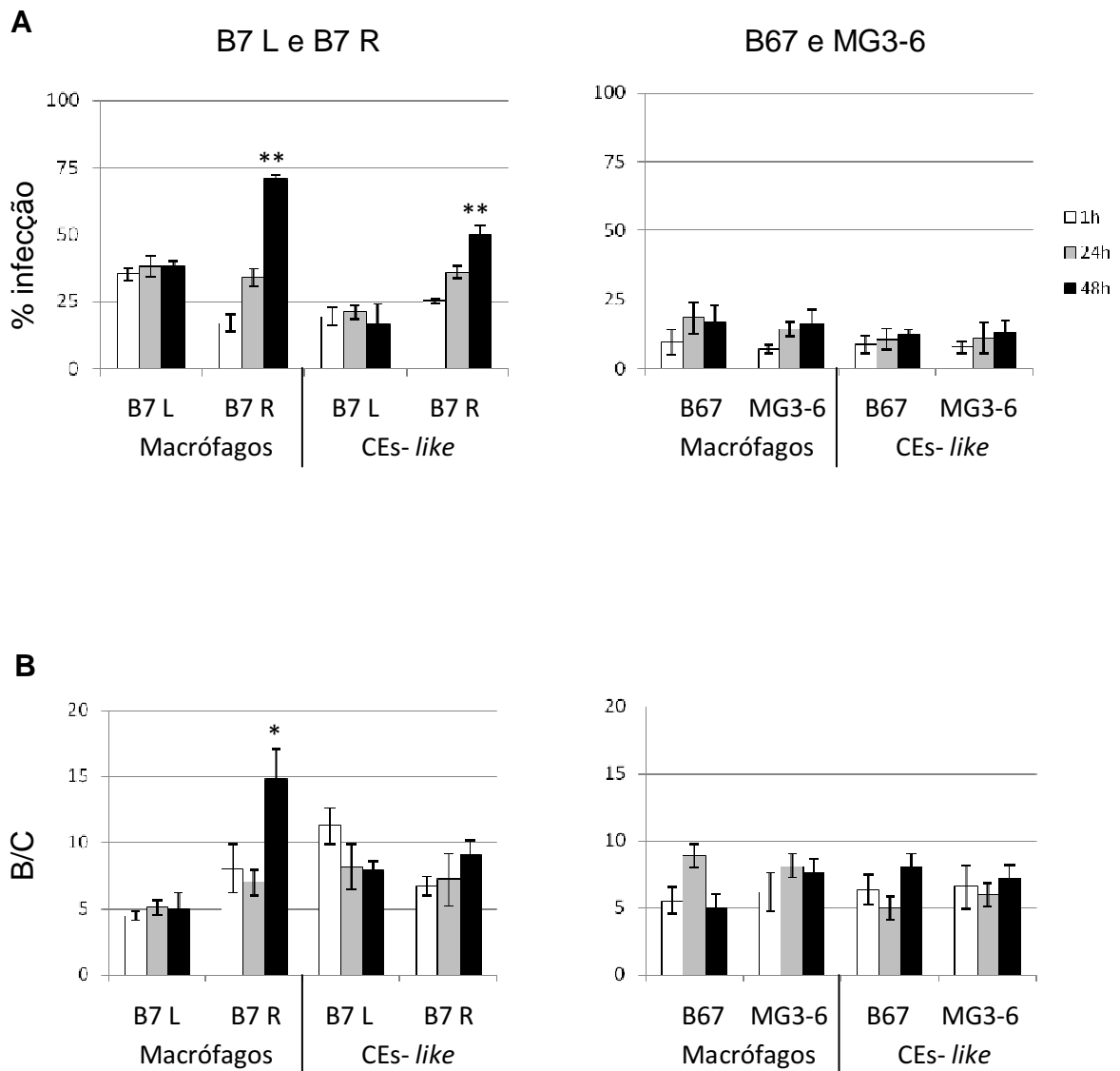
**Figura 18** – Análise da infecção *ex vivo* por B67 e MG3-6, utilizando 2 bacilos/célula, e tempo de co-incubação de 4 horas. Os gráficos representam a porcentagem de infecção de macrófagos peritoneais murinos e CEs-*like* pelos isolados B67 e MG3-6 não relacionados a surtos. As barras indicam a porcentagem de células contendo número quantificável (% contáveis) ou não de bacilos (% incontáveis). Os gráficos representam os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. (\*\* $p < 0,01$ )

A quantificação mais precisa da infecção só foi possível após a diminuição do tempo de co-incubação para 1 h e da proporção para 0,5 bacilo/célula, sendo possível avaliar a porcentagem de células infectadas (% infecção) e o número médio de bacilos presentes em cada célula (B/C). Nestas condições, observamos que a % infecção e o número de B/C não aumentou durante as 48 h da infecção de culturas de macrófagos e CEs-*like* pelos isolados não relacionados ao surto, B67 e MG3-6, e pelo isolado B7 L.

Diferentemente, a porcentagem de células infectadas pelo isolado B7 R aumentou significativamente, tanto nas culturas de macrófagos quanto nas de CEs-*like*. A relação B/C também aumentou significativamente nos macrófagos infectados por B7 R, havendo um leve aumento nas culturas de CEs-*like*, o qual não teve significância estatística (Figura 19).

A infecção pelos isolados B7 L e B7 R inibiu a produção de TGF- $\beta$  pelas culturas de CEs-*like*, quando comparada aos níveis de produção basal ( $149 \pm 4,3$  pg/ml). O mesmo foi observado para a infecção das culturas de macrófagos pelos isolados de surto (B7 L e B7 R), assim como com o isolado B67 (produção basal de  $84,2 \pm 5,8$  pg/ml) (Tabela 1).

Para as demais citocinas analisadas, a infecção não induziu uma diferença no padrão de produção por nenhum dos 2 tipos celulares.



**Figura 19** – Quantificação da infecção de macrófagos peritoneais murinos e CE*s-like* pelos isolados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6, utilizando **0,5** bacilo/célula, e tempo de co-incubação de 1 hora. A porcentagem de células infectadas nas culturas (**A**), e a relação entre o número de bacilos/célula infectada (**B**) foram analisadas. Os gráficos representam os resultados das médias  $\pm$  desvio padrão obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ )

**Tabela 1** – Dosagem de TGF- $\beta$  nos sobrenadantes das culturas de macrófagos e CEs-*like* após a infecção com *M. abscessus* subsp. *massiliense*

Culturas	CEs- <i>like</i>		Macrófagos	
	24h	48h	24h	48h
B7 L	24,73 $\pm$ 7,88 <sup>##</sup>	88,19 $\pm$ 4,58 <sup>##</sup>	Nd	25,85 $\pm$ 7,18 <sup>##</sup>
B7 R	28,18 $\pm$ 4,18 <sup>##</sup>	44,8 $\pm$ 7,72 <sup>##</sup>	Nd	5,58 $\pm$ 0,68 <sup>##</sup>
B67	114,38 $\pm$ 25,60	105,24 $\pm$ 51,09	40,09 $\pm$ 15,35 <sup>a</sup>	49,38 $\pm$ 1,27 <sup>##</sup>
MG3-6	94,32 $\pm$ 18,03 <sup>c#</sup>	143,84 $\pm$ 29,11	38,29 $\pm$ 11,84 <sup>a#</sup>	144,82 $\pm$ 33,33 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> resultados estatisticamente diferentes daqueles obtidos para B67 no mesmo tempo

<sup>b</sup> resultados estatisticamente diferentes daqueles obtidos para MG3-6 no mesmo tempo

<sup>c</sup> diferença estatística entre os resultados de 24h e 48h para o mesmo isolado

<sup>#</sup> diferença estatística à concentração basal de TGF- $\beta$  produzida por CEs-*like*

<sup>a</sup> diferença estatística à concentração basal de TGF- $\beta$  produzida por macrófagos

Nd: concentrações não detectadas

A tabela representa a dosagem de TGF- $\beta$  nos sobrenadantes das culturas de macrófagos e CEs-*like* após a infecção pelos isolados B7 L, R, B67 e MG3-6, com co-incubação de 1h e utilizando 0,5 bacilo/célula. Os resultados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos resultados obtidos em 2 experimentos feitos em duplicatas. Concentração basal de TGF- $\beta$  produzida em culturas de macrófagos (84,2  $\pm$  5,8 pg/ml) e CEs-*like* (149  $\pm$  4,3 pg/ml). ( $p < 0,01$ )

## **5. DISCUSSÃO**

---

*Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* é uma espécie recentemente descrita cujos relatos têm se restringido à sua identificação em casos clínicos independentes e em surtos (Albini e cols. 2007; Cardoso e cols. 2008; Kim e cols. 2008; Viana-Niero e cols. 2008; Duarte e cols. 2009).

*M. abscessus* é uma espécie frequentemente associada a infecções pulmonares crônicas e surtos relacionados a procedimentos cirúrgicos (Colombo e Olivier 2008), tornando-se objeto de estudos voltados para a compreensão da infecção por ela causada (Rottman e cols. 2007; Oberley-Deegan e cols. 2008; Shin e cols. 2008). Até o momento, não há na literatura trabalhos que estudem o comportamento de *M. abscessus* subsp. *massiliense* em estudos *in vivo* e *ex vivo*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar a interação dessa subespécie com o hospedeiro, comparando os resultados àqueles já descritos para *M. abscessus*, além de investigar diferenças de patogenicidade entre isolados relacionados ou não a surto.

De Fevereiro de 2004 a Junho de 2005, em Belém – PA, foram notificados 311 casos de pacientes que passaram por cirurgias envolvendo o uso de laparoscópios ou por outros procedimentos invasivos. Isolados obtidos de 59 destes pacientes foram identificados como *M. abscessus* subsp. *massiliense* (Viana-Niero e cols. 2008; Leão e cols. 2009). No presente trabalho, 5 isolados foram escolhidos aleatoriamente, sendo que, na primeira passagem em meio sólido, 2 apresentaram colônias de fenótipo liso e rugoso misturadas, com predominância de colônias lisas. Também foram utilizados nesse trabalho outros 2 isolados não-relacionados ao surto, B67 e MG3-6, que apresentavam colônias lisas e rugosas respectivamente. Dos isolados

utilizados neste trabalho (B7, B67 e MG3-6), apenas o isolado MG3-6 não foi isolado de espécimes humano, sendo este advindo de esgoto após tratamento.

Dentre as características fenotípicas de *M. abscessus* subsp. *massiliense* descritas por Adékambi em 2004, estava o fenótipo intermediário entre liso e rugoso. Possivelmente, o isolado descrito apresentava uma mistura de bactérias formadoras de colônias lisas e rugosas, como observado nos resultados de plaqueamento dos isolados B47 e B7 do surto de Belém.

Já está descrito na literatura que *M. avium*, *Mycobacterium smegmatis* e *M. abscessus* com colônias de morfologias lisa e rugosa estão associadas com a presença e ausência, respectivamente, de glicopeptidolipídeos (GPLs) na parede celular (Billman-Jacobe e cols. 1999; Eckstein e cols. 2000; Howard e cols. 2006).

A mudança de fenótipo de colônia é um fenômeno já descrito para *M. abscessus*, e o controle da expressão de GPL por essa espécie parece estar associado a uma forma de evasão do sistema imune do hospedeiro. Isso se deve ao fato de que bactérias formadoras de colônias rugosas foram recuperadas em órgãos de animais infectados por isolado de colônias lisas (Rottman e cols. 2007). Os GPLs presentes na parede celular de isolados com fenótipo de colônia liso poderiam ser considerados como o principal alvo de células B no desenvolvimento da resposta humoral contra a infecção, justificando a mudança de fenótipo das bactérias após um tempo mais prolongado de infecção. A mudança de fenótipo também foi observada em nossos resultados, corroborando dados descritos na literatura.

A utilização de um modelo de infecção onde os animais não apresentavam nenhuma deficiência imunológica mostrou que, nas condições estudadas, *M. abscessus* subsp. *massiliense* não causa infecção persistente quando inoculada no peritônio ou endovenosamente. Entretanto, ficou claro, pela diferença do peso e no quadro histológico dos baços dos animais infectados por via intraperitoneal, que a resposta estimulada pelo isolado B7 R, relacionado a surto, induziu a proliferação mais intensa dos linfócitos presentes nos folículos esplênicos.

Os resultados de plaqueamento do macerado dos baços dos animais infectados por via intraperitoneal mostraram que, para todos os isolados utilizados, houve uma migração de bacilos vivos da cavidade peritoneal para este órgão, seja via carreamento por células que internalizaram bacilos, ou via migração de bacilos livres. Mesmo após 14 dias da infecção observamos um número maior que  $10^2$  UFCs/animal, significando que os bacilos, apesar de serem eliminados do peritônio dos animais, permaneceram vivos no baço. Este resultado é também mais um indicativo de que estas micobactérias são possivelmente resistentes aos mecanismos de eliminação de patógenos do sistema imune, como a degradação pela via endocítica. Sabe-se que micobactérias patogênicas, como *M. tuberculosis* e *M. avium* são capazes de subverter o sistema imune por impedir a maturação de fagossomos (*apud* Koul e cols, 2004). Talvez este seja também um mecanismo de evasão de *M. abscessus* subsp. *massiliense*.

A recuperação de colônias rugosas do macerado de baços e fígados de animais infectados pelos isolados de fenótipo liso indica, como sugerido por Rottman e Catherinot, 2007, que a supressão da expressão de GPL na parede



celular micobacteriana faz parte da seleção de bactérias resistentes aos mecanismos efetores da resposta imunológica a patógenos.

Diferenças de resposta imune a infecções podem ser detectadas pelo padrão de citocinas produzidas frente ao estímulo. Uma citocina importante envolvida na resposta contra micobactérias patogênicas é o IFN- $\gamma$  (Houben e cols. 2006). Esta molécula é capaz de modular diversos mecanismos imunológicos, e é descrito que indivíduos com alterações no gene que a codifica apresentam alta susceptibilidade a infecções micobacterianas (Gutierrez e cols. 2004; Rottman e cols. 2007).

No modelo de infecção intraperitoneal, as diferenças observadas na histologia do baço dos animais e a mudança de fenótipo observada após 14 dias da infecção não se refletiram em uma menor produção de IFN- $\gamma$  nestes grupos de animais. A concentração das demais citocinas analisadas não mostrou diferença significativa em comparação ao grupo controle, demonstrando que na infecção por esta via os isolados rugosos aparentemente não modulam a resposta imune de forma distinta dos isolados de colônia lisa, e que aqueles relacionados a surto também apresentam, do ponto de vista das citocinas estudadas, estimulação semelhante.

Por outro lado, a inoculação das bactérias por via endovenosa induziu diferenças na estimulação da produção de TGF- $\beta$ . Animais infectados pelos isolados B7 L, B67 e MG3-6 produziram significativamente menos TGF- $\beta$  que os animais controle 2 dias após a infecção. Neste tempo, houve o aumento significativo no número de bacilos recuperados do baço dos animais infectados com B7 R, em relação ao primeiro dia pós-infecção. Para este grupo, os níveis

de TGF- $\beta$  produzidos se igualavam àqueles detectados para o grupo controle. O papel de TGF- $\beta$  na patogênese de infecções micobacterianas causadas por *M. tuberculosis* e *M. avium* já tem sido descrito. Para estas duas espécies de micobactérias de crescimento lento, a presença de TGF- $\beta$  é fundamental para a progressão da infecção *in vivo* e *ex vivo*. Experimentos *in vivo* mostraram que a infecção de animais com *M. avium*, seguida da injeção de TGF- $\beta$  exógeno leva ao aumento significativo da carga bacteriana (Denis e Ghadirian 1991). Assim como observado para *M. avium*, a maior produção de TGF- $\beta$  frente à infecção pelo isolado B7 R, quando comparada com os outros isolados testados, pode ter propiciado sua maior proliferação, evidenciada pela contagem de UFCs no baço, nos tempos iniciais da infecção. Contudo, esta citocina não parece determinar o curso da infecção em longo prazo em animais imunocompetentes, pois, após 14 dias de observação, todos os grupos de animais injetados com os 4 isolados em estudo foram capazes de controlar a infecção.

No modelo *ex vivo*, a infecção utilizando a mesma proporção de bacilos/célula descrita por outros em trabalhos com *M. abscessus* foi incapaz de sugerir quaisquer evidências de distinção entre os isolados analisados (Byrd e Lyons 1999; Howard e cols. 2006; Catherinot e cols. 2007). A sensibilidade necessária só foi obtida após a diminuição do número de bacilos por célula em cultura e do tempo de co-incubação. Este fato isoladamente sugere que *M. abscessus* subsp. *massiliense* é mais virulenta que *M. abscessus* subsp. *abscessus*, pelo menos *ex vivo*, devido à sua grande capacidade de infectar as culturas de macrófagos observada neste trabalho.

Em culturas celulares, a neutralização de TGF- $\beta$  leva à diminuição da replicação de *M. tuberculosis* em monócitos humanos; a adição de TGF- $\beta$  exógeno resulta no aumento da replicação de *M. tuberculosis* (Hirsch e cols. 1994) e a infecção de macrófagos humanos com *M. avium* leva à produção de TGF- $\beta$  ativo, além da ausência de resposta da cultura infectada aos efeitos de IFN- $\gamma$  e TNF (Champsi e cols. 1995). Estes dados sugerem que TGF- $\beta$  é uma citocina facilitadora da multiplicação bacilar de micobactérias de crescimento lento ou rápido em cultura.

Chinen e cols. (2006) demonstraram que CEs-*like* são capazes de conter a infecção por *M. avium*, impedindo a multiplicação dos bacilos internalizados. A infecção *ex vivo* pelos isolados B7 L, B67 e MG3-6 mostrou que CEs-*like* são capazes de controlar a infecção pelos mesmos, à semelhança do que foi observado para *M. avium*. Contudo, os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que CEs-*like* não exercem o mesmo controle frente à infecção pelo isolado B7 R de *M. abscessus* subsp. *massiliense*, reforçando a suposição de que o isolado rugoso relacionado a surto seria mais patogênico que os demais estudados, e que, portanto, os surtos relacionados a essa cepa se deram em parte pela seleção de bactérias mais resistentes diante dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Além de controlar a infecção por *M. avium*, CEs-*like* produzem altas concentrações de TGF- $\beta$ . Diferentemente, macrófagos permitiram a replicação dos bacilos e liberaram baixas concentrações desta citocina em estímulo à infecção (Chinen e cols., 2006). Os resultados do trabalho atual mostraram que CEs-*like* não são capazes de controlar a infecção por B7 R, sendo que este

isolado, juntamente com B7 L, inibiram a produção de TGF- $\beta$  quando comparados com os isolados não relacionados a surtos. Adicionalmente, o sobrenadante das culturas co-cultivadas com o isolado MG3-6, proveniente do esgoto tratado, apresentou as maiores concentrações de TGF- $\beta$ , sugerindo que a passagem *in vivo* possa modificar a relação de *M. abscessus* subsp. *massiliense* com a célula hospedeira (macrófagos e células epitelióides presentes nas lesões granulomatosas). A partir dos resultados é possível especular que após passagens sucessivas *in vivo*, essas micobactérias poderiam apresentar potencial patogênico semelhante àquele observado para os isolados relacionados a surto.

Em conjunto, estes resultados sugerem que TGF- $\beta$  no modelo de CEs-*like* pode desempenhar papel importante no controle da infecção por micobactérias *ex vivo*, podendo diferir entre isolados de surtos e isolados que não tiveram passagem *in vivo*. Estes dados diferem daquele observado para infecção de macrófagos com *M. tuberculosis* onde a baixa concentração de TGF- $\beta$  está associada à diminuição da replicação dos bacilos (Hirsch e cols. 1994) Os mecanismos subjacentes a este fenômeno estão sendo investigados.

Finalizando, neste trabalho, mostramos que o isolado B7 R, relacionado ao surto de cirurgias laparoscópicas de Belém (2004-2005) é mais virulento e patogênico que o isolado de fenótipo de colônia lisa, da mesma cepa. Além disso, o isolado MG3-6, também de fenótipo rugoso, mas proveniente do meio ambiente, não apresentou o mesmo comportamento que o do surto nos ensaios *in vivo* e *ex vivo*. Essas observações sugerem que o fenótipo de colônia (liso ou rugoso) está relacionado à maior patogenicidade

apenas quando se avaliam cepas causadoras de casos clínicos, mas não as ambientais.

## **6. CONCLUSÕES**

---

Em conjunto, os resultados aqui apresentados demonstraram que:

- 6.1.** Foram isoladas colônias lisas e rugosas da cepa B7 do surto de Bélem (2004-2005), cujos fenótipos foram mantidos após 10 passagens *in vitro*, assim como as duas cepas não relacionadas a surto, MG3-6 (rugosa) e B67 (lisa). Entretanto, após uma passagem *in vivo*, ambas as cepas lisas apresentaram colônias tanto lisas quanto rugosas quando cultivadas em meio sólido;
- 6.2.** As infecções pelas vias intraperitoneal e endovenosa de camundongos Balb/c pelos isolados de *M. abscessus* subsp. *massiliense* estudados B7 L, B7 R, B67 e MG3-6 foram igualmente controladas, não havendo recuperação de bacilos viáveis após 90 dias da injeção;
- 6.3.** O isolado de surto B7 R estimulou maior proliferação de células presentes nos folículos linfóides quando comparado com os outros 3 estudados. Os bacilos foram capazes de penetrar na região perifolicular após inoculação intraperitoneal em camundongos Balb/c, sugerindo que este isolado é mais virulento que os demais;
- 6.4.** CEs-*like* e macrófagos não foram capazes de controlar apenas a infecção *ex vivo* pelo isolado B7 R. Esse isolado juntamente com B7 L estimulou produção menor de TGF- $\beta$ , quando comparado aos isolados não relacionados a surtos. As maiores concentrações dessa citocina foram detectadas nas culturas infectadas com o isolado de esgoto tratado, MG3-6, único que não teve passagem *in vivo*. Os dados sugerem que TGF- $\beta$  tem papel importante no controle da infecção de micobactérias de crescimento rápido capazes de estabelecer infecção *ex vivo*.

## **7. REFERÊNCIAS**

---



- Adams, D. O. (1976). "The granulomatous inflammatory response. A review." Am J Pathol **84**(1): 164-192.
- Adekambi, T., P. Berger, e cols. (2006). "rpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 1): 133-143.
- Adekambi, T., P. Colson, e cols. (2003). "rpoB-based identification of nonpigmented and late-pigmenting rapidly growing mycobacteria." J Clin Microbiol **41**(12): 5699-5708.
- Adekambi, T. e M. Drancourt (2004). "Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, hsp65, sodA, recA and rpoB gene sequencing." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 6): 2095-2105.
- Adekambi, T., D. Raoult, e cols. (2006). "*Mycobacterium barrassiae* sp. nov., a *Mycobacterium moriokaense* group species associated with chronic pneumonia." J Clin Microbiol **44**(10): 3493-3498.
- Adekambi, T., M. Reynaud-Gaubert, e cols. (2004). "Amoebal coculture of "*Mycobacterium massiliense*" sp. nov. from the sputum of a patient with hemoptoic pneumonia." J Clin Microbiol **42**(12): 5493-5501.
- Albini, S., S. Mueller, e cols. (2007). "[Cutaneous atypical mycobacteriosis due to *Mycobacterium massiliense* in a cat]." Schweiz Arch Tierheilkd **149**(12): 553-558.
- Bartralot, R., R. M. Pujol, e cols. (2000). "Cutaneous infections due to nontuberculous mycobacteria: histopathological review of 28 cases. Comparative study between lesions observed in immunosuppressed patients and normal hosts." J Cutan Pathol **27**(3): 124-129.
- Billman-Jacobe, H., M. J. McConville, e cols. (1999). "Identification of a peptide synthetase involved in the biosynthesis of glycopeptidolipids of *Mycobacterium smegmatis*." Mol Microbiol **33**(6): 1244-1253.
- Blackwood, K. S., C. He, e cols. (2000). "Evaluation of recA sequences for identification of *Mycobacterium* species." J Clin Microbiol **38**(8): 2846-2852.
- Brown-Elliott, B. A. e R. J. Wallace, Jr. (2002). "Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria." Clin Microbiol Rev **15**(4): 716-746.
- Brunello, F., M. Ligozzi, e cols. (2001). "Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene." J Clin Microbiol **39**(8): 2799-2806.
- Byrd, T. F. e C. R. Lyons (1999). "Preliminary characterization of a *Mycobacterium abscessus* mutant in human and murine models of infection." Infect Immun **67**(9): 4700-4707.
- Carbonne, A., F. Brossier, e cols. (2009). "Outbreak of nontuberculous mycobacterial subcutaneous infections related to multiple mesotherapy injections." J Clin Microbiol **47**(6): 1961-1964.
- Cardoso, A. M., E. Martins de Sousa, e cols. (2008). "Emergence of nosocomial *Mycobacterium massiliense* infection in Goias, Brazil." Microbes Infect **10**(14-15): 1552-1557.

- Carson, L. A., L. A. Bland, e cols. (1988). "Prevalence of nontuberculous mycobacteria in water supplies of hemodialysis centers." Appl Environ Microbiol **54**(12): 3122-3125.
- Catherinot, E., J. Clarissou, e cols. (2007). "Hypervirulence of a rough variant of the *Mycobacterium abscessus* type strain." Infect Immun **75**(2): 1055-1058.
- Champsì, J., L. S. Young, e cols. (1995). "Production of TNF-alpha, IL-6 and TGF-beta, and expression of receptors for TNF-alpha and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection." Immunology **84**(4): 549-554.
- Chan, E. D., A. M. Kaminska, e cols. (2007). "Alpha-1-antitrypsin (AAT) anomalies are associated with lung disease due to rapidly growing mycobacteria and AAT inhibits *Mycobacterium abscessus* infection of macrophages." Scand J Infect Dis **39**(8): 690-696.
- Chinen, L. T., I. M. Cipriano, e cols. (2006). "Recombinant interleukin-4-treated macrophages, epithelioid cell surrogates, harbor and arrest *Mycobacterium avium* multiplication in vitro." Microbes Infect **8**(4): 965-973.
- Chroneou, A., S. K. Zimmerman, e cols. (2008). "Molecular typing of *Mycobacterium chelonae* isolates from a pseudo-outbreak involving an automated bronchoscope washer." Infect Control Hosp Epidemiol **29**(11): 1088-1090.
- Cipriano, I. M., M. Mariano, e cols. (2003). "Murine macrophages cultured with IL-4 acquire a phenotype similar to that of epithelioid cells from granulomatous inflammation." Inflammation **27**(4): 201-211.
- Clay, H., Davis, J. M., Beery, D., Huttenlocher, A., Lions, S. E., Ramakrishnan, L. (2007). "Dichotomous role of the macrophage in early *Mycobacterium marinum* infection of the zebrafish." Cell Host Microbe **2** (1):29-39.
- Colombo, R. E. e K. N. Olivier (2008). "Diagnosis and treatment of infections caused by rapidly growing mycobacteria." Semin Respir Crit Care Med **29**(5): 577-588.
- Covert, T. C., M. R. Rodgers, e cols. (1999). "Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples." Appl Environ Microbiol **65**(6): 2492-2496.
- Davis, J. M. e L. Ramakrishnan (2009). "The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection." Cell **136**(1): 37-49.
- De Groote, M. A. e G. Huit (2006). "Infections due to rapidly growing mycobacteria." Clin Infect Dis **42**(12): 1756-1763.
- Del-Castillo, M., D. Palmero, e cols. (2009). "Mesotherapy-associated outbreak caused by *Mycobacterium immunogenum*." Emerg Infect Dis **15**(2): 357-359.
- Denis, M. e E. Ghadirian (1991). "Transforming growth factor beta (TGF-b1) plays a detrimental role in the progression of experimental *Mycobacterium avium* infection; in vivo and in vitro evidence." Microb Pathog **11**(5): 367-372.
- Devulder, G., M. Perouse de Montclos, e cols. (2005). "A multigene approach to phylogenetic analysis using the genus *Mycobacterium* as a model." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 1): 293-302.
- Duarte, R. S., M. C. Lourenco, e cols. (2009). "An Epidemic of Postsurgical Infections Caused by *Mycobacterium massiliense*." J Clin Microbiol.

- Eckstein, T. M., J. M. Inamine, e cols. (2000). "A genetic mechanism for deletion of the ser2 gene cluster and formation of rough morphological variants of *Mycobacterium avium*." J Bacteriol **182**(21): 6177-6182.
- Ehlers, S., J. Benini, e cols. (1999). "Fatal granuloma necrosis without exacerbated mycobacterial growth in tumor necrosis factor receptor p55 gene-deficient mice intravenously infected with *Mycobacterium avium*." Infect Immun **67**(7): 3571-3579.
- Euzéby, J. (2006). "List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published." Int J Syst Evol Microbiol **56**(Pt 9): 2025-2027.
- Falkinham, J. O., 3rd (1996). "Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria." Clin Microbiol Rev **9**(2): 177-215.
- Falkinham, J. O., 3rd, C. D. Norton, e cols. (2001). "Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems." Appl Environ Microbiol **67**(3): 1225-1231.
- Furney, S. K., P. S. Skinner, e cols. (1992). "Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor." Infect Immun **60**(10): 4410-4413.
- Gingeras, T. R., G. Ghandour, e cols. (1998). "Simultaneous genotyping and species identification using hybridization pattern recognition analysis of generic *Mycobacterium* DNA arrays." Genome Res **8**(5): 435-448.
- Gomila, M., A. Ramirez, e cols. (2007). "Diversity of environmental *Mycobacterium* isolates from hemodialysis water as shown by a multigene sequencing approach." Appl Environ Microbiol **73**(12): 3787-3797.
- Gutierrez, M. G., S. S. Master, e cols. (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages." Cell **119**(6): 753-766.
- Hall-Stoodley, L. e H. Lappin-Scott (1998). "Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*." FEMS Microbiol Lett **168**(1): 77-84.
- Hall-Stoodley, L. e P. Stoodley (2005). "Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens." Trends Microbiol **13**(1): 7-10.
- Havelaar, A. H., L. G. Berwald, e cols. (1985). "Mycobacteria in semi-public swimming-pools and whirlpools." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B **180**(5-6): 505-514.
- Hirsch, C. S., T. Yoneda, e cols. (1994). "Enhancement of intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes by transforming growth factor-beta 1." J Infect Dis **170**(5): 1229-1237.
- Houben, E. N., L. Nguyen, e cols. (2006). "Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system." Curr Opin Microbiol **9**(1): 76-85.
- Howard, S. T. e T. F. Byrd (2000). "The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites." Microbes Infect **2**(15): 1845-1853.
- Howard, S. T., E. Rhoades, e cols. (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**(Pt 6): 1581-1590.
- Hussein, Z., O. Landt, e cols. (2009). "Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods." Int J Med Microbiol **299**(4): 281-290.
- J.P. Euzéby: List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature [<http://www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html>]
- Kasai, H., T. Ezaki, e cols. (2000). "Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria by their gyrB sequences." J Clin Microbiol **38**(1): 301-308.
- Kim, B. J., S. H. Lee, e cols. (1999). "Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB)." J Clin Microbiol **37**(6): 1714-1720.
- Kim, H. Y., Y. Kook, e cols. (2008). "Proportions of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii strains among Korean Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus group isolates." J Clin Microbiol **46**(10): 3384-3390.
- Kim, H. Y., Y. J. Yun, e cols. (2007). "Outbreak of Mycobacterium massiliense infection associated with intramuscular injections." J Clin Microbiol **45**(9): 3127-3130.
- Koul, A., T. Herget, et al. (2004). "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." Nat Rev Microbiol **2**(3): 189-202.
- Leao, S. C., E. Tortoli, e cols. (2009). "Characterization of mycobacteria from a major Brazilian outbreak suggests a revision of the taxonomic status of members of the Mycobacterium chelonae-abscessus group." J Clin Microbiol.
- Mankiewicz, E. e O. Majdaniw (1982). "Atypical mycobacteria in tapwater." Can J Public Health **73**(5): 358-360.
- Meyers, H., B. A. Brown-Elliott, e cols. (2002). "An outbreak of Mycobacterium chelonae infection following liposuction." Clin Infect Dis **34**(11): 1500-1507.
- Nagore, E., P. Ramos, e cols. (2001). "Cutaneous infection with Mycobacterium fortuitum after localized microinjections (mesotherapy) treated successfully with a triple drug regimen." Acta Derm Venereol **81**(4): 291-293.
- Ninet, B., M. Monod, e cols. (1996). "Two different 16S rRNA genes in a mycobacterial strain." J Clin Microbiol **34**(10): 2531-2536.
- Oberley-Deegan, R. E., Y. M. Lee, e cols. (2008). "The Antioxidant Mimetic, MnTE-2-PyP, Reduces Intracellular Growth of Mycobacterium Abscessus." Am J Respir Cell Mol Biol.
- Ordway, D., M. Henao-Tamayo, e cols. (2008). "Animal model of Mycobacterium abscessus lung infection." J Leukoc Biol **83**(6): 1502-1511.
- Padoveze, M. C., C. M. Fortaleza, e cols. (2007). "Outbreak of surgical infection caused by non-tuberculous mycobacteria in breast implants in Brazil." J Hosp Infect **67**(2): 161-167.
- Pierce, E. S. (2009). "Where are all the Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in patients with Crohn's disease?" PLoS Pathog **5**(3): e1000234.

- Pitulle, C., M. Dorsch, e cols. (1992). "Phylogeny of rapidly growing members of the genus *Mycobacterium*." Int J Syst Bacteriol **42**(3): 337-343.
- Primm, T. P., C. A. Lucero, e cols. (2004). "Health impacts of environmental mycobacteria." Clin Microbiol Rev **17**(1): 98-106.
- Rahav, G., S. Pitlik, e cols. (2006). "An outbreak of *Mycobacterium jacuzzii* infection following insertion of breast implants." Clin Infect Dis **43**(7): 823-830.
- Reischl, U., K. Feldmann, e cols. (1998). "16S rRNA sequence diversity in *Mycobacterium celatum* strains caused by presence of two different copies of 16S rRNA gene." J Clin Microbiol **36**(6): 1761-1764.
- Roach, S. K. e J. S. Schorey (2002). "Differential regulation of the mitogen-activated protein kinases by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria." Infect Immun **70**(6): 3040-3052.
- Rodriguez, G., M. Ortegon, e cols. (1997). "Iatrogenic *Mycobacterium abscessus* infection: histopathology of 71 patients." Br J Dermatol **137**(2): 214-218.
- Roth, A., M. Fischer, e cols. (1998). "Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences." J Clin Microbiol **36**(1): 139-147.
- Rottman, M., E. Catherinot, e cols. (2007). "Importance of T cells, gamma interferon, and tumor necrosis factor in immune control of the rapid grower *Mycobacterium abscessus* in C57BL/6 mice." Infect Immun **75**(12): 5898-5907.
- Saito, H. e H. Tasaka (1969). "Comparison of the pathogenicity for mice of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium abscessus*." J Bacteriol **99**(3): 851-855.
- Sampaio, J. L., D. N. Junior, e cols. (2006). "An outbreak of keratitis caused by *Mycobacterium immunogenum*." J Clin Microbiol **44**(9): 3201-3207.
- Schinsky, M. F., R. E. Morey, e cols. (2004). "Taxonomic variation in the *Mycobacterium fortuitum* third biovariant complex: description of *Mycobacterium boenickei* sp. nov., *Mycobacterium houstonense* sp. nov., *Mycobacterium neworleansense* sp. nov. and *Mycobacterium brisbanense* sp. nov. and recognition of *Mycobacterium porcinum* from human clinical isolates." Int J Syst Evol Microbiol **54**(Pt 5): 1653-1667.
- Shin, D. M., C. S. Yang, e cols. (2008). "*Mycobacterium abscessus* activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1." Cell Microbiol **10**(8): 1608-1621.
- Shinnick, T. M. e R. C. Good (1994). "Mycobacterial taxonomy." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **13**(11): 884-901.
- Simmon, K. E., J. I. Pounder, e cols. (2007). "Identification of an emerging pathogen, *Mycobacterium massiliense*, by rpoB sequencing of clinical isolates collected in the United States." J Clin Microbiol **45**(6): 1978-1980.
- Telenti, A., F. Marchesi, e cols. (1993). "Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis." J Clin Microbiol **31**(2): 175-178.
- Tiwari, T. S., B. Ray, e cols. (2003). "Forty years of disinfectant failure: outbreak of postinjection *Mycobacterium abscessus* infection caused by contamination of benzalkonium chloride." Clin Infect Dis **36**(8): 954-962.

- Tortoli, E. (2003). "Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s." Clin Microbiol Rev **16**(2): 319-354.
- Tortoli, E. (2006). "The new mycobacteria: an update." FEMS Immunol Med Microbiol **48**(2): 159-178.
- Tortoli, E., R. Gabini, e cols. (2008). "Lethal Mycobacterium massiliense sepsis, Italy." Emerg Infect Dis **14**(6): 984-985.
- Vaerewijck, M. J., G. Huys, e cols. (2005). "Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health." FEMS Microbiol Rev **29**(5): 911-934.
- Viana-Niero, C., K. V. Lima, e cols. (2008). "Molecular characterization of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii in isolates collected from outbreaks of infections after laparoscopic surgeries and cosmetic procedures." J Clin Microbiol **46**(3): 850-855.
- Wallace, R. J., Jr., B. A. Brown, e cols. (1998). "Nosocomial outbreaks/pseudo-outbreaks caused by nontuberculous mycobacteria." Annu Rev Microbiol **52**: 453-490.
- Williams, G. T. e W. J. Williams (1983). "Granulomatous inflammation--a review." J Clin Pathol **36**(7): 723-733.
- Wilson, R. W., V. A. Steingrube, e cols. (2001). "Mycobacterium immunogenum sp. nov., a novel species related to Mycobacterium abscessus and associated with clinical disease, pseudo-outbreaks and contaminated metalworking fluids: an international cooperative study on mycobacterial taxonomy." Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 5): 1751-1764.
- Wolf, A. J., Linas, B., Trevejo-Nuñez, G. J., Kincaid, E., Tamura, T., Takatsu, K., Ernst, J. D. (2007) "Mycobacterium tuberculosis infects dendritic cells and impairs their function in vivo." J. Immunol. **179** (4): 2509-2519.
- Woo, P. C., K. W. Leung, e cols. (2002). "Relatively alcohol-resistant mycobacteria are emerging pathogens in patients receiving acupuncture treatment." J Clin Microbiol **40**(4): 1219-1224.
- Zelazny, A. M., J. M. Root, e cols. (2009). "Molecular identification and typing of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii: a cohort study." J Clin Microbiol.
- Zolg, J. W. e S. Philippi-Schulz (1994). "The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of mycobacteria by PCR." J Clin Microbiol **32**(11): 2801-2812.

## ABSTRACT

Rapidly growing mycobacteria (RGMs) have been frequently identified in outbreaks of human infections. *Mycobacterium abscessus* subsp. *massiliense* is an RGM which was first described in 2004, and since then 10 publications identifying this species in outbreaks and sporadic clinical cases have been reported. The interaction between *M. abscessus* subsp. *massiliense* and host was the main objective of this work. Therefore, variants of smooth and rough colonies (B7 S and B7 R), isolated from an outbreak which took place in Belém, from 2004 to 2005, and two non-related isolates [B67 (S) and MG3-6 (R)] were used to produce intraperitoneal and intravenous infections in mice, and *ex vivo* infection in peritoneal macrophages and epithelioid-like cells. In terms of immune response following intraperitoneal infection cytokine levels were similar for the four isolates. However, after 14 days, the spleens of animals infected with B7 R and MG3-6 showed a significant increase in comparison to the spleens of animals infected with the other two isolates. After 90 days, this difference was maintained only for the group infected with B7 R. The histological analysis of the spleens showed that the proliferative response in lymphoid follicles was more evident in animals infected with B7 R, leading to central necrosis after 14 days. Acid-fast bacilli were found penetrating the perifollicular zone of these spleens, and also large blood vessels, suggesting blood dissemination. The intravenous infection corroborated the results obtained for intraperitoneal infections. After two days of infection, the recovery of colony forming units (CFUs) from spleen was significantly larger in animals infected with B7 R. Nevertheless, the infection was likewise controlled by all groups, similarly to the intraperitoneal infection. In the intravenous infection model, animals infected with B7 L, B67 and MG3-6 showed low production of TGF- $\beta$  in early time points. The infection of macrophages and epithelioid-like cells corroborated the *in vivo* findings, and B7 R was capable of proliferating inside macrophages and only for this isolate there was an increase in the percentage of infection in epithelioid-like cells. Furthermore, B7 R and B7 S stimulated a modest production of TGF- $\beta$  in these cultures when compared to the non-related isolates. Contrary to what was observed previously for *M. avium*, epithelioid-like cells were not able to restrain the infection caused by B7 R. Taken together, the results suggest that rough colony forming mycobacteria associated to outbreaks are more pathogenic than bacteria of smooth phenotype and those present in the environment, maybe because of the lower levels of TGF- $\beta$  upon mycobacteria-infected cells interaction. The underlying mechanisms are under investigation.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)



[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)