



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MACRÓFAGOS MURINOS NA
INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS AMBIENTAIS**

JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES

**Salvador – Bahia
2005**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DE MACRÓFAGOS MURINOS NA
INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS AMBIENTAIS**

JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES

Orientadora: Patrícia Sampaio Tavares Veras

Dissertação apresentada para
obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental

Salvador – Bahia
2005

COMISSÃO EXAMINADORA**Membros Titulares:**

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

**Pesquisador Titular
CPqGM/ FIOCRUZ**

Dra. Maria da Glória Bonecini-Almeida

**Pesquisador Titular
CPqHEC/ FIOCRUZ**

Dr. Sérgio Arruda

**Pesquisador Associado
CPqGM/ FIOCRUZ**

Membro Suplente:

Dra. Theolis Barbosa

**Tecnologista Pleno
CPqGM/ FIOCRUZ**

Fontes de Financiamento:

CAPES – Bolsa de Mestrado

**A meus pais e ao meu irmão
pelo incentivo, amor e confiança.**

AGRADECIMENTOS

Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras por sua orientação, dedicação, incentivo e amizade.

Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas pelas sugestões enriquecedoras durante o desenvolvimento deste trabalho.

Dr. Washington Luis Conrado dos Santos pelas valiosas sugestões na análise estatística dos resultados.

Tânia Silva pela amizade e pela grande importância no desenvolvimento desse trabalho.

Antônio Petersen e Théo Santos pela participação indispensável para a realização deste trabalho.

Guilherme de Oliveira Campos e José Geraldo Bomfim Lima pela amizade e pelo auxílio na execução dos experimentos.

Cláudio Pereira Figueira pelo apoio na preparação do material para análise em microscopia eletrônica.

Taís Fontoura de Almeida pela amizade, apoio e companheirismo ao longo dessa caminhada.

Marcus Welby, Ivana Gomes de Araújo, Valderes Lemos de Souza, Cleusa Rodrigues, Dra. Tânia Correia e Gilberto Cafezeiro pela amizade e pelo apoio sempre presentes.

Amigos do LPBI, Luís Fábio Batista, Júlia Di Tullio, Sírio Melo, Bruna Leite, Marta Santos, Roseane Barreto e Luciano dos Santos pelo agradável convívio e pelo apoio.

José Pereira de Moura Neto pelo companheirismo, carinho, compreensão e incentivo. Agradeço por estar sempre ao meu lado, compartilhando comigo as angústias e alegrias envolvidas nesta conquista.

Rosália Meire Oliveira da Silva e Iumara Evangelista pela atenção e apoio em todos os momentos do curso.

Ana Fiscina Sampaio e todo o pessoal da biblioteca do CPqGM pela presteza no atendimento.

A turma do Mestrado em Patologia Experimental de 2003 pelo companheirismo e amizade.

Todos funcionários do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz.

A todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 COMPLEXO <i>M. FORTUITUM-CHELONAE</i>	1
1.2 COMPLEXO <i>M. AVIUM-INTRACELLULARE</i>	2
1.3 INFECÇÕES MICOBACTERIANAS	2
1.3.1 Considerações gerais.....	2
1.3.2 Resposta imune as micobactérias	4
1.3.2.1 O papel do macrófago	4
1.3.2.2 Apresentação de antígenos	6
1.3.2.3 Resposta tipo Th1 e Th2.....	7
1.3.2.5 O papel do óxido nítrico	9
1.4 FAGOCITOSE E MICOBACTÉRIA.....	12
1.4.1 Trajeto intracelular.....	13
1.4.2 Características do fagossoma induzido por micobactéria	16
3. OBJETIVOS	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 CULTIVO DE CÉLULAS <i>IN VITRO</i>	21
5.2 MICOBACTÉRIAS PARA INFECÇÃO	21
5.2.2 Caracterização das micobactérias	22
5.3 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS	25
5.4 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS	26
5.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE <i>M. INTRACELLULARE</i> E <i>M. FORTUITUM</i>	26
5.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	27
5.7 DETERMINAÇÃO DA FUSÃO DE FAGOSSOMA COM LISOSSOMA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	27
5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
6. RESULTADOS	30
6.1 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS POR <i>M. INTRACELLULARE</i> E <i>M. FORTUITUM</i>	30
6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE <i>M. INTRACELLULARE</i> E <i>M. FORTUITUM</i>	30
6.3 ESTIMULAÇÃO POR IFN- γ E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO PRODUZIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS POR <i>M. INTRACELLULARE</i> E <i>M. FORTUITUM</i> ..	34
6.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPARTIMENTO INDUZIDO POR <i>M. INTRACELLULARE</i> E <i>M. FORTUITUM</i>	40
7. DISCUSSÃO	44
8. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

BCG: Bacilo de Calmette Guérin

EEA1: Antígeno 1 de endossomos primários

GM-CSF: Fator estimulador de crescimento de colônias de monócitos e granulócitos

GPLs: Glicolipídeos

HEPES: N-2hidroxitilpiperazina:N²-2-etano ácido sulfônico

IFN- γ : Interferon-gama

IL: Interleucina

iNOS: Óxido nítrico sintetase induzível

LAMP: Glicoproteína de membrana associada a lisossomas

L-NMA: N-monometil-L-arginina

LPS: Lipopolissacarídeo

MAC: Complexo *M. avium-intracellulare*

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal

NADPH: Dinucleotídeo nicotinamida–adenina fosfato reduzido

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

NK: Células matadoras naturais

NO: Óxido nítrico

NSF: Proteína de fusão sensível a N-etilmeleimida

PCR: Reação em cadeia da polimerase

SNAP: Proteína solúvel ligada à NSF

SNARE's: Receptores solúveis de proteínas de fusão sensíveis a N-etilmeleimida

TACO: proteína de cobertura contendo triptofano-aspartato

TGF: Fator de transformação e crescimento

Th: Linfócito T auxiliador

TLRs: Receptores do tipo *Toll*

TNF- α : Fator de necrose tumoral –alfa

RESUMO

AValiação DO PAPEL DE MACRÓFAGOS MURINOS NA INFECÇÃO POR MICOBACTÉRIAS AMBIENTAIS. JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES. Micobactérias ambientais podem ser encontradas em água, solo, poeira, alimentos e animais. A importância do estudo dessas micobactérias tem aumentado nos últimos anos, principalmente, devido a predisposição de pacientes com imunodeficiência à infecção por essas espécies de micobactéria. Além disso, a exposição a micobactérias ambientais pode constituir um dos fatores associados à baixa eficácia da imunização com a vacina BCG. As manifestações da doença, assim como a manutenção da infecção micobacteriana, dependem da interação entre a micobactéria e o sistema imune do hospedeiro. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis BALB/c infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*. Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* e as diferenças entre essas duas espécies quanto à capacidade de infectar e sobreviver no interior de macrófagos primários, tratados ou não com IFN- γ , e produzir óxido nítrico foram avaliadas. Foi observado que os macrófagos infectados com *M. fortuitum* apresentam um maior percentual de células infectadas que aqueles infectados com *M. intracellulare*, após 4, 24 e 48 horas de infecção. Entretanto, tanto *M. fortuitum* quanto *M. intracellulare* são capazes de sobreviver no interior de macrófagos peritoneais, pois não há alteração da carga bacilar dessa duas espécies de micobactéria ao longo da infecção. Observamos ainda que *M. intracellulare* induziu uma maior produção de óxido nítrico por macrófagos primários infectados e tratados por IFN- γ que *M. fortuitum*. No entanto, o pré-tratamento com IFN- γ não alterou o percentual de células infectadas nem a viabilidade de *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*. Os dados obtidos neste trabalho mostram que, *in vitro*, *M. fortuitum* e *M. intracellulare* interagem de formas distintas, levando à diferentes respostas do macrófago e a destinos intracelulares distintos. Além disso, mostramos que *M. intracellulare* e *M. fortuitum* são resistentes ao óxido nítrico produzido por macrófagos após ativação por IFN- γ .

1. Micobactérias ambientais. 2. *M. intracellulare*. 3. *M. fortuitum*. 4. Macrófago.

ABSTRACT

EVALUATION OF MICE MACROPHAGE ROLE ON ENVIRONMENTAL MYCOBACTERIA INFECTION. **JULIANA PERRONE BEZERRA DE MENEZES.** Environmental mycobacteria are found in water, soil, dust, food and animals. Environmental *Mycobacterium* importance has increased in the last few years, mostly because of immunodeficient patient predisposition to infection. Moreover, exposure to environmental mycobacteria could be associated to low levels of protection induced by immunization with BCG. Disease manifestations as well as infection outcome depend on interaction between mycobacteria and host immune system. The goal of this work was to evaluate peritoneal macrophage response, from the susceptible BALB/c mice, to *M. intracellulare* or *M. fortuitum* infection. Peritoneal inflammatory macrophages, pre-activated or not with IFN- γ , were infected by *M. intracellulare* or *M. fortuitum* and differences between these two species related to the capacity to infect macrophages, to survive intracellularly and to induce NO production were evaluated. It was observed that the percentage of *M. fortuitum*-infected cells was higher related to *M. intracellulare*-infected ones, after 4, 24 and 48 hours of infection. In addition, both *M. fortuitum* and *M. intracellulare* presented the ability to survive in peritoneal macrophages. It was also observed that in response to IFN- γ activation, *M. intracellulare* induced higher NO production than *M. fortuitum*. However, pre-activation with IFN- γ did not modify, neither the percentage of *M. intracellulare* and *M. fortuitum* infected cells, nor intracellular bacillum survival. These data demonstrate that, *in vitro*, *M. fortuitum* and *M. intracellulare* differently interact with macrophages, inducing different macrophage responses and that both *M. intracellulare* and *M. fortuitum* are resistant to NO production upon IFN- γ activation.

1. Environmental mycobacteria. 2. *M. intracellulare*. 3. *M. fortuitum*. 4. Macrophage.

1. INTRODUÇÃO

As micobactérias podem ser classificadas em quatro ou cinco grupos taxonômicos gerais de acordo com a patogenicidade para seres humanos e animais, crescimento e efeito da luz visível na produção de pigmentos em cultura (Runyon, 1974).

Micobactérias ambientais podem ser encontradas em água, solo, poeira, alimentos e animais. A importância do estudo das micobactérias ambientais tem aumentado nos últimos anos, principalmente, devido à predisposição de pacientes com imunodeficiência à infecção por estas espécies de micobactéria (Wagner *et al.*, 2004). O mecanismo da doença causada por essas micobactérias é pouco conhecido, mas a resposta tecidual caracteriza-se por lesões granulomatosas semelhantes àsquelas produzidas por *Mycobacterium tuberculosis* (Griffith *et al.*, 2004).

1.1 COMPLEXO *M. FORTUITUM-CHELONAE*

Micobactérias pertencentes ao complexo *M. fortuitum-chelonae* são bacilos álcool-ácido resistentes de crescimento rápido. O complexo *M. fortuitum-chelonae* agrupa o *M. fortuitum* e o *M. chelonae*, os quais foram divididos em diversas subespécies (Wallace *et al.*, 1983). Entretanto, estudos taxonômicos recentes propõem uma classificação mais complexa, inclusive com a identificação de novas espécies, como *M. abscessus* e *M. peregrinum* (Kusunoki *et al.*, 1992) e inclusão de novos membros neste grupo de micobactérias, como *M. mucogenicum* (Springer *et al.*, 1995).

1.2 COMPLEXO *M. AVIUM-INTRACELLULARE*

O complexo *M. avium-intracellulare* (MacMicking *et al.*) é composto por bacilos álcool-ácido resistentes, de crescimento lento, e que podem produzir um pigmento amarelo, o qual é intensificado pela exposição freqüente à luz. MAC é um complexo sorológico de 28 sorovars de duas espécies, *M. avium* e *M. intracellulare* (Wayne *et al.*, 1992). Distinções de sorovars dentro do MAC são baseadas em uma técnica de soroaglutinação descrita por Schaefer (Schaefer, 1979). A especificidade sorológica para micobactérias que compõem o MAC é conferida por resíduos de glicopeptidolipídios (GPLs), os quais são constituintes integrais da parede e envelope celular da bactéria (Brennan, 1989).

Estudos utilizando sondas de DNA específicas para *M. intracellulare* e *M. avium* identificaram que as cepas de sorovar 1 a 6 e 8 a 11 pertencem ao grupo *M. avium*, enquanto que as de sorovar 7 e 12-28 fazem parte do grupo *M. intracellulare* (Saito *et al.*, 1990; Yoshimura *et al.*, 1988).

1.3 INFECÇÕES MICOBACTERIANAS

1.3.1 Considerações gerais

Embora as micobacterioses sejam conhecidas há séculos, pouco se conhece sobre a patogênese dessas doenças. Os seres humanos são susceptíveis às infecções por *M. tuberculosis* e *M. leprae*. Entretanto, a maioria dos indivíduos expostos a essas micobactérias não desenvolve doença clínica, sugerindo o papel protetor do sistema imunológico (Chester *et al.*, 1986).

Micobactérias do complexo *M. fortuitum-chelonae* são bastante abundantes e estão amplamente distribuídas no ambiente (Wolinsky, 1992), tendo sido isoladas tanto do solo (Wolinsky *et al.*, 1968), quanto da água (Goslee *et al.*, 1976). Tais micobactérias são capazes de causar infecções atípicas tanto no homem como em outros animais (Kushner *et al.*, 1957; Wolinsky, 1992), no entanto a manifestação da doença é pequena. O comprometimento de tecidos moles e ósseas são mais freqüentes em infecções causadas por micobactérias pertencentes a este complexo, resultando da inoculação direta de materiais contaminados via injeções, cirurgias e ferimentos profundos (Wolinsky, 1992). Apesar de, inicialmente, o *M. fortuitum* não ter sido considerado como patógeno humano, diversos estudos relataram infecções causadas por esta espécie de micobactéria. Sabe-se que *M. fortuitum* pode causar abscessos cutâneos após trauma ou punção (Hand *et al.*, 1970), infecções pulmonares (Wolinsky, 1992) e, mais freqüentemente, infecções pós-cirúrgicas em pacientes submetidos a cirurgias cardiotorácicas (Hoffman *et al.*, 1981), oftalmológicas (Gelender *et al.*, 2000), ortopédicas (Ip *et al.*, 1992), abdominais (Matthews *et al.*, 1999) e estéticas (Haiavy *et al.*, 2002; Heistein *et al.*, 2000).

A infecção disseminada pelo *M. fortuitum* ocorre geralmente em indivíduos imunocomprometidos. Sack (Sack, 1990) relatou o primeiro caso de infecção cutânea disseminada, causada por *M. fortuitum*, em um paciente com AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida), mas, atualmente, há casos de meningite (Smith *et al.*, 1996), osteomielite (Gadre, 1997), linfadenite cervical (Butt, 1998), artrite séptica (Butt *et al.*, 1998) e infecção disseminada (Corti *et al.*, 1999; Crespo *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2001) causadas por *M. fortuitum* em pacientes com SIDA.

Assim como para o complexo *M. fortuitum-chelonae*, as micobactérias pertencentes ao MAC são capazes de causar doenças tanto em homens como em animais, sendo a incidência

de doença baixa (< 10 casos por 100.000 habitantes) a despeito de evidências das elevadas taxas de infecção, detectadas em cerca de 70% (Iseman *et al.*, 1985; Young *et al.*, 1986).

Estudos sugerem que o trato intestinal representa a via primária de infecção por MAC em pacientes com AIDS (Gray *et al.*, 1989) e que o trato respiratório é a porta de entrada menos freqüente (Jacobson *et al.*, 1991). Dessa forma, a disseminação da infecção nesses pacientes é geralmente precedida pela colonização do trato gastrointestinal, como evidenciado pela presença de grande número de bacilos na mucosa e submucosa intestinal e freqüência alta de positividade das culturas de fezes (Benson *et al.*, 1990).

A colonização assintomática intestinal e respiratória com MAC pode ser observada em indivíduos sadios, entretanto raramente ocorre o desenvolvimento da doença. Estudos com animais mostraram que fatores como acloridria gástrica e o uso de antibióticos orais facilitam a colonização por MAC. No entanto, observou-se também variação da virulência dessas micobactérias quando inoculadas por via oral (Bermudez *et al.*, 1992).

1.3.2 Resposta imune as micobactérias

1.3.2.1 O papel do macrófago

O sucesso na manutenção da infecção micobacteriana depende da capacidade do patógeno de inibir a resposta microbicida dos macrófagos, sua principal célula hospedeira. Possivelmente, uma das estratégias utilizadas pelas micobacterias para garantir sua sobrevivência no hospedeiro seja induzida pela persistência da infecção intracelular, taxa de crescimento lento, mesmo para aquelas espécies patogênicas, e inibição de resposta imune eficaz, que por fim leva, na maioria dos indivíduos, a infecção latente (Russell, 1994).

A internalização de *M. tuberculosis* pelos macrófagos leva a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B), que induz a transcrição de diversos genes, incluindo genes de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que uma vez produzidas levam ao recrutamento celular para o local da infecção (Ehrt *et al.*, 2001; Ragno *et al.*, 2001).

Além de serem as principais células hospedeiras na infecção micobacteriana, os macrófagos são responsáveis pela secreção de citocinas que desempenham um papel importante na resposta imune contra a micobactéria. A produção de interleucina 12 (IL-12) é induzida após a fagocitose de micobactéria por macrófagos e células dendríticas, levando à produção de interferon gama (IFN- γ) por células T e natural killer (NK) (Henderson *et al.*, 1997; Ladel *et al.*, 1997). IL-12 é uma citocina fundamental no controle da infecção por *M. tuberculosis*. Flynn e colaboradores (Flynn *et al.*, 1995) demonstraram que a administração de IL-12 em camundongos BALB/c infectados por *M. tuberculosis* reduz significativamente o número de bacilos e aumento da sobrevivência, mas não reduz a mortalidade. Adicionalmente, baixas concentrações de IL-12 foram detectadas em indivíduos infectados por MAC (Vankayalapati *et al.*, 2001).

Outras citocinas como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e linfotaxina participam da resposta protetora contra micobactérias, pois regulam a formação e manutenção dos granulomas (Bean *et al.*, 1999; Flynn *et al.*, 1995; Mohan *et al.*, 2001; Roach *et al.*, 2001). Além disso, foi demonstrado que TNF- α recombinante associado ao fator estimulador de colônias de monócitos e granulócitos (GM-CSF) induz atividade micobacteriostática e/ou micobactericida em macrófagos infectados por *M. avium* (Denis, 1991). A importância do TNF- α no controle do *M. tuberculosis* em humanos vem sendo demonstrada por diversos trabalhos e recentemente comprovada pela reativação da tuberculose em pacientes com artrite reumatóide submetidos à terapia anti-TNF- α (Feldmann *et al.*, 2001; Maini *et al.*, 1999). Estudos *in vivo* e *in vitro* revelam que a inibição de TNF- α ou o uso de camundongos

deficientes para cadeia p55 do receptor de TNF aumenta a proliferação de micobactérias e reduz a produção de óxido nítrico (NO) e formação de granulomas em camundongos infectados com *M. tuberculosis* ou *M. bovis* BCG (Kindler *et al.*, 1991; Kindler *et al.*, 1989; Kruys *et al.*, 1992).

A ativação excessiva de macrófagos pode levar à destruição tecidual pela excessiva produção de TNF- α e IL-1 com efeitos sistêmicos (Peetermans *et al.*, 1994). Diversos mecanismos desativadores de macrófagos são propostos, tais como morte dos macrófagos por apoptose ou estimulação por moléculas que antagonizam os efeitos de citocinas ativadoras (Murray, 1999). IL-10 e fator de transformação e crescimento (TGF- β), citocinas desativadoras de macrófagos (Bogdan *et al.*, 1991), parecem desempenhar papel importante em infecções micobacterianas (Bermudez *et al.*, 1993). IL-6 também parece desempenhar efeito supressor na ativação do macrófago (Bermudez *et al.*, 1989; Blanchard *et al.*, 1991; Denis *et al.*, 1990)), sendo essencial na inibição da linfoproliferação na presença de macrófagos murinos derivados de medula óssea e infectados com micobactérias (VanHeyningen *et al.*, 1997). Além desses efeitos, há evidências de que IL-6 estimula também o crescimento intracelular de MAC (Shiratsuchi *et al.*, 1991).

1.3.2.2 Apresentação de antígenos

A capacidade reduzida de macrófagos infectados pelo *M. bovis* bacilo de Calmette Guérin (BCG) de apresentar antígenos micobacterianos via complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe II está relacionada aos bacilos residirem em compartimentos privilegiados, no interior dos quais não ocorre processamento ou complexação de antígenos micobacterianos com moléculas MHC (Pancholi *et al.*, 1993). Para que ocorra apresentação

de antígenos, é necessário que ocorra o encontro do antígenos de micobactérias com vacúolos acidificados por proteases (Holsti *et al.*, 1996).

O *M. tuberculosis* também é capaz de estimular a apresentação de antígenos via MHC classe I (Kaufmann, 1999). Foi sugerido que *M. tuberculosis* é capaz de perfurar a membrana do fagossoma, tendo acesso a nutrientes citosólicos (Myrvik *et al.*, 1984) e que bacilos viáveis são capazes de facilitar o trânsito de macromoléculas entre o citosol e o fagossoma micobacteriano, interferindo assim na patogenicidade e imunidade (Teitelbaum *et al.*, 1999). Dessa forma, a presença de antígenos micobacterianos no citosol possibilitaria a apresentação via MHC classe I.

Demonstrou-se também, que as micobactérias podem comprometer a capacidade de macrófagos infectados em estimular a proliferação de células T (Molloy *et al.*, 1990; Moreno *et al.*, 1989; Myrvang *et al.*, 1973), devido à limitação da capacidade de apresentação de antígeno pela célula hospedeira (Kwan *et al.*, 1992).

1.3.2.3 Resposta tipo Th1 e Th2

Tanto células T CD4⁺ quanto CD8⁺ participam na defesa contra micobactérias. O controle de infecções micobacterianas por células T CD4⁺ é dependente de citocinas produzidas por essas células. Células T auxiliaadoras antígeno-específicas reconhecem antígenos bacterianos e secretam citocinas que ativam macrófagos, a exemplo do IFN- γ (Murray, 1999). A ativação de macrófagos por citocinas, isoladas ou combinadas, potencializa a capacidade antimicobacteriana dessas células, resultando no controle da infecção *in vitro* (Rook, 1986 ; Flesch, 1987;(Appelberg *et al.*, 1993)) e *in vivo* (Cooper *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1995). Células T CD4⁺ específicas são importantes produtoras de IFN- γ . Produzida durante a infecção micobacteriana também por células CD8⁺ (Barnes *et al.*, 1993; Lalvani *et*

al., 1998; Lyadova *et al.*, 1998; Orme *et al.*, 1992; Orme *et al.*, 1993; Serbina *et al.*, 1999), e células NK, IFN- γ é a citocina central no controle da infecção micobacteriana.

Estudo recente sobre alterações nos níveis de transcrição gênica de citocinas T auxiliaadoras 1 e 2 (Th1 e Th2), durante a infecção por *M. tuberculosis*, revela que a imunidade é tipo Th1 (Jung *et al.*, 2002). Estudos anteriores demonstraram que camundongos deficientes na produção de IFN- γ não são capazes de inibir o crescimento dos bacilos (Cooper *et al.*, 1993; Flynn *et al.*, 1993). A secreção de IL-12 por células apresentadoras de antígeno é essencial para a indução de resposta Th1, uma vez que a função principal de IL-12 é induzir a secreção de IFN- γ , em especial por células NK. Além disso, o IFN- γ ativa macrófagos murinos, inibindo a proliferação de alguns isolados de MAC (Appelberg *et al.*, 1993), e, IFN- γ em associação com TNF- α , é capaz de inibir o crescimento de *M. bovis* e *M. tuberculosis* (Appelberg *et al.*, 1993; Denis *et al.*, 1990).

Estudos sobre o papel do IFN- γ em infecções causadas por micobactérias ambientais menos comuns, como *M. fortuitum*, são escassos na literatura. O pré-tratamento com IFN- γ é capaz de reduzir o crescimento intracelular em macrófagos murinos infectados por *M. fortuitum* (Sato *et al.*, 1996). Além disso, foi descrito um caso de infecção disseminada causada por *M. fortuitum* e MAC em indivíduo portador de mutação gênica para o receptor de IFN- γ , sugerindo a importância dessa citocina no controle de micobacterioses ambientais (Dorman *et al.*, 1998). Por outro lado, elevados níveis de IFN- γ em camundongos infectados por *M. fortuitum* estão associados à carga bacilar elevada, evidenciando que o papel do IFN- γ no controle de *M. fortuitum* ainda é controverso (Parti *et al.*, 2005).

Evidências apontam para a necessidade de um segundo indutor da expressão da óxido nítrico sintetase induzível (iNOS) para que IFN- γ exerça a função de controlar o crescimento da micobactéria. A expressão de iNOS é regulada transcricionalmente pela ação sinérgica de IFN- γ e de um agonista da via do fator nuclear κ B (NF- κ B) (Aston *et al.*, 1998; Bonocini-

Almeida *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 1994). IFN- γ regula a expressão do fator de transcrição IRF-1, que é essencial para a transcrição da iNOS (Kamijo *et al.*, 1994), enquanto citocinas como TNF- α ou IL-1 e lipopolissacarídeo (LPS) regulam a translocação nuclear de NF- κ B, seguindo a degradação de seu inibidor, I κ B. Quando macrófagos são estimulados por LPS e IFN- γ , simultaneamente, grandes quantidades da enzima iNOS são produzidas, em comparação com a estimulação por cada agonista sozinho.

A resposta imuno-inflamatória à infecção por *Mycobacterium* sp. tem sido estudada através da infecção experimental de diferentes linhagens de camundongos (Gangadharam, 1986). A utilização de um modelo *in vivo* é de fundamental importância para o conhecimento dos diversos fatores que favorecem o aparecimento da doença. Apesar de camundongos A/J serem utilizados como uma linhagem susceptível ao *M. fortuitum* (Tomioka *et al.*, 1993), em estudo realizado em nosso laboratório, demonstramos que camundongos BALB/c apresentam um perfil de susceptibilidade à infecção por *M. intracellulare* e *M. fortuitum* (Bezerra de Menezes, 2003).

1.3.2.5 O papel do óxido nítrico

Óxido nítrico é gerado a partir da L-arginina pela oxidação de um nitrogênio terminal no grupo guanidino, uma reação catalisada pela enzima NO sintetase. Essa família de enzimas compreende pelo menos duas diferentes subfamílias: uma subfamília é dependente de cálcio e calmodulina e é expressa constitutivamente em alguns tipos celulares, notadamente no endotélio e alguns neurônios. A outra subfamília, que não depende de cálcio ou calmodulina como co-fatores, produz grandes quantidades de óxido nítrico por um longo período de tempo em macrófagos ativados e muitos outros tipos celulares.

O processo bioquímico envolvido na síntese de óxido nítrico requer oxigênio molecular, dinucleotídeo nicotinamida–adenina fosfato reduzido (NADPH) e flavina ligada à enzima iNOS. NO promove a produção de outros intermediários reativos de nitrogênio, incluindo peroxinitrito e compostos de nitrosotiol, sendo o nitrito e o nitrato, os produtos finais estáveis e mensuráveis.

A produção elevada de óxido nítrico por macrófagos ativados constitui o principal mecanismo microbicida (Chan *et al.*, 1999; Fang, 1997; MacMicking *et al.*, 1997). IFN- γ e TNF- α foram identificados como as citocinas-chave responsáveis pela indução desse mecanismo antimicrobiano (Ding *et al.*, 1988). A importância do óxido nítrico na defesa do hospedeiro contra algumas espécies de micobactéria, tanto *in vitro* como *in vivo*, está bem estabelecida, principalmente no modelo murino (Chan *et al.*, 1999; Da Silva *et al.*, 2002; MacMicking *et al.*, 1997; Shiloh *et al.*, 2000).

Estudos anteriores demonstraram que camundongos deficientes para a iNOS não são capazes de controlar a infecção por *M. tuberculosis* (Jung *et al.*, 2002; MacMicking *et al.*, 1997; Scanga *et al.*, 2001). A inibição do crescimento de *M. tuberculosis* e *M. bovis* observada em macrófagos ativados foi atribuída à liberação de óxido nítrico (Flesch *et al.*, 1991). Adicionalmente, sabe-se que a inibição do crescimento de *M. tuberculosis* pode ser revertida tanto *in vivo* em camundongos *knockouts*, como *in vitro* pela adição de um inibidor da iNOS à cultura de macrófagos estimulados por IFN- γ associado ao LPS ou TNF- α (Chan *et al.*, 1995; MacMicking *et al.*, 1997).

No modelo murino, o óxido nítrico desempenha um papel protetor tanto nas infecções persistentes crônicas quanto nas agudas (Flynn *et al.*, 1998; MacMicking *et al.*, 1997). Além disso, evidências sugerem que o óxido nítrico também desempenha um papel importante na defesa contra a tuberculose humana. Estudos anteriores detectaram, por imuno-histoquímica,

níveis elevados de expressão de iNOS em macrófagos obtidos, a partir de lavagem bronco-alveolar, de indivíduos com tuberculose ativa (Nicholson *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998).

No entanto, o papel do óxido nítrico no controle de infecções causadas por MAC é controverso. Macrófagos humanos tratados com TNF- α e infectados com *M. avium* avirulenta exercem função bactericida por um mecanismo dependente de intermediários reativos de nitrogênio (Denis, 1991). Além disso, foi demonstrado em estudo utilizando macrófagos murinos ativados por IFN- γ e infectados com *M. avium* que existe correlação entre a atividade anti-bacteriana destas células e a produção de intermediários reativos de nitrogênio (Sato *et al.*, 1998). Weatherby e colaboradores (Weatherby *et al.*, 2003) demonstraram ainda que o mecanismo pelo qual a estimulação alfa(2)-adrenérgica leva macrófagos a resistir ao crescimento de *M. avium* é o aumento da produção de peroxinitrito. No entanto, foi demonstrado que camundongos deficientes para o gene de iNOS não apresentam aumento do crescimento de *M. avium* (Doherty *et al.*, 1997). Adicionalmente, Gomes e colaboradores (Gomes *et al.*, 1999) demonstraram que o óxido nítrico não participa dos mecanismos antimicobacterianos de macrófagos murinos infectados por *M. avium* e pode contribuir agravando a infecção pela supressão da resposta imune ao patógeno, ao inibir a produção de IFN- γ por células T antígeno-específicas. Além disso, estudos *in vitro* utilizando macrófagos murinos derivados de medula óssea demonstraram que bacilos da maioria das cepas de *M. avium* são capazes de sobreviver e se multiplicar dentro destas células. O tratamento com IFN- γ e/ou TNF- α inibe o crescimento dos bacilos, contudo não é revertido pela presença de inibidor da iNOS, L-NMA (N-monometil-L-arginina) (Appelberg *et al.*, 1994; Appelberg *et al.*, 1993). Finalmente, foi demonstrado que a produção de óxido nítrico por macrófagos alveolares de ratos não inibe o crescimento dos bacilos de *M. intracellulare* (Doi *et al.*, 1993).

Em estudo comparativo com *M. intracellulare* e *M. fortuitum* realizado anteriormente em nosso laboratório, foi demonstrado que células da linhagem murina J774 infectadas com

M. intracellulare apresentam uma maior produção de óxido nítrico do que aquelas infectadas com *M. fortuitum*. Apesar do bloqueio do óxido nítrico não alterar a viabilidade dos dois bacilos, há uma relação inversa entre a produção do óxido nítrico e a viabilidade apenas de *M. intracellulare*. Esse dado indica que, em células J774, *M. intracellulare* é mais sensível ao estímulo por IFN- γ (Da Silva *et al.*, 2002).

1.4 FAGOCITOSE E MICROBACTÉRIA

Diversos receptores presentes na superfície celular podem participar da ligação e fagocitose de micobactérias, incluindo receptores manose, receptores para porção Fc de imunoglobulinas (Armstrong *et al.*, 1975), receptores *scavenger* (Zimmerli *et al.*, 1996) e receptores do complemento, sendo os últimos os principais receptores envolvidos na fagocitose de micobactérias não opsonizadas e opsonizadas (Brown, 1991; Schlesinger, 1996; Schorey *et al.*, 1997).

A interação entre o ligante na superfície do patógeno e os receptores presentes nas células hospedeiras representa uma etapa importante para o tráfego do patógeno para o interior destas células. A internalização de bacilos mediada por receptores Fc leva à ativação de uma via de sinalização que contribui para a resposta inflamatória, como a ativação de macrófagos (Coso *et al.*, 1995; Minden *et al.*, 1995). Bacilos opsonizados com anticorpos específicos contra *M. tuberculosis* são internalizados via receptores Fc γ de macrófagos, resultando na completa maturação dos fagossomas micobacterianos (Armstrong *et al.*, 1975).

A fagocitose de micobactérias via receptores do complemento (CR) leva à ativação de uma via de sinalização diferente, a qual não resulta na ativação de mecanismos bactericidas (Bokoch, 1995; Caron *et al.*, 1998; Cox *et al.*, 1997). A internalização de *M. tuberculosis* mediada por CR resulta na formação de fagossomas que não fusionam com lisossomas da

célula hospedeira (Armstrong *et al.*, 1971). Além disso, foi demonstrado que a ligação com CR3 parece suprimir seletivamente a produção de IL-12, um modulador importante da resposta imune celular contra micobactéria (Marth *et al.*, 1997; Sutterwala *et al.*, 1997).

A presença de colesterol na membrana plasmática parece desempenhar um papel importante na internalização de micobactéria via receptor do complemento, uma vez que a fagocitose dos bacilos é inibida após a depleção de colesterol da membrana plasmática dos macrófagos (Gatfield *et al.*, 2000).

Outra classe de receptores importantes na internalização da micobactéria é a dos receptores tipo *Toll* (TLRs). Estudos demonstraram que, *in vitro*, TLR2 e TLR4 participam na resistência de camundongos contra tuberculose (Means *et al.*, 2001; Means *et al.*, 1999). O papel do TLR4, *in vivo*, é contraditório. Estudo utilizando camundongos deficientes para TLR4, demonstrou que a ausência deste receptor leva à uma redução da resistência e, conseqüentemente, uma redução da sobrevivência dos animais (Abel *et al.*, 2002). Entretanto, a presença ou ausência de TLR4 não resulta em diferentes respostas à infecção pelo *M. tuberculosis* (Kamath *et al.*, 2003).

1.4.1 Trajeto intracelular

Os fagossomas formados pela internalização de partículas inertes passam por uma série de eventos de maturação que refletem os estágios da via endossomal-lisossomal (Pitt *et al.*, 1992). O fagossoma formado sofre fusões com lisossomas da célula, constituindo um processo complexo de maturação (Desjardins *et al.*, 1994). Os eventos de fusão são regulados por proteínas da família das SNARE's (receptores solúveis de proteínas de fusão sensíveis a N-etilmeleimida) e Rab (Rothman *et al.*, 1997). As SNAREs participam do processo de fusão pela interação de uma v-SNARE específica (presente na membrana da vesícula) com uma t-

SNARE (presente na membrana alvo), permitindo assim a especificidade da ligação (Sollner *et al.*, 1993; Whiteheart *et al.*, 1993). As proteínas Rab são pequenas proteínas G, cujo papel é ligar e hidrolisar o GTP, promovendo o ancoramento de vesículas as membranas alvo e ao complexo SNARE (Colombo *et al.*, 1992; Mayorga *et al.*, 1989; Novick *et al.*, 1997). O ciclo de ligação e hidrólise do GTP regula a taxa de fusão vesicular (Lodish *et al.*, 2000). A distribuição das proteínas Rab é diferenciada através da via endocítica. Rab5 e Rab7 são pequenas GTPases que controlam o tráfego da via endocítica. Rab5 regula o transporte da membrana plasmática ao endossoma primário e a fusão homotípica destes compartimentos, enquanto Rab7 regula o transporte do endossoma primário ao endossoma tardio (Bucci *et al.*, 1992; Feng *et al.*, 1995; Gorvel *et al.*, 1991). Além das proteínas SNARE e Rab, o processo de fusão de vesículas em células de mamíferos requer a participação de fatores citosólicos como NSF (proteína de fusão sensível a N-etilmeleimida), cuja função é desassociar o complexo SNARE formado com a fusão, permitindo a reciclagem do monômero SNARE e a progressão do transporte vesicular, e SNAP (proteína solúvel de ligação à NSF), que se liga ao complexo SNARE e, posteriormente, à NSF, estimulando sua função de ATPase (Pryer *et al.*, 1992; Rothman *et al.*, 1992; Whiteheart *et al.*, 1993).

A partícula fagocitada induz à formação de compartimentos com características de endossomas primários, os quais acidificam em pH em torno de 6 e adquirem marcadores de membrana de endossomas primários, como Rab5 e receptor manose. O processo de acidificação é mediado pela proton-ATPase, um complexo protéico que se acumula durante a biogênese do endossomo (Casciola-Rosen *et al.*, 1992; Fuchs *et al.*, 1989; Maxfield *et al.*, 1987). Em pH 6,0 alguns ligantes, como a transferrina ligada ao ferro, se dissociam de seus receptores que reciclam retornando à superfície da célula (Goldenthal *et al.*, 1988).

Uma vez que a maturação do fagossoma é um processo dinâmico, suas características continuam a mudar com a aquisição posterior de proteínas transmembranas através da fusão

com vesículas. A posterior redução do pH para cerca de 5,5, o surgimento de LAMP (glicoproteína de membrana associada a lisossomos), catepsina D, Rab7 e receptor manose-6-fosfato caracterizam o endossoma tardio. O receptor manose-6-fosfato é responsável pela entrega de hidrolases lisossomais da via trans-Golgi para o endossoma tardio. Na maturação para lisossoma, o receptor manose-6-fosfato é removido e a concentração de LAMP e catepsina D aumenta. O pH do lisossoma varia em torno de 4,5 a 5,0 (Kornfeld *et al.*, 1989).

Os patógenos intracelulares apresentam diversas estratégias para subverter processos fundamentais em células eucarióticas ou converter seus compartimentos subcelulares em ambientes favoráveis para seu crescimento, multiplicação e, em alguns casos, sua persistência (Finlay *et al.*, 1997). Patógenos como *Listeria*, *Shigella* e *Trypanosoma* são capazes de escapar dos fagossomas por eles induzidos e se multiplicar no citosol, enquanto *Leishmania* e *Coxiella* parecem resistir às enzimas hidrolíticas dos lisossomas das células do hospedeiro, sendo capazes de sobreviver e se multiplicar dentro desses compartimentos (Akporiaye *et al.*, 1983; Alexander *et al.*, 1975; Gaillard *et al.*, 1987; Havell, 1986; High *et al.*, 1992; Milder *et al.*, 1980).

Outros microorganismos patogênicos, como o *Mycobacterium*, modulam a maturação dos fagossomas nos quais se encontram, por restrição da progressão dos fagossomas a fagolisossomas. Desta forma, os vacúolos nos quais esses microorganismos persistem exibem fusão limitada com lisossomas (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Além disso, foi demonstrado, recentemente, que *M. marinum* é capaz de escapar do fagossoma para o citosol (Stamm *et al.*, 2003).

1.4.2 Características do fagossoma induzido por micobactéria

Está bem documentado que fagossomas induzidos por diferentes espécies de micobactéria apresentam acidificação reduzida (Crowle *et al.*, 1991; Hackam *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 1996), o que foi associado ao bloqueio no acúmulo de bombas de próton-ATPase nesses compartimentos (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994). Foi sugerido que esse bloqueio pode ser decorrente de um mecanismo seletivo de inibição da fusão de vesículas contendo bombas de próton com fagossomas em formação ou à rápida remoção da bombas após ter sido entregue ao fagossoma (Russell, 1998).

Apesar dos fagossomas induzidos pelas micobactérias não apresentarem bombas de próton na sua membrana, estes fusionam livremente com vesículas contendo LAMP (glicoproteínas de membrana associadas a lisossomas) (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994). Foi demonstrado que fagossomas formados por *M. tuberculosis* em macrófagos murinos derivados de medula óssea apresentam LAMP em suas membranas (Xu *et al.*, 1994). Em contraste, uma fraca marcação para LAMP foi observada em fagossomas induzidos por *M. tuberculosis* em estudos quantitativos de microscopia eletrônica com monócitos humanos (Clemens *et al.*, 1995).

Além da ausência de bombas de prótons na sua membrana, os fagossomas induzidos por micobactéria são caracterizados pela persistência de marcadores de endossomos primários e aquisição limitada de marcadores de endossomos tardios (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996). Foi demonstrado que o fagossoma induzido por *M. tuberculosis* não apresenta receptores de manose-6-fosfato, um marcador de endossoma tardio, mas sim receptores para transferrina, um marcador de reciclagem endossomal (Clemens *et al.*, 1995). Estudos prévios mostraram que os fagossomas induzidos por *M. tuberculosis* e *M. avium* permanecem acessíveis à transferrina internalizada (Clemens *et al.*, 1996; Sturgill-Koszycki *et al.*, 1996). A

manutenção dessas características de endossoma primário parece requerer atividade metabólica presente nos bacilos vivos, uma vez que bacilos mortos são internalizados em vacúolos que acidificam e fusionam livremente com lisossomas (Clemens *et al.*, 1996). O bloqueio da maturação de fagossomas contendo micobactéria ocorre entre estágios controlados por Rab5 e Rab7 (Via *et al.*, 1997). Assim, estes compartimentos adquirem e acumulam Rab5, entretanto não adquirem Rab7. Recentemente, foi sugerido que Rab5 facilitaria a aquisição de ferro pela micobactéria internalizada (Kelley *et al.*, 2003) e que EEA1 (autoantígeno 1 de endossomas primários), molécula efetora de Rab5 que participa do processo de fusão, não é recrutado para o fagossoma induzido pela micobactéria (Fratti *et al.*, 2001).

Outra característica dos fagossomas induzidos por micobactérias que aparentemente associa-se à sobrevivência dos bacilos é a presença da proteína TACO (proteína de cobertura contendo triptofano-aspartato). Em estudos utilizando macrófagos murinos da linhagem J774 A1 infectados por *M. bovis* BCG, foi demonstrado que a proteína TACO, presente em macrófagos, é recrutada e retida ativamente em fagossomas contendo micobactéria viva. Os autores sugerem que esse seria o mecanismo que previne a fusão de fagossomas micobacterianos com lisossomas, favorecendo assim a sobrevivência dos bacilos no interior de macrófagos (Ferrari *et al.*, 1999).

Em estudo no qual comparamos a resposta da linhagem macrofágica J774 às micobactérias ambientais, *M. intracellulare* e *M. fortuitum*, avaliamos a capacidade de fusão de fagossomas de *Mycobacterium* sp. com lisossomas e demonstramos que os fagossomas induzidos por *M. intracellulare* fusionam 69% mais que aqueles induzidos por *M. fortuitum*, indicando que espécies diferentes de micobactérias ambientais interagem de forma distinta com a célula hospedeira (Da Silva *et al.*, 2002).

2. JUSTIFICATIVA

A tuberculose é a doença infecciosa mais comum em todo o mundo. Com o aparecimento da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), houve um aumento significativo do número de casos novos de tuberculose, principalmente nos países do terceiro mundo. Além do *M. tuberculosis*, micobactérias ambientais são uma causa comum de infecções bacterianas disseminadas em pacientes imunocomprometidos, aumentando a morbi/mortalidade em indivíduos com imunodeficiência (Horsburgh, 1991; Horsburgh *et al.*, 1989). Além disso, a exposição a micobactérias ambientais pode constituir um dos fatores associados à baixa eficácia da imunização com a vacina BCG (Black *et al.*, 2002). Adicionalmente, foi demonstrado que a sensibilização prévia com micobactérias ambientais pode inibir a multiplicação do BCG, prevenindo a indução de uma resposta imune eficaz mediada por BCG e proteção contra a tuberculose (Brandt *et al.*, 2002). O efeito inibitório de micobactérias ambientais na eficácia do BCG depende da extensão do reconhecimento cruzado de antígenos compartilhados com a vacina, indicando que a exposição prévia a micobactérias ambientais, dependendo da espécie, deve influenciar na resposta à vacinação (Demangel *et al.*, 2005).

Em estudo *in vitro* realizado em nosso laboratório, foi demonstrado que *M. intracellulare* e *M. fortuitum* induzem diferentes respostas em células de linhagem estimuladas por IFN- γ . Sabe-se que a natureza dos compartimentos nos quais os microorganismos se instalam influencia na sobrevivência dos mesmos no interior da célula (Crowle *et al.*, 1991). *M. fortuitum* induz, *in vitro*, fagossomas que têm fusão restrita com lisossomas, porém os bacilos viáveis de *M. intracellulare* induzem fagossomas que fusionam amplamente com lisossomas. Essa diferença observada *in vitro* pode também ocorrer *in vivo*. É provável que, *in vivo*, essas micobactérias ao infectar macrófagos induzam a formação de

fagossomas e fagolisossomas, respectivamente. Isso deve influenciar no processamento e apresentação de antígenos dessas duas espécies de micobactérias e, conseqüentemente, na resolução do processo infeccioso. No entanto, nos estudos realizados com células de linhagem em que avaliamos tempos mais curtos de infecção, não foram observadas diferenças nem no percentual de células infectadas, nem na carga bacilar, quando comparados *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Com as células de linhagem não foi possível realizar estudos em tempos mais longos, pois elas arredondavam e se soltavam da placa, evidenciando a característica de imaturidade desse tipo celular. Além disso, estudos nos quais utilizam-se macrófagos peritoneais inflamatórios observa-se melhor os eventos ocorridos *in vivo*. Este trabalho permitirá avaliar a resposta de macrófagos peritoneais inflamatórios de camundongos BALB/c infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*, desde a fase inicial até momentos mais tardios da infecção por essas micobactérias.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a interação entre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c e *M. fortuitum* ou *M. intracellulare*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a capacidade de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* de infectar e sobreviver no interior de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

3.2.2 Avaliar a capacidade de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* de induzir a produção de óxido nítrico em macrófagos ativados por IFN- γ *in vitro*.

3.2.3 Caracterizar o compartimento induzido por *M. intracellulare* e *M. fortuitum*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CULTIVO DE CÉLULAS *IN VITRO*

Macrófagos peritoneais obtidos do peritônio de camundongos BALB/c foram cultivados a 37°C e 5% CO₂ em RPMI (SIGMA) suplementado com 25 mM de HEPES (N-2-hidroetilpiperazina:N'-2-etano ácido sulfônico) (SIGMA) pH 7,4, 2 mM de glutamina (SIGMA), 0,02 mg/ml de ciprofloxacina, 2 g/l de bicarbonato de sódio (SIGMA) e 10% de soro bovino fetal (GIBCO) – RPMI completo.

5.2 MICOBACTÉRIAS PARA INFECÇÃO

Colônias de *M. intracellulare* e de *M. fortuitum* foram cultivadas em ágar 7H10 suplementado com 10% de Middlebrook OADC Enrichment (OADC/ BECTON, DICKINSON AND COMPANY) a 37°C. Essas cepas de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* foram isoladas, respectivamente, a partir de fígado e baço de camundongos C57BL/6 e BALB/c nu/nu infectados e caracterizadas por genotipagem, pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), por Dra. Sylvia Leão (Da Silva *et al.*, 2002). Após 30 dias de infecção com essas cepas, os animais foram sacrificados e fragmentos de fígado e baço foram homogeneizados e cultivados em meio ágar 7H10 (DIFCO), por 10 dias, a 37°C. As colônias foram então expandidas, distribuídas em alíquotas com 20% de glicerol e congeladas a – 70°C. Vinte dias antes de cada experimento as micobactérias foram descongeladas e plaqueadas em meio ágar 7H10 (DIFCO) e as colônias foram coletadas, ressuspensas e diluídas em meio 7H9 (DIFCO) para a obtenção da concentração desejada para a infecção, no dia do experimento. Deste modo, foram sempre utilizadas nos experimentos micobactérias em primeira passagem.

5.2.1 Caracterização das micobactérias

A identificação das micobactérias estudadas foi realizada usando a combinação de PCR com digestão enzimática dos produtos amplificados, método comumente denominado PCR-Restriction Enzyme Analysis (PRA). A técnica PRA-*hsp65* descrita em 1993 por (Telenti *et al.*, 1993) se baseia na amplificação de um fragmento de 441 pb do gene *hsp65* e digestão com as enzimas *BstE* II e *Hae* III.

As bactérias foram crescidas em meio de cultivo sólido específico para micobactérias 7H10-OADC (Middlebrook 7H10 suplementado com ácido oléico, catalase, albumina e dextrose – OADC, BBL do Brasil) e em meios não específicos (meio de Luria Bertani – triptona, NaCl, extrato de levedura e Ágar), para observação da velocidade de crescimento, pigmentação e capacidade de crescimento em meios não específicos.

Para identificação molecular, os diferentes tipos de colônias foram isolados e colônias com características semelhantes foram reunidas, ressuspensas em 100µL de TET (Tris-HCl 10mM pH 7,5, EDTA 1mM, Triton X-100 1%) e esta mistura foi submetida a 3 ciclos de fervura e congelamento a -20 °C, por 10 minutos cada etapa, para extração do DNA. Para cada reação de PCR foram utilizados 10µL do sobrenadante deste lisado. As condições da PCR estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Condições da PCR utilizada para amplificar um fragmento do gene *hsp65* (PRA)

INICIADORES	Tb11 5' ACCAACGATGGTGTGTCCAT 3' Tb12 5' CTTGTCTGAACCGCATACCCT 3'		
REAÇÃO	KCl 50mM Tris-HCl 10mM pH8 MgCl ₂ 1,5mM dNTPs 200µM Glicerol 10% iniciadores 0,5µM Taq DNA Polimerase 1U		
AMPLIFICAÇÃO	1 ciclo	94 °C	5 mim
	45 ciclos	94 °C	1 mim
		65 °C	1 mim
		72 °C	1mim
	1 ciclo	72 °C	10 mim
ELETROFORESE	agarose 1%	100V	
PRODUTO	441pb		

Após a reação de PCR, metade do volume desse produto de amplificação foi digerido com a enzima *BstE* II (Promega) a 60 °C por 2 horas e outra alíquota igual foi digerida com a enzima *Hae* III (Invitrogen) a 37 °C por 2 horas. Após as digestões, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (FMC – Biologia Molecular do Brasil) a 4%. Após a eletroforese a 5V/cm, o gel foi corado com brometo de etídio (Sigma-Aldrich) e visualizado em transiluminador sob luz ultra-violeta. Os resultados foram interpretados por comparação com perfis de PRA-*hsp65* publicados (Devallois *et al.*, 1997; Leão S.C., 2004). Foram observados dois tipos de colônias:

1. colônias brancas, grandes, com crescimento visível em poucos dias de cultivo, inclusive em meios não específicos para crescimento de micobactérias, características de micobactérias de crescimento rápido (Figura 1A).

2. colônias cor creme, pequenas, que cresceram principalmente no meio específico para micobactérias 7H10-OADC. Observou-se crescimento incipiente no meio LB somente

após muitos dias e com poucas colônias, características de micobactérias de crescimento lento (Figura 1B).

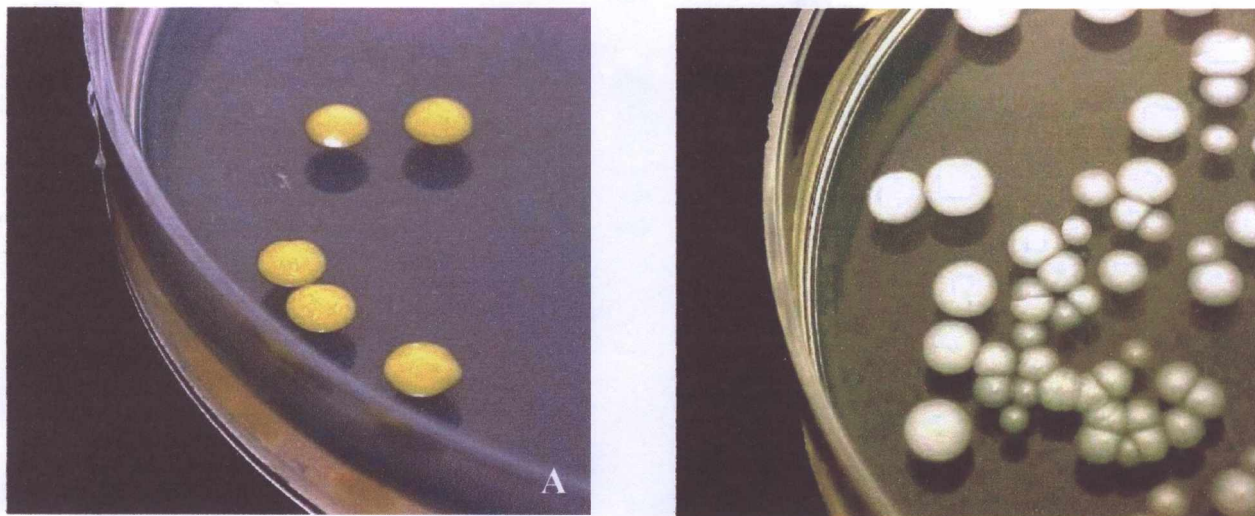


Figura 1 – Colônias formadas por *M. intracellulare* (A) e por *M. fortuitum* (B) em meio 7H10.

Após a realização do método PRA-*hsp65*, as bactérias das colônias 1 apresentaram perfil de digestão com a enzima *BstE* II (235 pb – 115 pb – 85 pb) e *Hae* III (145 pb – 120 pb – 60 pb – 55 pb) característico de *M. fortuitum* I e as bactérias das colônias 2 apresentaram perfil de digestão com a enzima *BstE* II (235 pb – 115 pb – 100 pb) e *Hae* III (145 pb – 130 pb – 60 pb) característico de *M. intracellulare* I (Figura 2).

3.3 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS

Após os macrófagos peritoneais serem isolados e cultivados por 24 horas e lavados para retirada de células não aderidas, foram incubados na presença ou não de 100 U/ml de IFN- γ (R&D), na concentração de 2×10^7 ou 10^8 células/ml, em placas de 24 poços (Costar) contendo lamínulas de vidro, em triplicata, em RPMI completo sem ciprofloxacina (RPMI para infecção). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO $_2$, as células foram infectadas por *M.*

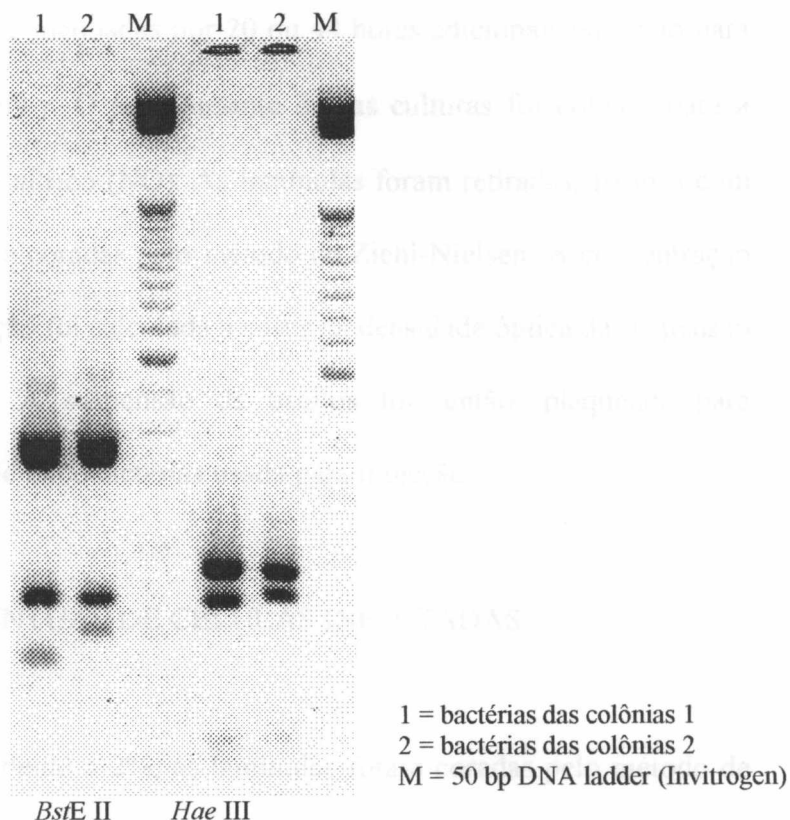


Figura 2 – Perfil de digestão das colônias com as enzimas *BstE II* e *Hae III*. Após a cultura, as colônias de micobactéria foram ressuspensas para extração de DNA. Em seguida, foi realizado o método PRA-*hsp65*. As bactérias das colônias 1 apresentaram perfil de digestão com a enzima *BstE II* (235 pb – 115 pb – 85 pb) e *Hae III* (145 pb – 120 pb – 60 pb – 55 pb) característico de *M. fortuitum I* e as bactérias das colônias 2 apresentaram perfil de digestão com a enzima *BstE II* (235 pb – 115 pb – 100 pb) e *Hae III* (145 pb – 130 pb – 60 pb) característico de *M. intracellulare I*.

5.3 INFEÇÃO DE MACRÓFAGOS

Após os macrófagos peritoneais terem sido cultivados por 24 horas e lavados para retirada de células não aderidas, foram incubados na presença ou não de 100 UI/ml de IFN- γ (Vival, foram distribuídos em triplicata em placas de 24 poços (Costar) e incubados por 24 horas com 10 células por célula, como descrito nos métodos. Em seguida, duas células foram usadas com solução de *M. fortuitum I* na presença de 20 μ g/ml de inibidor de proteases (R&D), na concentração de 2×10^5 ou 10^6 células/ml, em placas de 24 poços (Costar) contendo lamínulas de vidro, em triplicata, em RPMI completo sem ciprofloxacina (RPMI para infecção). Após 24 horas de incubação a 37°C e 5% CO $_2$, as células foram infectadas por *M.*

intracellulare opaca ou *M. fortuitum* transparente na proporção de 10 bacilos por célula e reincubadas por 4 horas em RPMI para infecção. Em seguida, as células foram lavadas para retirar os bacilos não internalizados e incubadas por 20 ou 44 horas adicionais em meio para infecção na presença ou não de IFN- γ . O sobrenadante dessas culturas foi colhido para a determinação da produção de óxido nítrico (NO). As lamínulas foram retiradas, fixadas com glutaraldeído a 2% por 20 minutos e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen. A concentração de micobactéria utilizada para infecção foi calculada a partir da densidade óptica da suspensão de bacilos de 0,400, em DO₅₈₀. A suspensão de bacilos foi, então, plaqueada para determinação da concentração real de micobactérias usada para infecção.

5.4 DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS

Após a fixação com glutaraldeído a 2%, as lamínulas foram coradas pelo método de Ziehl-Nielsen e, em seguida, montadas em lâminas e observadas ao microscópio óptico (magnificação x1000). Foram realizados três experimentos e contados um mínimo de 200 macrófagos por lamínula, em triplicata, para a determinação do percentual de células contendo micobactéria.

5.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE INTRACELULAR DE *M. intracellulare* E *M. fortuitum*

Macrófagos peritoneais, após ativação ou não com IFN- γ na concentração de 100 UI/ml, foram distribuídos em triplicata em placas de 24 poços (Costar) e infectados por 24 horas, com 10 bacilos por célula, como descrito no item anterior. Em seguida, essas células foram lisadas com solução de 0,1% de SDS na presença de 20 μ g/ml de inibidor de proteases

(PMSF, TPCK, TLCK, NPGb). O lisado foi então centrifugado por 3 minutos a 12.000 g e as micobactérias livres foram ressuspensas em 1 ml de meio ágar 7H9. As suspensões de micobactérias foram, então, submetidas a diluições sucessivas até 10^{-4} , espalhadas em placas de petri com ágar 7H10 e mantidas por 20 dias em cultura. O número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi, então, contado e a relação micobactéria por célula determinada.

5.6 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

A produção de óxido nítrico foi determinada através do método de Griess (Ding *et al.*, 1988), a partir da quantificação de nitrito presente nos sobrenadantes das culturas. Uma curva padrão foi construída para a quantificação de nitrito, a partir de uma solução de nitrito de sódio a 200 μM em RPMI, seguida de diluições seriadas (1:2), distribuídas em triplicatas, em placas de 96 poços. A revelação foi feita com a adição de solução à base de sulfanilamida 1% e N-1 naftiletilediamina (NEED), na proporção de 1:2. A leitura foi feita em espectrofotômetro, à densidade óptica de 490nm (DO_{490}) e analisada no programa SOFTmax PRO 3.0. Os resultados foram expressos em concentração de nitrito (μM).

5.7 DETERMINAÇÃO DA FUSÃO DE FAGOSSOMA COM LISSOSSOMA ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram distribuídos em placas de petri (Costar) e incubados com partículas de ouro coloidal (15 nm) conjugadas à albumina bovina (BSA) por quatro horas. Após esse período, os macrófagos foram lavados, tratados com 100 UI/ml de IFN- γ . Em seguida, as células foram incubadas em RPMI para infecção por 18 horas a 37 °C e 5% CO_2 , período necessário para o ouro coloidal se acumular apenas em compartimentos

lisossomais. As células foram, então, infectadas por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* (Figura 3). Após 4, 24 e 48 horas, as células foram fixadas em glutaraldeído a 2,5%, pós-fixadas em tetróxido de ósmio e, finalmente, em acetato de uranila. As amostras foram desidratadas em soluções de acetona e embebidas em resina Epon.

A distribuição de micobactérias por vacúolos foi quantificada pela contagem de 150 a 200 vacúolos por grupo. A fusão de fagossomas com lisossomas foi considerada quando pelo menos uma partícula de ouro coloidal era visualizada no vacúolo micobacteriano.

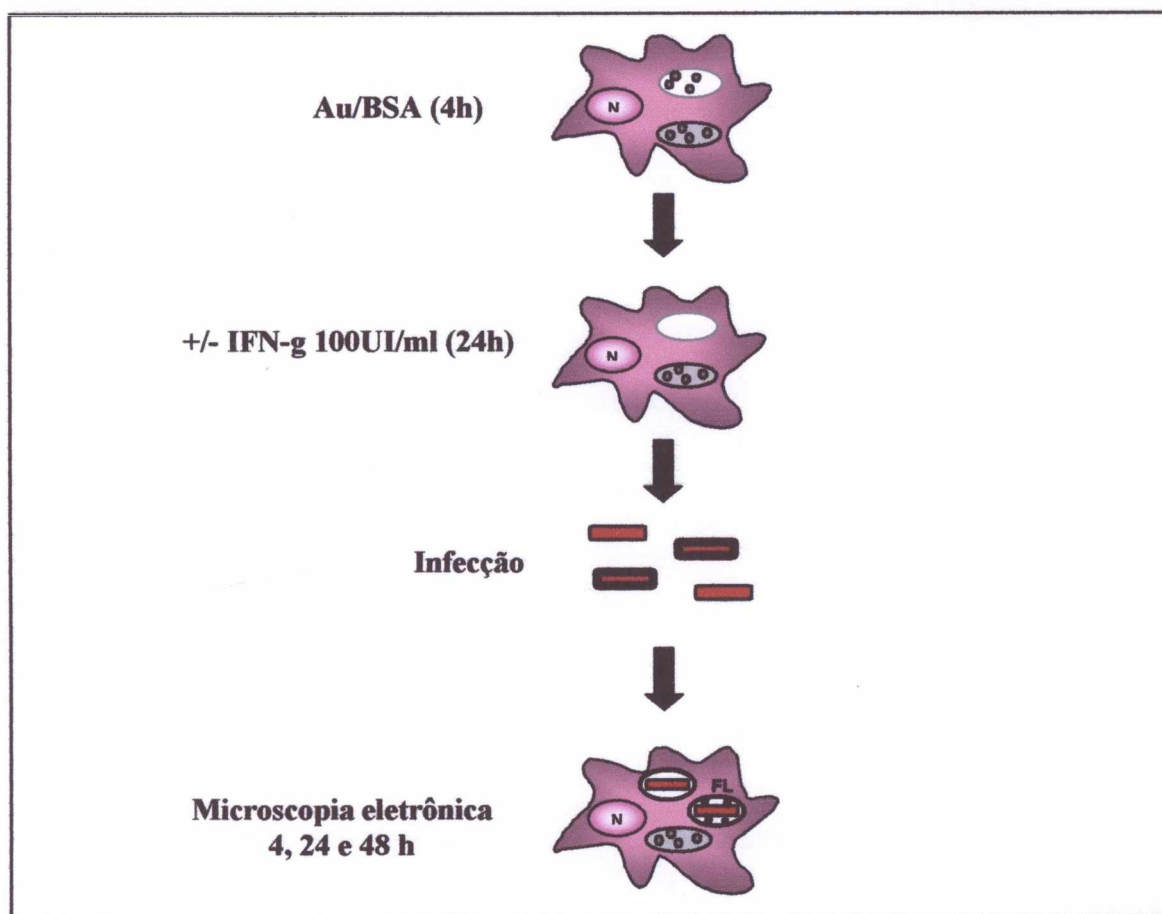


Figura 3 – Desenho experimental do experimento de microscopia eletrônica. As células foram obtidas e plaqueadas como descrito anteriormente. Após a lavagem para retirada das células não aderidas, os macrófagos foram incubados com partículas de ouro coloidal conjugadas a albumina bovina por 4 horas, período necessário para acúmulo do ouro em compartimentos lisossomais. Em seguida as células foram tratadas ou não por IFN- γ e incubadas por 24 horas. Após a incubação, as células foram infectadas por *M. fortuitum* ou *M. intracellulare* e 4, 24 e 48 horas após a infecção foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada avaliação foram realizados três experimentos em triplicata e a comparação entre os grupos de células infectadas por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* foi realizada utilizando-se o teste *t* de Student (programa GraphPad Prism, versão 4.00 - GraphPad Software Incorporated). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE CÉLULAS INFECTADAS POR *M. intracellulare* E *M. fortuitum*

A capacidade de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* de infectar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi avaliada pela determinação do percentual de células infectadas, com utilização do microscópio óptico.

M. fortuitum (n=3) apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c que *M. intracellulare* (n=3), nos tempos de 4, 24 e 48 horas após a infecção (Figura 4). As diferenças observadas entre *M. fortuitum* e *M. intracellulare* quanto ao percentual de células infectadas são estatisticamente significantes para os tempos de 4 horas, em dois dos três experimentos, e para os tempos de 24 e 48 horas, nos três experimentos realizados (Figura 1, anexo I).

6.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E SOBREVIVÊNCIA INTRACELULAR DE *M. intracellulare* E *M. fortuitum*

A capacidade de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* de sobreviver no interior de macrófagos peritoneais de camundongos susceptíveis BALB/c foi determinada pela avaliação da carga bacilar.

As células foram infectadas e, no tempo de 4 horas, foram lavadas para retirada dos bacilos não internalizados e para determinação do número de bacilos internalizados. Observamos que, no tempo de 4 horas, o número de bacilos internalizados de *M. fortuitum* foi estatisticamente maior que o número de bacilos de *M. intracellulare* (Figura 2, anexo I).

Entretanto, a análise das médias dos experimentos não mostrou diferença estatística (Figura 5, $n=3$, $p>0,05$).

Após a lavagem, foi avaliada a capacidade de sobrevivência e multiplicação dos bacilos. Nos tempos de 24 e 48 horas, foi observada uma maior viabilidade de *M. fortuitum* comparada a *M. intracellulare* (Figura 5, $n=3$). Apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa ($p>0,05$), na análise individual de cada experimento em 48 horas após a infecção, a viabilidade de *M. fortuitum* é maior que a de *M. intracellulare* (Figura 2, anexo I). Avaliamos, então, se havia modificação do número de bacilos viáveis ao longo do tempo e observamos que nem o número de bacilos de *M. intracellulare* ($r^2=0,9938$, $p=0,0501$), nem o de *M. fortuitum* ($r^2=0,0024$, $p=0,9687$) alterou em relação ao tempo de infecção.

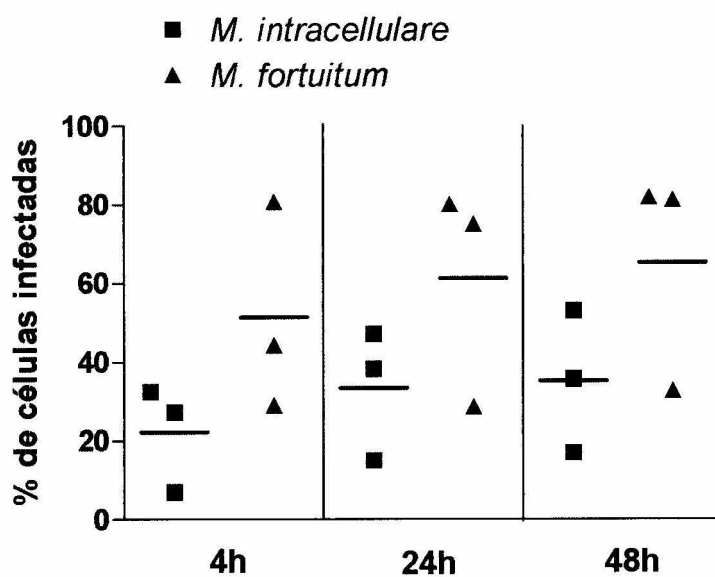


Figura 4 - O percentual de macrófagos infectados por *M. fortuitum* é maior do que o de macrófagos infectados por *M. intracellulare*. Macrófagos peritoneais (5×10^5 /ml) foram infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* (10 bacilos por célula). Após 4 horas, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 20 e 44 horas de infecção. As células foram fixadas em glutaraldeído e coradas pelo método de Ziehl-Nielsen para contagem do número de células contendo micobactérias. Os pontos representam a média de cada experimento (n=3) e, devido a grande dispersão entre os experimentos, não foi possível demonstrar diferenças estatisticamente significantes na média dos experimentos ($p > 0,05$).

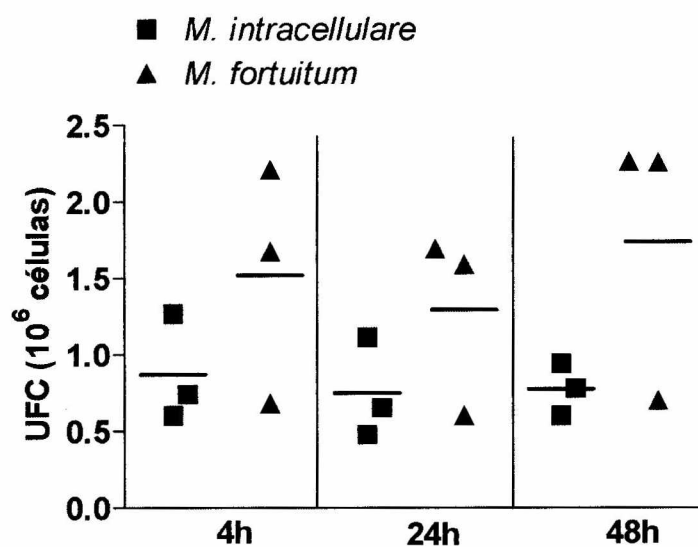


Figura 5 - *M. fortuitum* apresenta maior viabilidade que *M. intracellulare*. Macrófagos peritoneais não tratados foram infectados como descrito anteriormente. Após 4 horas, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 20 e 44 horas de infecção. As células foram então lisadas e, após diluições seriadas até 10^{-4} foram plaqueadas. O número de bacilos por célula foi avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os pontos representam a média de cada experimento ($n=3$) e, devido a grande dispersão entre os experimentos, não foi possível demonstrar diferenças estatisticamente significantes na média dos experimentos ($p>0,05$).

6.3 ESTIMULAÇÃO POR IFN- γ E PAPEL DO ÓXIDO NÍTRICO PRODUZIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS POR *M. intracellulare* E *M. fortuitum*

A capacidade de *M. intracellulare* e *M. fortuitum* de induzir a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi avaliada pela técnica de Griess, a partir da dosagem de nitrito (Ding *et al.*, 1988). Após 4, 24 e 48 horas de infecção com essas micobactérias, os níveis de óxido nítrico foram medidos nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais previamente tratados ou não com 100 UI/ml de IFN- γ .

Os resultados mostram que macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* respondem de maneira diferente quanto à produção de óxido nítrico. Macrófagos peritoneais apenas infectados por uma ou outra espécie de micobactéria e não tratados por IFN- γ produzem baixos níveis de óxido nítrico em todos os tempos estudados, tendo variado de 0 a 4,65 μ M nas células infectadas com *M. intracellulare* (n=3) e 0,03 a 5,72 μ M nas infectadas com *M. fortuitum* (n=3). Na figura 6 observa-se que apesar de IFN- γ induzir produção de óxido nítrico em células infectadas pelas micobactérias ambientais, nas células infectadas por *M. intracellulare* (n=3) essa produção é superior quando comparada com àquela das células infectadas por *M. fortuitum* (n=3). Apesar da análise das médias dos experimentos não apresentar diferença estatística (n=3, p>0,05), a análise de cada experimento mostrou que nos tempos de 24 e 48 horas, a infecção por *M. intracellulare* induziu uma produção de óxido nítrico estatisticamente maior do que a infecção por *M. fortuitum* (Figura 3, anexo I).

Foi avaliado então o papel do IFN- γ na infecção por uma ou outra micobactéria em macrófagos previamente tratados com 100 UI/ml de IFN- γ . A figura 7 mostra que o tratamento com IFN- γ não alterou o percentual de células infectadas, em nenhum dos tempos

analisados, para ambas as espécies de micobactérias. Esse dado indica que o tratamento por IFN- γ não reduz a infecção de macrófagos pelas duas espécies de micobactérias ambientais.

Para avaliar a capacidade de IFN- γ em interferir na viabilidade dos bacilos, as células foram tratadas com IFN- γ e infectadas como descrito anteriormente. Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram lisadas e, após diluições seriadas até 10^{-4} foram plaqueadas em 7H10. Após dez dias, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e o número de bacilos por célula foi avaliado. A figura 8 mostra que, após o tratamento das células com IFN- γ , também não houve alteração na viabilidade intracelular tanto de *M. intracellulare* (*t* de Student; $p > 0,05$), como de *M. fortuitum* (*t* de Student; $p > 0,05$), em todos os tempos analisados.

Ainda com o objetivo de avaliar o efeito do tratamento por IFN- γ na infecção por essas micobactérias, foi determinada a correlação entre o óxido nítrico produzido após o tratamento e a carga bacilar. Nossa expectativa é que haveria uma relação inversa entre o óxido nítrico produzido e a carga bacilar. Em relação à infecção por *M. fortuitum*, o óxido nítrico não alterou a infecção, indicando que essa espécie de micobacteria não é sensível a diferentes concentrações dessa molécula produzida *in vitro* ($r = 0,6506$, $p = 0,0577$). Interessantemente, quanto maior o óxido nítrico produzido, maior a carga bacilar de *M. intracellulare* em macrófagos infectados ($r = 0,8306$, $p = 0,0056$) (Figura 9), mostrando que o óxido nítrico tem efeito diverso sobre as duas espécies de micobacterias ambientais.

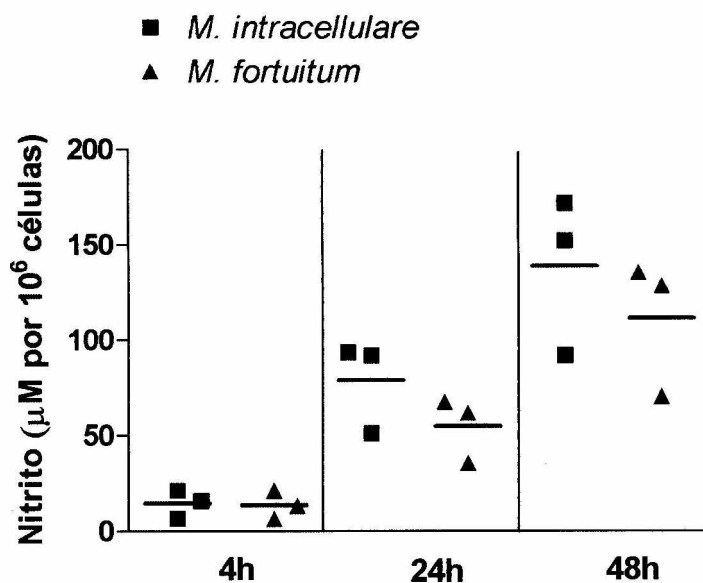


Figura 6 - A produção de óxido nítrico é maior nas células infectadas por *M. intracellulare*. Os sobrenadantes dos macrófagos peritoneais tratados com IFN- γ e infectados por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* foram coletados após 4, 24 e 48 horas de infecção para dosagem dos níveis de nitrito. Os pontos representam a média de cada experimento em triplicata e, devido a grande dispersão entre os experimentos, não foi possível demonstrar diferenças estatisticamente significantes na média dos experimentos (t de Student ; $p > 0,05$).

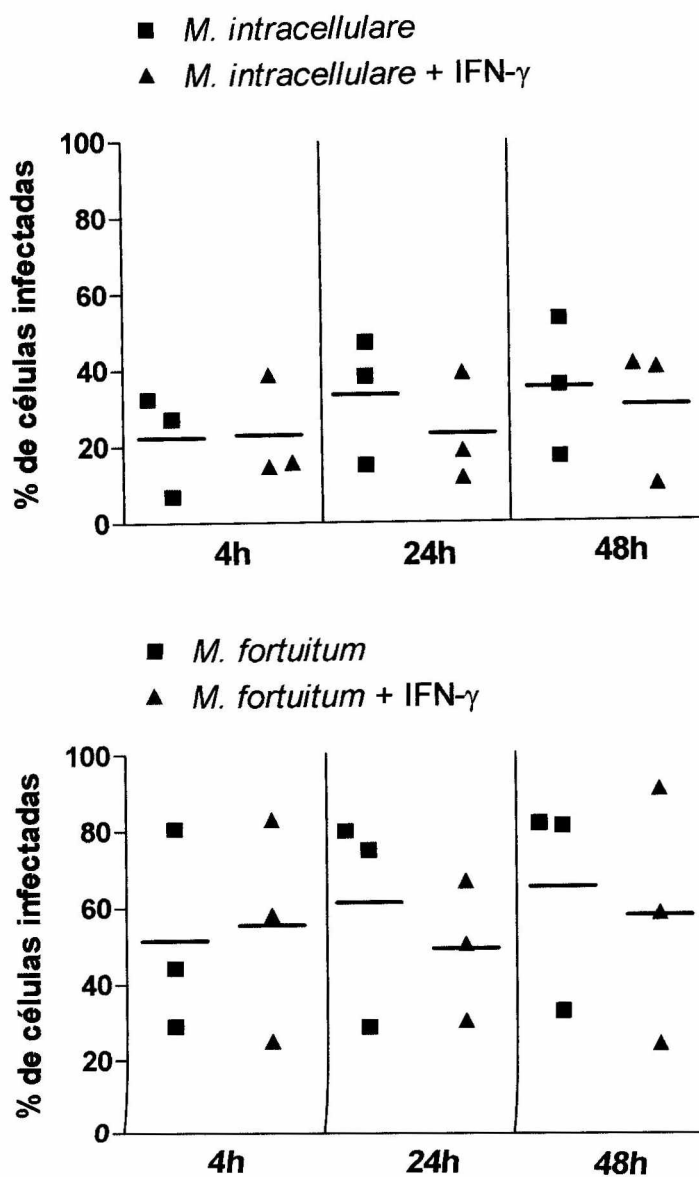


Figura 7 - A adição de IFN- γ nas culturas *in vitro* de macrófagos não altera o percentual de células infectadas por *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$), tratados ou não por IFN- γ , foram infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* (10 bacilos por célula). Após 4 horas, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 20 e 44 horas de infecção. Nos tempos de 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído e coradas pelo método de Zielh-Nielsen para contagem do número de células contendo micobactérias. Os pontos representam a média de cada experimento em triplicata (*t* de Student, $p > 0,05$).

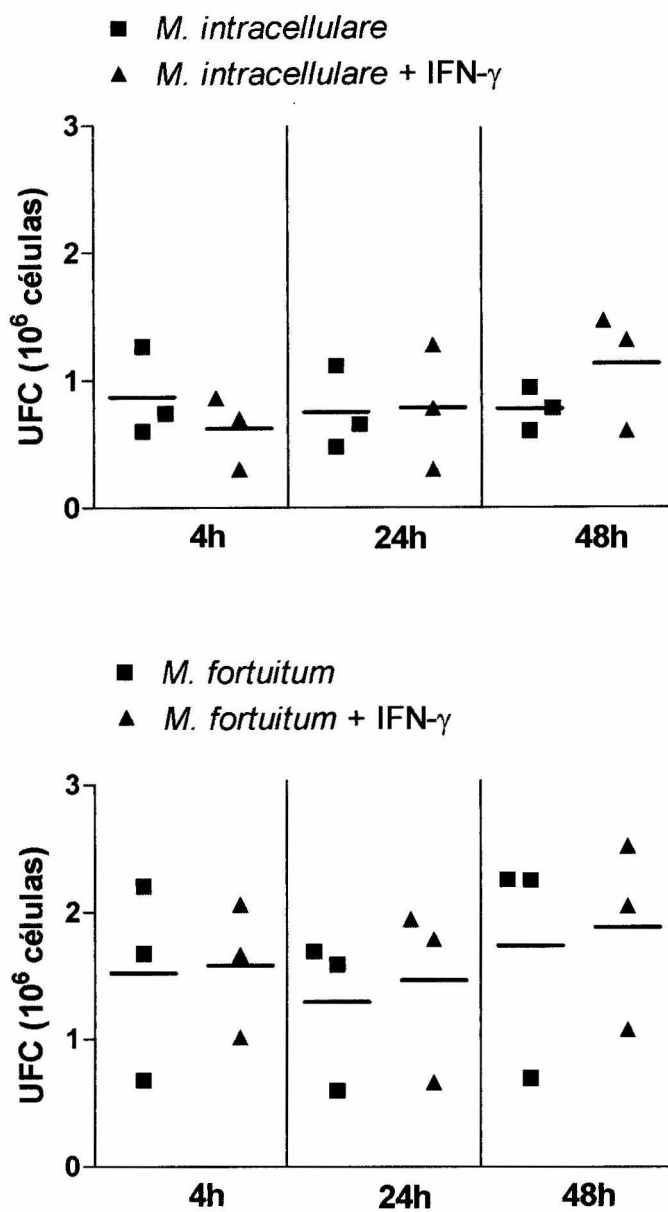


Figura 8 – A adição de IFN- γ nas culturas *in vitro* de macrófagos não altera a viabilidade intracelular de *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Macrófagos peritoneais, tratados ou não com IFN- γ , foram infectados como descrito anteriormente. Após 4 horas, as células foram lavadas e reincubadas por adicionais 20 e 44 horas de infecção. Nos tempos de 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram lisadas, diluídas em série até 10^{-4} e plaqueadas. O número de bacilos por célula foi avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Os pontos representam a média de cada experimento em triplicata (*t* de Student; $p > 0,05$).

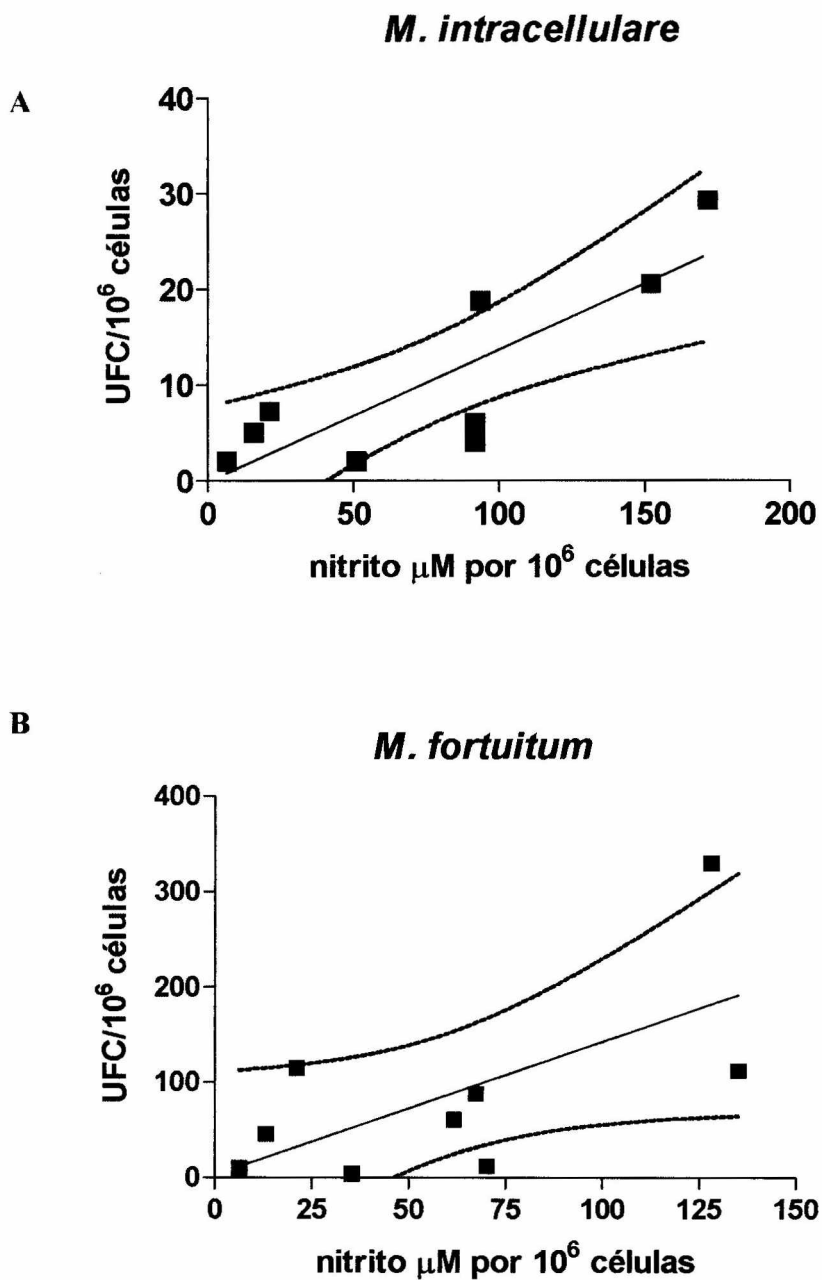


Figura 9 – Correlação entre a produção de nitrito e a carga bacilar em macrófagos infectados por *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Os quadrados representam médias de 3 experimentos independentes. A análise através da correlação indica uma relação direta entre o óxido nítrico produzido e a carga bacilar na infecção por *M. intracellulare* ($r=0,83$, $p=0,006$), mas não por *M. fortuitum* ($r=0,65$, $p=0,06$).

6.4 CARACTERIZAÇÃO DO COMPARTIMENTO INDUZIDO POR *M. intracellulare* E *M. fortuitum*

A caracterização do compartimento induzido por *M. intracellulare* e *M. fortuitum* em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi realizada por microscopia eletrônica, nos tempos de 4, 24 e 48 horas após a infecção. A figura 10 mostra que tanto os fagossomas induzidos por *M. fortuitum* quanto por *M. intracellulare* apresentam baixas taxas de fusão com lisossomas da célula hospedeira. Observamos ainda que, apesar das baixas taxas de fusão, os fagossomas induzidos por *M. fortuitum* fusionam mais com lisossomas de macrófagos peritoneais que aqueles induzidos por *M. intracellulare*. A figura 12 representa um fagossoma contendo de *M. intracellulare* (A) e um raro fagolisossoma contendo *M. fortuitum* (B).

Para avaliar o papel do IFN- γ na fusão dos fagossomas induzidos por uma ou outra micobactéria, os macrófagos foram previamente tratados com 100 UI/ml de IFN- γ . Como observado anteriormente em nosso laboratório, em células J774 o tratamento com IFN- γ não alterou o percentual de fusão de fagossomas induzidos por *M. intracellulare*. Interessantemente, em macrófagos peritoneais o IFN- γ aumentou o percentual de fusão dos fagolisossomas contendo *M. fortuitum*, no tempo inicial de infecção (Figura 11).

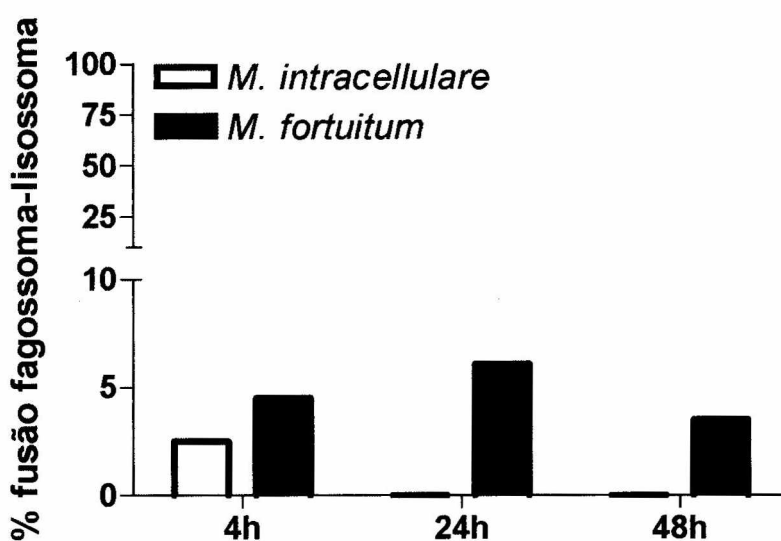


Figura 10 – Fagossomas induzidos por *M. intracellulare* e *M. fortuitum* induzem baixas taxas de fusão com lisossomas de macrófagos peritoneais. Macrófagos peritoneais incubados com ouro coloidal por 4 horas foram infectados como descrito anteriormente. Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica. O percentual de fusão foi determinado pela contagem de células contendo micobactéria e ouro coloidal. O resultado corresponde a um experimento.

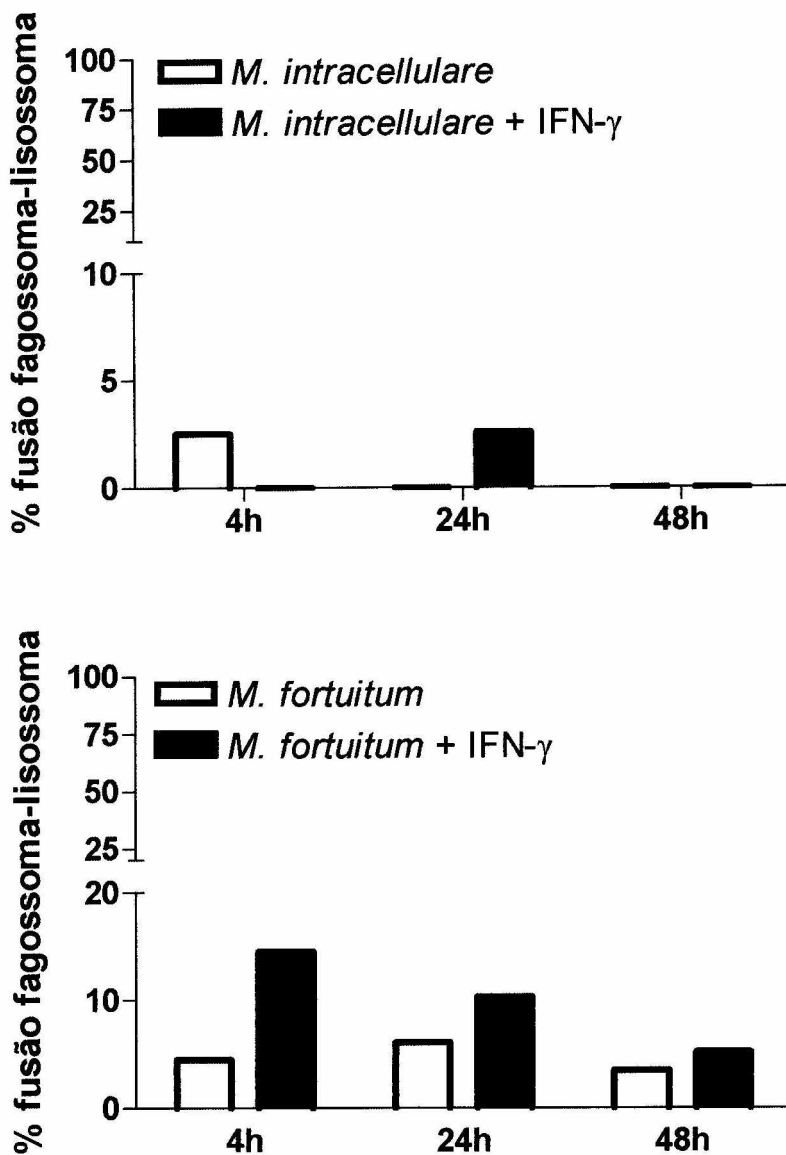


Figura 11 – A adição de IFN- γ nas culturas *in vitro* de macrófagos altera o percentual de fusão de fagossomas induzidos apenas por *M. fortuitum*. Macrófagos peritoneais, tratados ou não com IFN- γ , foram infectados como descrito anteriormente. Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica. O percentual de fusão foi determinado pela contagem de células contendo micobactéria e ouro coloidal. O resultado corresponde a um experimento.

7. DISCUSSÃO

A presente pesquisa teve como objetivo avaliar a resposta de macrófagos peritoneais

de camundongos

diferenças entre as

no interior de macrófagos

de

macrófagos

em

os

os

as

as

em

avaliando

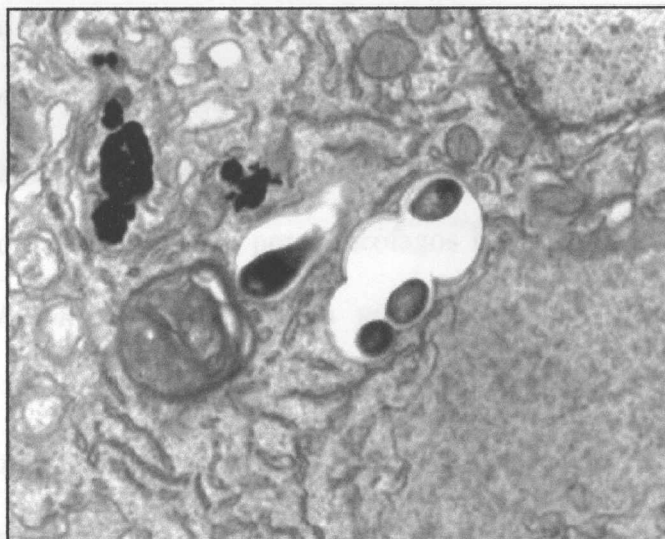
de

des

os

os

A



B

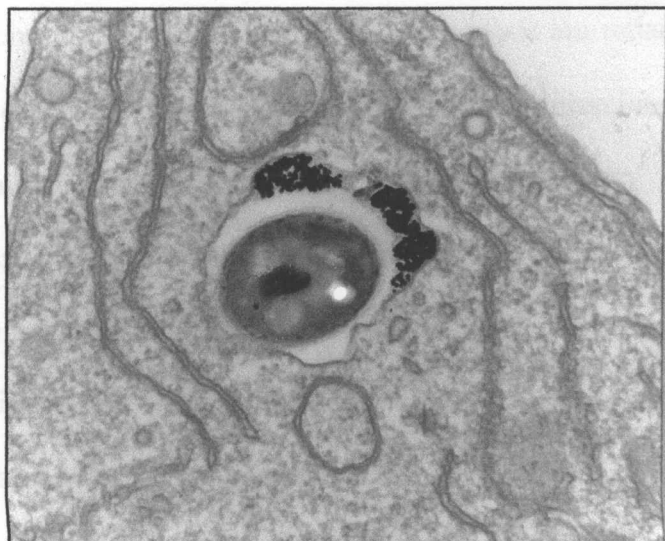


Figura 12 – Micrografias representando fagossomas induzidos por *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Macrófagos peritoneais incubados com ouro coloidal por 4 horas foram infectados como descrito anteriormente. Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica. As micrografias representam um fagossoma típico de *M. intracellulare* (A) e um raro fagolisossoma contendo *M. fortuitum* (B).

frutificação e a reprodução

utilizam-se para a produção

ocorridos no

7. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*. Avaliamos diferenças entre *M. intracellulare* e *M. fortuitum* quanto à capacidade de infectar e sobreviver no interior de macrófagos peritoneais. Avaliamos também a capacidade dessas micobactérias de induzir a produção de óxido nítrico por macrófagos infectados. No presente estudo, foi observado que *M. fortuitum* apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais, além de induzir uma menor produção de óxido nítrico pelos mesmos, em comparação com *M. intracellulare*.

Embora as micobactérias sejam capazes de infectar outros tipos celulares, os macrófagos representam os alvos primários desses patógenos em todas as fases da doença. Por outro lado, a capacidade dessa célula em inibir o crescimento ou eliminar as micobactérias determina o curso da infecção (Aston *et al.*, 1998). Em estudo realizado anteriormente em nosso laboratório, utilizando células de linhagem J774, avaliando apenas no tempo de 24 horas de infecção, a capacidade dessas micobactérias de infectar células J774. A capacidade de sobrevivência dessas micobactérias no interior dos macrófagos não foi possível de ser avaliada, pois as células J774 são imaturas e se soltam facilmente das placas ao serem lavadas. Nesse estudo, não foram observadas diferenças nem no percentual de células infectadas, nem na carga bacilar, quando comparados *M. intracellulare* e *M. fortuitum* (Da Silva *et al.*, 2002). No presente trabalho as culturas foram lavadas para retirada de bacilos não internalizados e reincubação por adicionais 20 e 44 horas. Essa abordagem teve como finalidade avaliar a sobrevivência e multiplicação dos bacilos. Além disso, esse modelo, utilizando células inflamatórias, teve como objetivo traçar um paralelo com os eventos ocorridos *in vivo*.

Os resultados aqui apresentados mostram que *M. fortuitum* apresenta maior capacidade de infectar e maior viabilidade no interior de macrófagos de cultura primária que *M. intracellulare*, pois no tempo de 4 horas, foram detectados maior percentual de células infectadas e carga bacilar para essa espécie de micobactéria (Figuras 4 e 5). A maior viabilidade observada para *M. fortuitum* está relacionada à maior capacidade de infecção e não à maior sobrevivência e multiplicação intracelular, pois não houve aumento da carga bacilar ao longo do tempo de infecção (dados não mostrados). As diferenças observadas nesse trabalho ao se comparar *M. intracellulare* e *M. fortuitum*, quanto à capacidade de infecção são explicadas pelo fato dessas micobactérias serem de espécies distintas. *M. intracellulare* é uma micobactéria de crescimento lento, podendo ser pigmentada ou não, já *M. fortuitum* tem crescimento rápido e não produz pigmento (Figura 1B). Além das diferenças no tempo de crescimento e no aspecto morfológico das colônias, as manifestações clínicas da infecção causada por *M. intracellulare* e *M. fortuitum* apresentam características distintas. Geralmente *M. intracellulare* causa doenças pulmonares crônicas e linfadenites em indivíduos com algum grau de imunodeficiência, em especial com AIDS (Katoch *et al.*, 2001; Wallace *et al.*, 1990), enquanto *M. fortuitum* está associado à infecção cutânea localizada e raramente causa doença pulmonar crônica (Al Shaalan *et al.*, 1997; Awe *et al.*, 1973; Wallace *et al.*, 1985; Wallace *et al.*, 1983). Essas diferenças observadas na capacidade de infecção podem estar relacionadas às diferenças na composição lipídica da parede dessas micobactérias, permitindo assim que elas interajam de forma distinta com a célula hospedeira. Está bem descrito na literatura que a presença de glicolipídios, como lipoarabinomanana, e de glicoproteínas na superfície das micobactérias está associada à capacidade desses microorganismos de invadir e sobreviver no interior de células hospedeiras (Barry, 2001). Sabe-se ainda que diferentes espécies de micobactérias apresentam glicolipídeos com estruturas distintas na sua superfície celular, podendo assim se ligar a diferentes receptores na superfície da célula hospedeira e induzir

diferentes respostas imunes (Nigou *et al.*, 2003). Adicionalmente, lipoarabinomananas isoladas de cepas avirulentas de *M. tuberculosis* induzem uma maior produção de TNF- α , quando comparadas com bacilos virulentos (Chatterjee *et al.*, 1992). Apesar dos estudos realizados sobre o papel de diferentes glicolípideos presentes na superfície celular de *M. tuberculosis* e *M. bovis*, pouco se conhece sobre a natureza e a participação dessas estruturas na interação de *M. fortuitum* e *M. intracellulare* com macrófagos.

O pré-tratamento com IFN- γ induziu um aumento da produção de óxido nítrico pelos macrófagos primários infectados tanto por *M. intracellulare* quanto por *M. fortuitum*. No entanto, essa produção é maior em macrófagos infectados por *M. intracellulare*, em comparação com os infectados por *M. fortuitum*. Esses dados mostram que, como em células de linhagem, em macrófagos peritoneais, *M. fortuitum* e *M. intracellulare* induzem respostas distintas em relação à produção de óxido nítrico (Da Silva *et al.*, 2002). Apesar da produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais inflamatórios infectados e tratados por IFN- γ ser superior aos valores obtidos por células de linhagem, não foi observada alteração no percentual de células infectadas ou na sobrevivência de *M. intracellulare* e *M. fortuitum*. Esses achados sugerem que as duas espécies de micobactérias sejam resistentes ao óxido nítrico produzido por macrófagos peritoneais quando estimulados por IFN- γ .

Apesar de estar bem descrita na literatura a importância de reagentes intermediários de nitrogênio no controle de infecções micobacterianas, pouco se conhece sobre os mecanismos envolvidos na resistência a esses reagentes. Sabe-se que *noxRI*, gene originalmente descrito de isolados clínicos de *M. tuberculosis* resistentes ao óxido nítrico *in vitro*, é capaz de conferir proteção ao *M. bovis*, apesar de não conferir proteção do hospedeiro contra *M. tuberculosis* (Stewart *et al.*, 2000). Em se tratando de *M. intracellulare* e *M. fortuitum*, não existem estudos na literatura relacionados com a resistência dessas espécies de micobactéria a reagentes intermediários de nitrogênio ou os mecanismos envolvidos nesse processo.

Surpreendentemente, quanto maior o óxido nítrico produzido, maior a carga bacilar de *M. intracellulare*, o que não foi observado para *M. fortuitum*. Embora não se conheça os mecanismos envolvidos nessa relação entre o aumento da produção de óxido nítrico e o aumento da viabilidade intracelular, existem relatos na literatura que mostram altas taxas de óxido nítrico e IFN- γ associadas ao perfil de susceptibilidade de camundongos a outro patógeno intracelular, o protozoário *Leishmania amazonensis*. Esse estudo evidencia que uma resposta predominantemente Th1 com alta produção de IFN- γ e óxido nítrico pode estar associada a respostas não protetoras a um organismo intracelular (Ji *et al.*, 2005).

A capacidade da micobactéria de restringir fusão de fagossomas com lisossomas da célula hospedeira já foi bem descrita na literatura (Barker *et al.*, 1997; Clemens *et al.*, 1995). No presente estudo, foi observado que tanto *M. intracellulare* como *M. fortuitum* apresentam baixas taxas de fusão de fagossomas com lisossomas (Figura 10), em comparação com nosso estudo anterior. Apesar disso, observamos que os fagossomas induzidos por *M. fortuitum* fusionam mais com lisossomas da célula hospedeira em relação àqueles induzidos por *M. intracellulare* (Figura 10). Anteriormente em nosso laboratório, foi demonstrado em estudo *in vitro* com células J774 que os fagossomas induzidos por *M. intracellulare* fusionam 69% mais com lisossomas do que aqueles induzidos por *M. fortuitum*, nas primeiras 24 horas de infecção (Da Silva *et al.*, 2002). É possível que essas diferenças observadas entre células J774 e macrófagos peritoneais, em relação à fusão dos fagossomas induzidos por *M. fortuitum* e *M. intracellulare* com lisossomas da célula hospedeira, estejam relacionadas com a imaturidade das células de linhagem J774. A constituição diferenciada da camada externa da parede bacteriana das duas variantes pode estar determinando destinos intracelulares diferentes, através da interação de seus ligantes com receptores distintos da célula hospedeira (Malik *et al.*, 2000). Os nossos resultados mostram ainda que o pré-tratamento com IFN- γ não foi capaz de alterar a capacidade de fusão dos fagossomas induzidos por *M. intracellulare*, entretanto

levou a um aumento da fusão de fagossomas induzidos por *M. fortuitum* com lisossomas da célula hospedeira. É possível que uma maior ativação do macrófago pela adição de um segundo sinal, como o TNF- α , leve a uma maior fusão de fagossomas induzidos por essas espécies de micobactéria, evidenciando melhor as diferenças observadas e, conseqüentemente, levando à redução da viabilidade de *M. fortuitum*, em relação a *M. intracellulare*. De fato, estudos em andamento em nosso laboratório mostram que camundongos BALB/c controlam rapidamente a infecção por *M. fortuitum*, enquanto que a infecção por *M. intracellulare* é mais expressiva, na fase inicial da infecção. Nas fases mais tardias, os animais infectados por *M. intracellulare* permanecem com a infecção persistente (dados não mostrados). É possível que a maior fusão de fagossomas induzidos por *M. fortuitum* em relação à *M. intracellulare* e seu aumento após o tratamento por IFN- γ estejam relacionados com o comportamento observado nos estudos *in vivo* (Bezerra de Menezes, 2003).

Como perspectivas, no presente trabalho avaliaremos o papel do óxido nítrico na infecção por *M. fortuitum* e *M. intracellulare* pelo bloqueio dessa molécula no nosso sistema e adição de um doador químico de óxido nítrico, como SNAP (n-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine). Realizaremos também uma melhor caracterização do compartimento induzido por *M. fortuitum* e *M. intracellulare*, avaliando o papel de Rab5 e Rab7, proteínas envolvidas no processo de fusão de fagossomas com lisossomas da célula hospedeira, pela super-expressão dessas proteínas em células infectadas por *M. fortuitum* e *M. intracellulare*. Avaliaremos ainda o perfil de citocinas produzidas pelos macrófagos infectados, como IL-10 e TNF- α . Sabe-se que IL-10 é uma citocina envolvida na modulação da resposta imune e que esta desempenha um papel importante nas infecções micobacterianas (Bermudez *et al.*, 1993; Bogdan *et al.*, 1991). Além disso, está bem descrito na literatura que TNF- α induz resposta micobactericida em macrófagos infectados, uma vez que na sua ausência observa-se a

proliferação de bacilos micobacterianos (Denis, 1991; Kindler *et al.*, 1991). Diferenças nos níveis dessas citocinas, produzidas por macrófagos primários infectados por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum*, poderiam explicar as diferenças observadas na capacidade dessas espécies de micobactéria de infectar e sobreviver no interior de macrófagos peritoneais inflamatórios.

A utilização de macrófagos de cultura primária permitiu estender os resultados, obtidos inicialmente com células de linhagem J774, sobre a interação entre macrófagos e as micobactérias ambientais, *M. fortuitum* e *M. intracellulare*. Foi possível avaliar a sobrevivência dessas duas espécies de micobactérias em tempos mais tardios de infecção, o que permitiu traçar um paralelo com os eventos ocorridos *in vivo*. Em resumo, os dados obtidos neste trabalho mostram que, *in vitro*, *M. fortuitum* e *M. intracellulare* interagem de forma distinta com macrófagos peritoneais, levando assim a diferentes respostas do macrófago. Além disso, foi demonstrado que *M. intracellulare* e *M. fortuitum* são resistente ao óxido nítrico produzido por macrófagos após a ativação por IFN- γ .

8. CONCLUSÃO

1. *M. intracellulare* e *M. fortuitum* interagem de forma distinta com o macrófago, levando a diferentes respostas e destinos intracelulares, uma vez que apesar de apresentar uma maior capacidade de infecção em relação à *M. fortuitum*, os fagossomas induzidos por *M. intracellulare* fusionam mais com lisossomas da célula hospedeira.

2. *M. intracellulare* e *M. fortuitum* são resistentes ao óxido nítrico produzido por macrófagos após ativação por IFN- γ .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, B.; THIEBLEMONT, N.; QUESNIAUX, V. J.; BROWN, N.; MPAGI, J.; MIYAKE, K.; BIHL, F.; RYFFEL, B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Immunol**, **169**: 3155-3162, 2002.
- AKPORIAYE, E. T.; ROWATT, J. D.; ARAGON, A. A.; BACA, O. G. Lysosomal response of a murine macrophage-like cell line persistently infected with *Coxiella burnetii*. **Infect Immun**, **40**: 1155-1162, 1983.
- AL SHAALAN, M.; LAW, B. J.; ISRAELS, S. J.; PIANOSI, P.; LACSON, A. G.; HIGGINS, R. *Mycobacterium fortuitum* interstitial pneumonia with vasculitis in a child with Wilms' tumor. **Pediatr Infect Dis J**, **16**: 996-1000, 1997.
- ALEXANDER, J.; VICKERMAN, K. Fusion of host cell secondary lysosomes with the parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. **J Protozool**, **22**: 502-508, 1975.
- APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; PEDROSA, J.; SILVA, R. A.; ORME, I. M.; MINOPRIO, P. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. **Infect Immun**, **62**: 3962-3971, 1994.
- APPELBERG, R.; ORME, I. M. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. **Immunology**, **80**: 352-359, 1993.
- ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. **J Exp Med**, **142**: 1-16, 1975.
- ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **J Exp Med**, **134**: 713-740, 1971.
- ASTON, C.; ROM, W. N.; TALBOT, A. T.; REIBMAN, J. Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, **157**: 1943-1950, 1998.
- AWE, R. J.; GANGADHARAM, P. R.; JENKINS, D. E. Clinical significance of *Mycobacterium fortuitum* infections in pulmonary disease. **Am Rev Respir Dis**, **108**: 1230-1234, 1973.
- BARKER, L. P.; GEORGE, K. M.; FALKOW, S.; SMALL, P. L. Differential trafficking of live and dead *Mycobacterium marinum* organisms in macrophages. **Infect Immun**, **65**: 1497-1504, 1997.

BARNES, P. F.; ABRAMS, J. S.; LU, S.; SIELING, P. A.; REA, T. H.; MODLIN, R. L. Patterns of cytokine production by Mycobacterium-reactive human T-cell clones. **Infect Immun**, **61**: 197-203, 1993.

BARRY, C. E., 3RD. Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. **Trends Microbiol**, **9**: 237-241, 2001.

BEAN, A. G.; ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; FRANCE, M. P.; KORNER, H.; SEDGWICK, J. D.; BRITTON, W. J. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. **J Immunol**, **162**: 3504-3511, 1999.

BENSON, C.; KERNS, E.; SHA, B.; GLICK, E.; HARRIS, A.; KESSLER, H. Relationship of respiratory and GI tract colonization with *Mycobacterium avium* complex (MAC) to disseminated MAC disease in HIV infected (+) patients. **Program Abstr. 6th Int. Conf. AIDS**, 1990. p.

BERMUDEZ, L. E.; CHAMPSI, J. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. **Infect Immun**, **61**: 3093-3097, 1993.

BERMUDEZ, L. E.; PETROFSKY, M.; KOLONOSKI, P.; YOUNG, L. S. An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. **J Infect Dis**, **165**: 75-79, 1992.

BERMUDEZ, L. E.; STEVENS, P.; KOLONOSKI, P.; WU, M.; YOUNG, L. S. Treatment of experimental disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant IL-2 and tumor necrosis factor. **J Immunol**, **143**: 2996-3000, 1989.

BEZERRA DE MENEZES, J. P. Estudo da susceptibilidade de diferentes linhagens de camundongos à infecção por *Mycobacterium fortuitum*. Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2003.

BLACK, G. F.; WEIR, R. E.; FLOYD, S.; BLISS, L.; WARNDORFF, D. K.; CRAMPIN, A. C.; NGWIRA, B.; SICHALI, L.; NAZARETH, B.; BLACKWELL, J. M.; BRANSON, K.; CHAGULUKA, S. D.; DONOVAN, L.; JARMAN, E.; KING, E.; FINE, P. E.; DOCKRELL, H. M. BCG-induced increase in interferon-gamma response to mycobacterial antigens and efficacy of BCG vaccination in Malawi and the UK: two randomised controlled studies. **Lancet**, **359**: 1393-1401, 2002.

BLANCHARD, D. K.; MICHELINI-NORRIS, M. B.; PEARSON, C. A.; FREITAG, C. S.; DJEU, J. Y. *Mycobacterium avium-intracellulare* induces interleukin-6 from human monocytes and large granular lymphocytes. **Blood**, **77**: 2218-2224, 1991.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J Exp Med**, **174**: 1549-1555, 1991.

BOKOCH, G. M. Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. **Trends Cell Biol**, **5**: 109-113, 1995.

BONECINI-ALMEIDA, M. G.; CHITALE, S.; BOUTSIKAKIS, I.; GENG, J.; DOO, H.; HE, S.; HO, J. L. Induction of in vitro human macrophage anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN-gamma and primed lymphocytes. **J Immunol**, **160**: 4490-4499, 1998.

BRANDT, L.; FEINO CUNHA, J.; WEINREICH OLSEN, A.; CHILIMA, B.; HIRSCH, P.; APPELBERG, R.; ANDERSEN, P. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to *tuberculosis*. **Infect Immun**, **70**: 672-678, 2002.

BRENNAN, P. J. Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins. **Rev Infect Dis**, **11 Suppl 2**: S420-430, 1989.

BROWN, E. J. Complement receptors and phagocytosis. **Curr Opin Immunol**, **3**: 76-82, 1991.

BUCCI, C.; PARTON, R. G.; MATHER, I. H.; STUNNENBERG, H.; SIMONS, K.; HOFLACK, B.; ZERIAL, M. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. **Cell**, **70**: 715-728, 1992.

BUTT, A. A. Cervical adenitis due to *Mycobacterium fortuitum* in patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Med Sci**, **315**: 50-55, 1998.

BUTT, A. A.; JANNEY, A. Arthritis due to *Mycobacterium fortuitum*. **Scand J Infect Dis**, **30**: 525-527, 1998.

CARON, E.; HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**, **282**: 1717-1721, 1998.

CASCIOLA-ROSEN, L. A.; HUBBARD, A. L. Lumenal labeling of rat hepatocyte early endosomes. Presence of multiple membrane receptors and the Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase. **J Biol Chem**, **267**: 8213-8221, 1992.

CHAN, J.; L., F. J. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection. In: F. Fang (Ed.). Nitric Oxide and Infection. New York: Plenum, 1999. Nitric oxide in *Mycobacterium tuberculosis* infection, p.281-310

CHAN, J.; TANAKA, K.; CARROLL, D.; FLYNN, J.; BLOOM, B. R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, **63**: 736-740, 1995.

CHATTERJEE, D.; ROBERTS, A. D.; LOWELL, K.; BRENNAN, P. J.; ORME, I. M. Structural basis of capacity of lipoarabinomannan to induce secretion of tumor necrosis factor. **Infect Immun**, **60**: 1249-1253, 1992.

CHESTER, A. C.; WINN, W. C., JR. Unusual and newly recognized patterns of nontuberculous mycobacterial infection with emphasis on the immunocompromised host. **Pathol Annu**, **21 Pt 1**: 251-270, 1986.

- CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. **J Exp Med**, **181**: 257-270, 1995.
- CLEMENS, D. L.; HORWITZ, M. A. The *Mycobacterium tuberculosis* phagosome interacts with early endosomes and is accessible to exogenously administered transferrin. **J Exp Med**, **184**: 1349-1355, 1996.
- COLOMBO, M. I.; MAYORGA, L. S.; CASEY, P. J.; STAHL, P. D. Evidence of a role for heterotrimeric GTP-binding proteins in endosome fusion. **Science**, **255**: 1695-1697, 1992.
- COOPER, A. M.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; GRIFFIN, J. P.; RUSSELL, D. G.; ORME, I. M. Disseminated *tuberculosis* in interferon gamma gene-disrupted mice. **J Exp Med**, **178**: 2243-2247, 1993.
- CORTI, M.; SOTO, I.; VILLAFANE, F.; ESQUIVEL, P.; DI LONARDO, M. [Disseminated infection due to *Mycobacterium fortuitum* in an AIDS patient]. **Medicina (B Aires)**, **59**: 274-276, 1999.
- COSO, O. A.; CHIARIELLO, M.; YU, J. C.; TERAMOTO, H.; CRESPO, P.; XU, N.; MIKI, T.; GUTKIND, J. S. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. **Cell**, **81**: 1137-1146, 1995.
- COX, D.; CHANG, P.; ZHANG, Q.; REDDY, P. G.; BOKOCH, G. M.; GREENBERG, S. Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. **J Exp Med**, **186**: 1487-1494, 1997.
- CRESPO, M. P.; HELI CORRAL, R.; ALZATE, A.; CARRASQUILLA, G.; SANCHEZ, N. [Mycobacterial infections in HIV-infected patients in Cali, Colombia]. **Rev Panam Salud Publica**, **6**: 249-255, 1999.
- CROWLE, A. J.; DAHL, R.; ROSS, E.; MAY, M. H. Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic. **Infect Immun**, **59**: 1823-1831, 1991.
- DA SILVA, T. R.; DE FREITAS, J. R.; SILVA, Q. C.; FIGUEIRA, C. P.; ROXO, E.; LEO, S. C.; DE FREITAS, L. A.; VERAS, P. S. T. Virulent *Mycobacterium fortuitum* restricts NO production by a gamma interferon-activated J774 cell line and phagosome-lysosome fusion. **Infect Immun**, **70**: 5628-5634, 2002.
- DEMANGEL, C.; GARNIER, T.; ROSENKRANDS, I.; COLE, S. T. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. **Infect Immun**, **73**: 2190-2196, 2005.
- DENIS, M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. **J Leukoc Biol**, **49**: 380-387, 1991.

- DENIS, M.; GREGG, E. O. Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. **Immunology**, **71**: 139-141, 1990.
- DESJARDINS, M.; HUBER, L. A.; PARTON, R. G.; GRIFFITHS, G. Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. **J Cell Biol**, **124**: 677-688, 1994.
- DEVALLOIS, A.; GOH, K. S.; RASTOGI, N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species. **J Clin Microbiol**, **35**: 2969-2973, 1997.
- DING, A. H.; NATHAN, C. F.; STUEHR, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, **141**: 2407-2412, 1988.
- DOHERTY, T. M.; SHER, A. Defects in cell-mediated immunity affect chronic, but not innate, resistance of mice to *Mycobacterium avium* infection. **J Immunol**, **158**: 4822-4831, 1997.
- DOI, T.; ANDO, M.; AKAIKE, T.; SUGA, M.; SATO, K.; MAEDA, H. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. **Infect Immun**, **61**: 1980-1989, 1993.
- DORMAN, S. E.; HOLLAND, S. M. Mutation in the signal-transducing chain of the interferon-gamma receptor and susceptibility to mycobacterial infection. **J Clin Invest**, **101**: 2364-2369, 1998.
- EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D.; BEKIRANOV, S.; DRENKOW, J.; SHI, S.; GINGERAS, T. R.; GAASTERLAND, T.; SCHOOLNIK, G.; NATHAN, C. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. **J Exp Med**, **194**: 1123-1140, 2001.
- FANG, F. C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J Clin Invest**, **99**: 2818-2825, 1997.
- FELDMANN, M.; MAINI, R. N. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu Rev Immunol**, **19**: 163-196, 2001.
- FENG, Y.; PRESS, B.; WANDINGER-NESS, A. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. **J Cell Biol**, **131**: 1435-1452, 1995.
- FERRARI, G.; LANGEN, H.; NAITO, M.; PIETERS, J. A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. **Cell**, **97**: 435-447, 1999.
- FINLAY, B. B.; COSSART, P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. **Science**, **276**: 718-725, 1997.

FLESCH, I. E.; KAUFMANN, S. H. Mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates. **Infect Immun**, **59**: 3213-3218, 1991.

FLYNN, J. L.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; DALTON, D. K.; STEWART, T. A.; BLOOM, B. R. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Exp Med**, **178**: 2249-2254, 1993.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; CHAN, J.; TRIEBOLD, K. J.; PFEFFER, K.; LOWENSTEIN, C. J.; SCHREIBER, R.; MAK, T. W.; BLOOM, B. R. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**, **2**: 561-572, 1995.

FLYNN, J. L.; GOLDSTEIN, M. M.; TRIEBOLD, K. J.; SYPEK, J.; WOLF, S.; BLOOM, B. R. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, **155**: 2515-2524, 1995.

FLYNN, J. L.; SCANGA, C. A.; TANAKA, K. E.; CHAN, J. Effects of aminoguanidine on latent murine *tuberculosis*. **J Immunol**, **160**: 1796-1803, 1998.

FRATTI, R. A.; BACKER, J. M.; GRUENBERG, J.; CORVERA, S.; DERETIC, V. Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. **J Cell Biol**, **154**: 631-644, 2001.

FUCHS, R.; SCHMID, S.; MELLMAN, I. A possible role for Na⁺,K⁺-ATPase in regulating ATP-dependent endosome acidification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **86**: 539-543, 1989.

GADRE, D. V. HIV associated chronic atypical osteomyelitis by *Mycobacterium fortuitum--chelonae* group--a case report. **Indian J Med Sci**, **51**: 161-163, 1997.

GAILLARD, J. L.; BERCHE, P.; MOUNIER, J.; RICHARD, S.; SANSONETTI, P. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. **Infect Immun**, **55**: 2822-2829, 1987.

GANGADHARAM, P. R. Murine models for mycobacterioses. **Semin Respir Infect**, **1**: 250-261, 1986.

GATFIELD, J.; PIETERS, J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. **Science**, **288**: 1647-1650, 2000.

GELENDER, H.; CARTER, H. L.; BOWMAN, B.; BEEBE, W. E.; WALTERS, G. R. *Mycobacterium keratitis* after laser in situ keratomileusis. **J Refract Surg**, **16**: 191-195, 2000.

GOLDENTHAL, K. L.; HEDMAN, K.; CHEN, J. W.; AUGUST, J. T.; VIHKO, P.; PASTAN, I.; WILLINGHAM, M. C. Pre-lysosomal divergence of alpha 2-macroglobulin and transferrin: a kinetic study using a monoclonal antibody against a lysosomal membrane glycoprotein (LAMP-1). **J Histochem Cytochem**, **36**: 391-400, 1988.

GOMES, M. S.; FLORIDO, M.; PAIS, T. F.; APPELBERG, R. Improved clearance of *Mycobacterium avium* upon disruption of the inducible nitric oxide synthase gene. **J Immunol**, **162**: 6734-6739, 1999.

GORVEL, J. P.; CHAVRIER, P.; ZERIAL, M.; GRUENBERG, J. rab5 controls early endosome fusion in vitro. **Cell**, **64**: 915-925, 1991.

GOSLEE, S.; WOLINSKY, E. Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. **Am Rev Respir Dis**, **113**: 287-292, 1976.

GRAY, J. R.; RABENECK, L. Atypical mycobacterial infection of the gastrointestinal tract in AIDS patients. **Am J Gastroenterol**, **84**: 1521-1524, 1989.

GRIFFITH, D. E.; WALLACE, R. J., Eds. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial infections. UpToDate. Wellesley., UpToDate. Wellesley.ed. 2004.

HACKAM, D. J.; ROTSTEIN, O. D.; ZHANG, W.; GRUENHEID, S.; GROS, P.; GRINSTEIN, S. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. **J Exp Med**, **188**: 351-364, 1998.

HAIIVY, J.; TOBIN, H. *Mycobacterium fortuitum* infection in prosthetic breast implants. **Plast Reconstr Surg**, **109**: 2124-2128, 2002.

HAND, W. L.; SANFORD, J. P. *Mycobacterium fortuitum*--a human pathogen. **Ann Intern Med**, **73**: 971-977, 1970.

HAVELL, E. A. Synthesis and secretion of interferon by murine fibroblasts in response to intracellular *Listeria monocytogenes*. **Infect Immun**, **54**: 787-792, 1986.

HEISTEIN, J. B.; MANGINO, J. E.; RUBERG, R. L.; BERGESE, J. J. A prosthetic breast implant infected with *Mycobacterium fortuitum*. **Ann Plast Surg**, **44**: 330-333, 2000.

HENDERSON, R. A.; WATKINS, S. C.; FLYNN, J. L. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**, **159**: 635-643, 1997.

HIGH, N.; MOUNIER, J.; PREVOST, M. C.; SANSONETTI, P. J. IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. **Embo J**, **11**: 1991-1999, 1992.

HOFFMAN, P. C.; FRASER, D. W.; ROBICSEK, F.; O'BAR, P. R.; MAUNEY, C. U. Two outbreaks of sternal wound infection due to organisms of the *Mycobacterium fortuitum* complex. **J Infect Dis**, **143**: 533-542, 1981.

HOLSTI, M. A.; ALLEN, P. M. Processing and presentation of an antigen of *Mycobacterium avium* require access to an acidified compartment with active proteases. **Infect Immun**, **64**: 4091-4098, 1996.

HORSBURGH, C. R., JR. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. **N Engl J Med**, **324**: 1332-1338, 1991.

HORSBURGH, C. R., JR.; SELIK, R. M. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). **Am Rev Respir Dis**, **139**: 4-7, 1989.

IP, F. K.; CHOW, S. P. *Mycobacterium fortuitum* infections of the hand. Report of five cases. **J Hand Surg [Br]**, **17**: 675-677, 1992.

ISEMAN, M. D.; CORPE, R. F.; O'BRIEN, R. J.; ROSENZWIEG, D. Y.; WOLINSKY, E. Disease due to *Mycobacterium avium-intracellulare*. **Chest**, **87**: 139S-149S, 1985.

JACOBSON, M. A.; HOPEWELL, P. C.; YAJKO, D. M.; HADLEY, W. K.; LAZARUS, E.; MOHANTY, P. K.; MODIN, G. W.; FEIGAL, D. W.; CUSICK, P. S.; SANDE, M. A. Natural history of disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. **J Infect Dis**, **164**: 994-998, 1991.

JII, J.; MASTERSON, J.; SUN, J.; SOONG, L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. **J Immunol**, **174**: 7147-7153, 2005.

JUNG, Y. J.; LACOURSE, R.; RYAN, L.; NORTH, R. J. Virulent but not avirulent *Mycobacterium tuberculosis* can evade the growth inhibitory action of a T helper 1-dependent, nitric oxide Synthase 2-independent defense in mice. **J Exp Med**, **196**: 991-998, 2002.

KAMATH, A. B.; ALT, J.; DEBBABI, H.; BEHAR, S. M. Toll-like receptor 4-defective C3H/HeJ mice are not more susceptible than other C3H substrains to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, **71**: 4112-4118, 2003.

KAMIJO, R.; HARADA, H.; MATSUYAMA, T.; BOSLAND, M.; GERECITANO, J.; SHAPIRO, D.; LE, J.; KOH, S. I.; KIMURA, T.; GREEN, S. J.; ET AL. Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages. **Science**, **263**: 1612-1615, 1994.

KATOCH, V. M.; MOHAN KUMAR, T. Atypical mycobacteria infections. In: S. S. K. (Ed.). *Tuberculosis*. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd, 2001. Atypical mycobacteria infections, p.439-451

KAUFMANN, S. H. Cell-mediated immunity: dealing a direct blow to pathogens. **Curr Biol**, **9**: R97-99, 1999.

KELLEY, V. A.; SCHOREY, J. S. *Mycobacterium's* arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron. **Mol Biol Cell**, **14**: 3366-3377, 2003.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P. The beneficial effects of localized tumor necrosis factor production in BCG infection. **Behring Inst Mitt**: 120-124, 1991.

KINDLER, V.; SAPPINO, A. P.; GRAU, G. E.; PIGUET, P. F.; VASSALLI, P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. **Cell**, **56**: 731-740, 1989.

KORNFELD, S.; MELLMAN, I. The biogenesis of lysosomes. **Annu Rev Cell Biol**, **5**: 483-525, 1989.

KRUYS, V.; KEMMER, K.; SHAKHOV, A.; JONGENEEL, V.; BEUTLER, B. Constitutive activity of the tumor necrosis factor promoter is canceled by the 3' untranslated region in nonmacrophage cell lines; a trans-dominant factor overcomes this suppressive effect. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **89**: 673-677, 1992.

KUSHNER, D. S.; MCMILLEN, S.; SENDERI, M. Atypical acid-fast bacilli. II. *Mycobacterium fortuitum*: bacteriologic characteristics and pathogenicity for laboratory animals. **Am Rev Tuberc**, **76**: 108-122, 1957.

KUSUNOKI, S.; EZAKI, T. Proposal of *Mycobacterium peregrinum* sp. nov., nom. rev., and elevation of *Mycobacterium chelonae* subsp. abscessus (Kubica et al.) to species status: *Mycobacterium abscessus* comb. nov. **Int J Syst Bacteriol**, **42**: 240-245, 1992.

KWAN, W. C.; MCMASTER, W. R.; WONG, N.; REINER, N. E. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. **Infect Immun**, **60**: 2115-2120, 1992.

LADEL, C. H.; SZALAY, G.; RIEDEL, D.; KAUFMANN, S. H. Interleukin-12 secretion by *Mycobacterium tuberculosis*-infected macrophages. **Infect Immun**, **65**: 1936-1938, 1997.
LALVANI, A.; BROOKES, R.; WILKINSON, R. J.; MALIN, A. S.; PATHAN, A. A.; ANDERSEN, P.; DOCKRELL, H.; PASVOL, G.; HILL, A. V. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8⁺ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **95**: 270-275, 1998.

LEÃO S.C., M. A., MEJIA GI, PALOMINO JC, ROBLEDO J, TELLES MAS, PORTAELS F. Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria.: Brugges, Vanden BROELLE. 2004. 164 p.

LODISH, H.; BERK, A.; L., Z. S.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. Protein Sorting: organelle biogenesis and protein secretion. In: W. H. F. a. Co (Ed.). Molecular cell Biology. New York, 2000. Protein Sorting: organelle biogenesis and protein secretion, p.675-750

LYADOVA, I.; YEREMEEV, V.; MAJOROV, K.; NIKONENKO, B.; KHAIDUKOV, S.; KONDRATIEVA, T.; KOBETS, N.; APT, A. An ex vivo study of T lymphocytes recovered from the lungs of I/St mice infected with and susceptible to *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun**, **66**: 4981-4988, 1998.

MACMICKING, J. D.; NORTH, R. J.; LACOURSE, R.; MUDGETT, J. S.; SHAH, S. K.; NATHAN, C. F. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against *tuberculosis*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **94**: 5243-5248, 1997.

MAINI, R.; ST CLAIR, E. W.; BREEDVELD, F.; FURST, D.; KALDEN, J.; WEISMAN, M.; SMOLEN, J.; EMERY, P.; HARRIMAN, G.; FELDMANN, M.; LIPSKY, P. Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor alpha monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. ATTRACT Study Group. **Lancet**, **354**: 1932-1939, 1999.

MALIK, Z. A.; DENNING, G. M.; KUSNER, D. J. Inhibition of Ca(2+) signaling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. **J Exp Med**, **191**: 287-302, 2000.

MARTH, T.; KELSALL, B. L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. **J Exp Med**, **185**: 1987-1995, 1997.

MARTIN, E.; NATHAN, C.; XIE, Q. W. Role of interferon regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. **J Exp Med**, **180**: 977-984, 1994.

MATTHEWS, M. R.; CARUSO, D. M.; TSUJIMURA, R. B.; SMILACK, J. D.; POCKAJ, B. A.; MALONE, J. M. Ventral hernia synthetic mesh repair infected by *Mycobacterium fortuitum*. **Am Surg**, **65**: 1035-1037, 1999.

MAXFIELD, F. R.; YAMASHIRO, D. J. Endosome acidification and the pathways of receptor-mediated endocytosis. **Adv Exp Med Biol**, **225**: 189-198, 1987.

MAYORGA, L. S.; DIAZ, R.; COLOMBO, M. I.; STAHL, P. D. GTP gamma S stimulation of endosome fusion suggests a role for a GTP-binding protein in the priming of vesicles before fusion. **Cell Regul**, **1**: 113-124, 1989.

MEANS, T. K.; JONES, B. W.; SCHROMM, A. B.; SHURTLEFF, B. A.; SMITH, J. A.; KEANE, J.; GOLENBOCK, D. T.; VOGEL, S. N.; FENTON, M. J. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage responses. **J Immunol**, **166**: 4074-4082, 2001.

MEANS, T. K.; WANG, S.; LIEN, E.; YOSHIMURA, A.; GOLENBOCK, D. T.; FENTON, M. J. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**, **163**: 3920-3927, 1999.

MILDER, R.; KLOETZEL, J. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. **Parasitology**, **80**: 139-145, 1980.

MINDEN, A.; LIN, A.; CLARET, F. X.; ABO, A.; KARIN, M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. **Cell**, **81**: 1147-1157, 1995.

MOHAN, V. P.; SCANGA, C. A.; YU, K.; SCOTT, H. M.; TANAKA, K. E.; TSANG, E.; TSAI, M. M.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent *tuberculosis*: possible role for limiting pathology. **Infect Immun**, **69**: 1847-1855, 2001.

MOLLOY, A.; GAUDERNACK, G.; LEVIS, W. R.; COHN, Z. A.; KAPLAN, G. Suppression of T-cell proliferation by *Mycobacterium leprae* and its products: the role of lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **87**: 973-977, 1990.

MORENO, C.; TAVERNE, J.; MEHLERT, A.; BATE, C. A.; BREALEY, R. J.; MEAGER, A.; ROOK, G. A.; PLAYFAIR, J. H. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. **Clin Exp Immunol**, **76**: 240-245, 1989.

MURRAY, P. J. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. **Trends Microbiol**, **7**: 366-372, 1999.

MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D. S.; FROLAND, S. S.; SONG, Y. K. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. **Clin Exp Immunol**, **14**: 541-553, 1973.
MYRVIK, Q. N.; LEAKE, E. S.; WRIGHT, M. J. Disruption of phagosomal membranes of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. **Am Rev Respir Dis**, **129**: 322-328, 1984.

NICHOLSON, S.; BONECINI-ALMEIDA MDA, G.; LAPA E SILVA, J. R.; NATHAN, C.; XIE, Q. W.; MUMFORD, R.; WEIDNER, J. R.; CALAYCAY, J.; GENG, J.; BOECHAT, N.; LINHARES, C.; ROM, W.; HO, J. L. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with *tuberculosis*. **J Exp Med**, **183**: 2293-2302, 1996.
NIGOU, J.; GILLERON, M.; PUZO, G. Lipoarabinomannans: from structure to biosynthesis. **Biochimie**, **85**: 153-166, 2003.

NOVICK, P.; ZERIAL, M. The diversity of Rab proteins in vesicle transport. **Curr Opin Cell Biol**, **9**: 496-504, 1997.

OH, Y. K.; STRAUBINGER, R. M. Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction. **Infect Immun**, **64**: 319-325, 1996.

ORME, I. M.; MILLER, E. S.; ROBERTS, A. D.; FURNEY, S. K.; GRIFFIN, J. P.; DOBOS, K. M.; CHI, D.; RIVOIRE, B.; BRENNAN, P. J. T lymphocytes mediating protection and cellular cytolysis during the course of *Mycobacterium tuberculosis* infection. Evidence for different kinetics and recognition of a wide spectrum of protein antigens. **J Immunol**, **148**: 189-196, 1992.

ORME, I. M.; ROBERTS, A. D.; GRIFFIN, J. P.; ABRAMS, J. S. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, **151**: 518-525, 1993.

PANCHOLI, P.; MIRZA, A.; BHARDWAJ, N.; STEINMAN, R. M. Sequestration from immune CD4⁺ T cells of mycobacteria growing in human macrophages. **Science**, **260**: 984-986, 1993.

PARTI, R. P.; SRIVASTAVA, S.; GACHHUI, R.; SRIVASTAVA, K. K.; SRIVASTAVA, R. Murine infection model for *Mycobacterium fortuitum*. **Microbes Infect**, **7**: 349-355, 2005.

PEETERMANS, W. E.; RAATS, C. J.; LANGERMANS, J. A.; VAN FURTH, R. Mycobacterial heat-shock protein 65 induces proinflammatory cytokines but does not activate human mononuclear phagocytes. **Scand J Immunol**, **39**: 613-617, 1994.

- PITT, A.; MAYORGA, L. S.; STAHL, P. D.; SCHWARTZ, A. L. Alterations in the protein composition of maturing phagosomes. **J Clin Invest**, **90**: 1978-1983, 1992.
- PRYER, N. K.; WUESTEHUBE, L. J.; SCHEKMAN, R. Vesicle-mediated protein sorting. **Annu Rev Biochem**, **61**: 471-516, 1992.
- RAGNO, S.; ROMANO, M.; HOWELL, S.; PAPPIN, D. J.; JENNER, P. J.; COLSTON, M. J. Changes in gene expression in macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis*: a combined transcriptomic and proteomic approach. **Immunology**, **104**: 99-108, 2001.
- ROACH, D. R.; BRISCOE, H.; SAUNDERS, B.; FRANCE, M. P.; RIMINTON, S.; BRITTON, W. J. Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. **J Exp Med**, **193**: 239-246, 2001.
- ROTHMAN, J. E.; ORCI, L. Molecular dissection of the secretory pathway. **Nature**, **355**: 409-415, 1992.
- ROTHMAN, J. E.; SOLLNER, T. H. Throttles and dampers: controlling the engine of membrane fusion. **Science**, **276**: 1212-1213, 1997.
- RUNYON, E. H. Ten mycobacterial pathogens. **Tubercle**, **55**: 235-240, 1974.
- RUSSELL, D. G. Immunoelectron microscopy of endosomal trafficking in macrophages infected with microbial pathogens. **Methods Cell Biol**, **45**: 277-288, 1994.
- RUSSELL, D. G. What does 'inhibition of phagosome-lysosome fusion' really mean? **Trends Microbiol**, **6**: 212-214, 1998.
- SACK, J. B. Disseminated infection due to *Mycobacterium fortuitum* in a patient with AIDS. **Rev Infect Dis**, **12**: 961-963, 1990.
- SAITO, H.; TOMIOKA, H.; SATO, K.; TASAKA, H.; DAWSON, D. J. Identification of various serovar strains of *Mycobacterium avium* complex by using DNA probes specific for *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. **J Clin Microbiol**, **28**: 1694-1697, 1990.
- SATO, K.; AKAKI, T.; TOMIOKA, H. Differential potentiation of anti-mycobacterial activity and reactive nitrogen intermediate-producing ability of murine peritoneal macrophages activated by interferon-gamma (IFN-gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha). **Clin Exp Immunol**, **112**: 63-68, 1998.
- SATO, K.; TOMIOKA, H.; SAITO, H. [Differential growth inhibition of mycobacteria by interferon-gamma-or tumor necrosis factor-alpha-treated murine peritoneal macrophages]. **Kekkaku**, **71**: 607-614, 1996.
- SCANGA, C. A.; MOHAN, V. P.; TANAKA, K.; ALLAND, D.; FLYNN, J. L.; CHAN, J. The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Infect Immun**, **69**: 7711-7717, 2001.

SCHAEFER, W. B. Serological identification of atypical mycobacteria. In: T. N. Bergan, J. R. (Ed.). *Methods in Microbiology*, 1979. Serological identification of atypical mycobacteria, p.323-344

SCHLESINGER, L. S. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol*, **215**: 71-96, 1996.

SCHOREY, J. S.; CARROLL, M. C.; BROWN, E. J. A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria. *Science*, **277**: 1091-1093, 1997.

SERBINA, N. V.; FLYNN, J. L. Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice. *Infect Immun*, **67**: 3980-3988, 1999.

SHILOH, M. U.; NATHAN, C. F. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of Salmonella and mycobacteria. *Curr Opin Microbiol*, **3**: 35-42, 2000.

SHIRATSUCHI, H.; JOHNSON, J. L.; ELLNER, J. J. Bidirectional effects of cytokines on the growth of *Mycobacterium avium* within human monocytes. *J Immunol*, **146**: 3165-3170, 1991.

SMITH, M. B.; BOYARS, M. C.; WOODS, G. L. Fatal *Mycobacterium fortuitum* meningitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis*, **23**: 1327-1328, 1996.

SMITH, M. B.; SCHNADIG, V. J.; BOYARS, M. C.; WOODS, G. L. Clinical and pathologic features of *Mycobacterium fortuitum* infections. An emerging pathogen in patients with AIDS. *Am J Clin Pathol*, **116**: 225-232, 2001.

SOLLNER, T.; WHITEHEART, S. W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P.; ROTHMAN, J. E. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature*, **362**: 318-324, 1993.

SPRINGER, B.; BOTTGER, E. C.; KIRSCHNER, P.; WALLACE, R. J., JR. Phylogeny of the *Mycobacterium chelonae*-like organism based on partial sequencing of the 16S rRNA gene and proposal of *Mycobacterium mucogenicum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, **45**: 262-267, 1995.

STAMM, L. M.; MORISAKI, J. H.; GAO, L. Y.; JENG, R. L.; MCDONALD, K. L.; ROTH, R.; TAKESHITA, S.; HEUSER, J.; WELCH, M. D.; BROWN, E. J. *Mycobacterium marinum* escapes from phagosomes and is propelled by actin-based motility. *J Exp Med*, **198**: 1361-1368, 2003.

STEWART, G. R.; EHRT, S.; RILEY, L. W.; DALE, J. W.; MCFADDEN, J. Deletion of the putative antioxidant noxR1 does not alter the virulence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Tuber Lung Dis*, **80**: 237-242, 2000.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHAIBLE, U. E.; RUSSELL, D. G. *Mycobacterium*-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *Embo J*, **15**: 6960-6968, 1996.

STURGILL-KOSZYCKI, S.; SCHLESINGER, P. H.; CHAKRABORTY, P.; HADDIX, P. L.; COLLINS, H. L.; FOK, A. K.; ALLEN, R. D.; GLUCK, S. L.; HEUSER, J.; RUSSELL, D. G. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, **263**: 678-681, 1994.

SUTTERWALA, F. S.; NOEL, G. J.; CLYNES, R.; MOSSER, D. M. Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. **J Exp Med**, **185**: 1977-1985, 1997.

TEITELBAUM, R.; CAMMER, M.; MAITLAND, M. L.; FREITAG, N. E.; CONDEELIS, J.; BLOOM, B. R. Mycobacterial infection of macrophages results in membrane-permeable phagosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **96**: 15190-15195, 1999.

TELENTI, A.; MARCHESI, F.; BALZ, M.; BALLY, F.; BOTTGER, E. C.; BODMER, T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. **J Clin Microbiol**, **31**: 175-178, 1993.

TOMIOKA, H.; SAITO, H.; EMORI, M.; SETOGAWA, T. [Behaviour of gamma delta TCR+ T cells during the course of nontuberculous mycobacterial infections and proliferative response of host lymphocytes to 65kD heat shock protein]. **Kekkaku**, **68**: 99-104, 1993.

VANHEYNINGEN, T. K.; COLLINS, H. L.; RUSSELL, D. G. IL-6 produced by macrophages infected with *Mycobacterium* species suppresses T cell responses. **J Immunol**, **158**: 330-337, 1997.

VANKAYALAPATI, R.; WIZEL, B.; SAMTEN, B.; GRIFFITH, D. E.; SHAMS, H.; GALLAND, M. R.; VON REYN, C. F.; GIRARD, W. M.; WALLACE, R. J., JR.; BARNES, P. F. Cytokine profiles in immunocompetent persons infected with *Mycobacterium avium* complex. **J Infect Dis**, **183**: 478-484, 2001.

VIA, L. E.; DERETIC, D.; ULMER, R. J.; HIBLER, N. S.; HUBER, L. A.; DERETIC, V. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. **J Biol Chem**, **272**: 13326-13331, 1997.

WAGNER, D.; YOUNG, L. S. Nontuberculous mycobacterial infections: a clinical review. **Infection**, **32**: 257-270, 2004.

WALLACE, R. J., JR.; SWENSON, J. M.; SILCOX, V. A.; BULLEN, M. G. Treatment of nonpulmonary infections due to *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* on the basis of in vitro susceptibilities. **J Infect Dis**, **152**: 500-514, 1985.

WALLACE, R. J., JR.; SWENSON, J. M.; SILCOX, V. A.; GOOD, R. C.; TSCHEN, J. A.; STONE, M. S. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria. **Rev Infect Dis**, **5**: 657-679, 1983.

WALLACE, R. J. J.; O'BRIEN, R.; GLASSROTH, J.; J., R.; DUTTA, A. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. **Am Rev Respir Dis**, **142**: 940-953, 1990.

- WANG, C. H.; LIU, C. Y.; LIN, H. C.; YU, C. T.; CHUNG, K. F.; KUO, H. P. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary *tuberculosis* due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. **Eur Respir J**, **11**: 809-815, 1998.
- WAYNE, L. G.; SRAMEK, H. A. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. **Clin Microbiol Rev**, **5**: 1-25, 1992.
- WEATHERBY, K. E.; ZWILLING, B. S.; LAFUSE, W. P. Resistance of macrophages to *Mycobacterium avium* is induced by alpha2-adrenergic stimulation. **Infect Immun**, **71**: 22-29, 2003.
- WHITEHEART, S. W.; GRIFF, I. C.; BRUNNER, M.; CLARY, D. O.; MAYER, T.; BUHROW, S. A.; ROTHMAN, J. E. SNAP family of NSF attachment proteins includes a brain-specific isoform. **Nature**, **362**: 353-355, 1993.
- WOLINSKY, E. Mycobacterial diseases other than *tuberculosis*. **Clin Infect Dis**, **15**: 1-10, 1992.
- WOLINSKY, E.; RYNEARSON, T. K. Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. **Am Rev Respir Dis**, **97**: 1032-1037, 1968.
- XU, S.; COOPER, A.; STURGILL-KOSZYCKI, S.; VAN HEYNINGEN, T.; CHATTERJEE, D.; ORME, I.; ALLEN, P.; RUSSELL, D. G. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. **J Immunol**, **153**: 2568-2578, 1994.
- YOSHIMURA, H. H.; GRAHAM, D. Y. Nucleic acid hybridization studies of mycobactin-dependent mycobacteria. **J Clin Microbiol**, **26**: 1309-1312, 1988.
- YOUNG, L. S.; INDERLIED, C. B.; BERLIN, O. G.; GOTTLIEB, M. S. Mycobacterial infections in AIDS patients, with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. **Rev Infect Dis**, **8**: 1024-1033, 1986.
- ZIMMERLI, S.; EDWARDS, S.; ERNST, J. D. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. **Am J Respir Cell Mol Biol**, **15**: 760-770, 1996.

ANEXO I

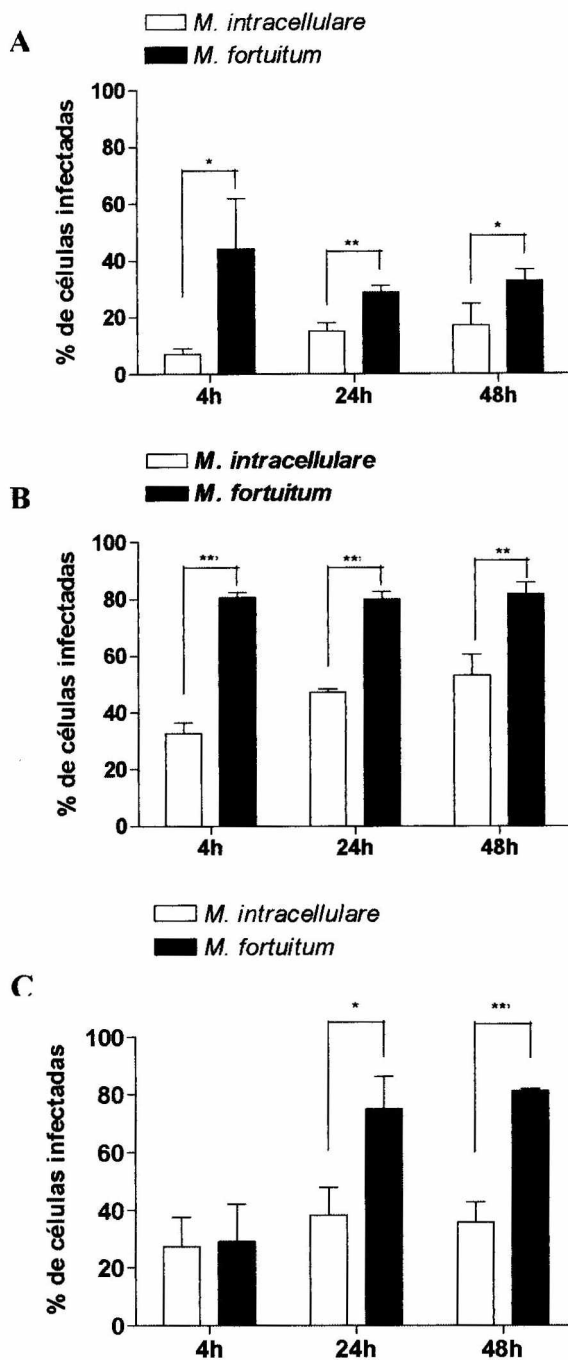


Fig 1 - O percentual de macrófagos infectados por *M. fortuitum* é maior do que o de macrófagos infectados por *M. intracellulare*. Macrófagos peritoneais ($5 \times 10^5/\text{ml}$) foram infectados com *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* (10 bacilos por célula). Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram fixadas em glutaraldeído e coradas pelo método de Zielh-Nielsen para contagem do número de células contendo micobactérias. **(A)** *M. fortuitum* apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais que *M. intracellulare* nos tempos de 4, 24 e 48 horas (*t* de Student, $p=0,0218$, $p=0,0038$, $p=0,0374$). **(B)** *M. fortuitum* apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais que *M. intracellulare* nos tempos de 4, 24 e 48 horas (*t* de Student, $p<0,0001$, $p<0,0001$, $p=0,0043$). **(C)** *M. fortuitum* apresenta uma maior capacidade de infectar macrófagos peritoneais que *M. intracellulare* nos tempos de 24 e 48 horas (*t* de Student, $p=0,0129$, $p=0,0004$, respectivamente). As barras representam a média \pm SD.

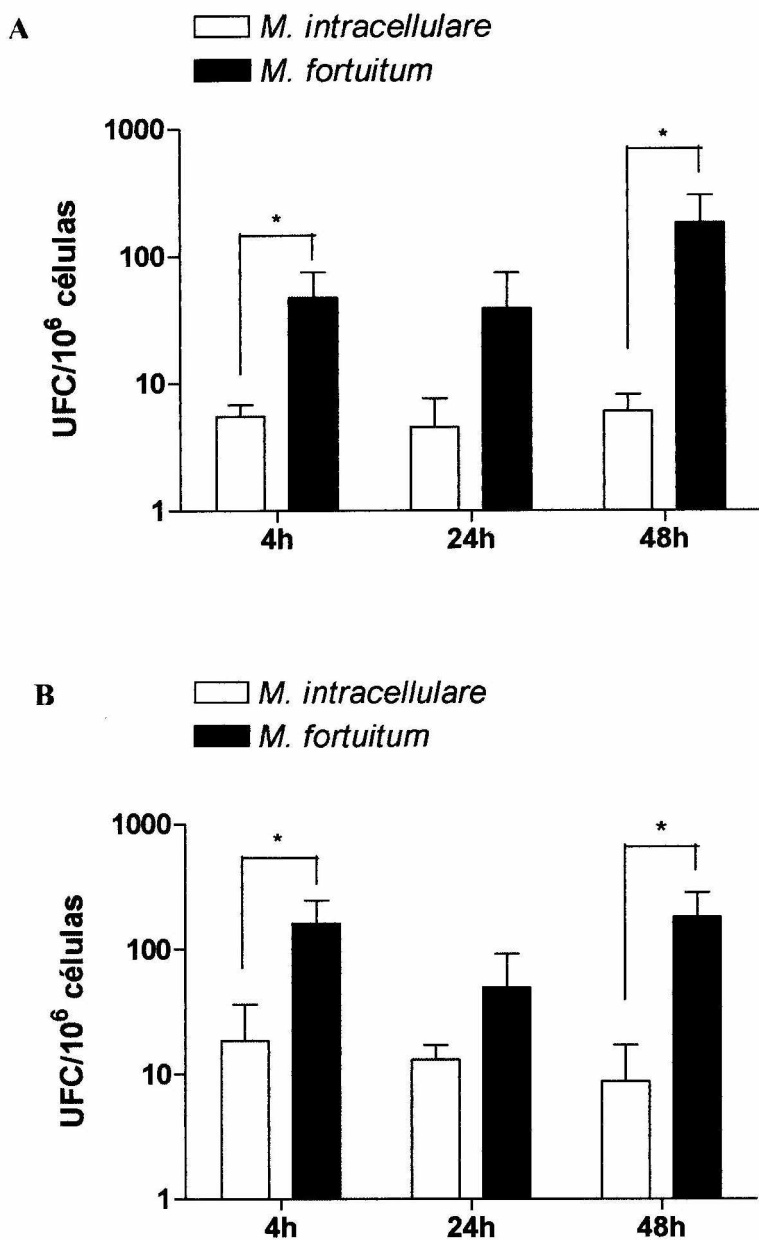


Fig 2 - *M. fortuitum* apresenta maior viabilidade que *M. intracellulare*. Macrófagos peritoneais não tratados foram infectados como descrito anteriormente. Após 4, 24 e 48 horas de infecção, as células foram lisadas e, após diluições seriadas até 10^{-4} , plaqueadas. O número de bacilos por célula foi avaliado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). **(A)** *M. fortuitum* apresenta uma maior viabilidade no interior de macrófagos peritoneais que *M. intracellulare* nos tempos de 4 e 48 horas (*t* de Student, $p=0,0249$ e $p=0,0237$). **(B)** *M. fortuitum* apresenta uma maior viabilidade no interior de macrófagos peritoneais que *M. intracellulare* nos tempos de 4 e 48 horas (*t* de Student, $p=0,0162$ e $p=0,0166$). As barras representam a média \pm SD.

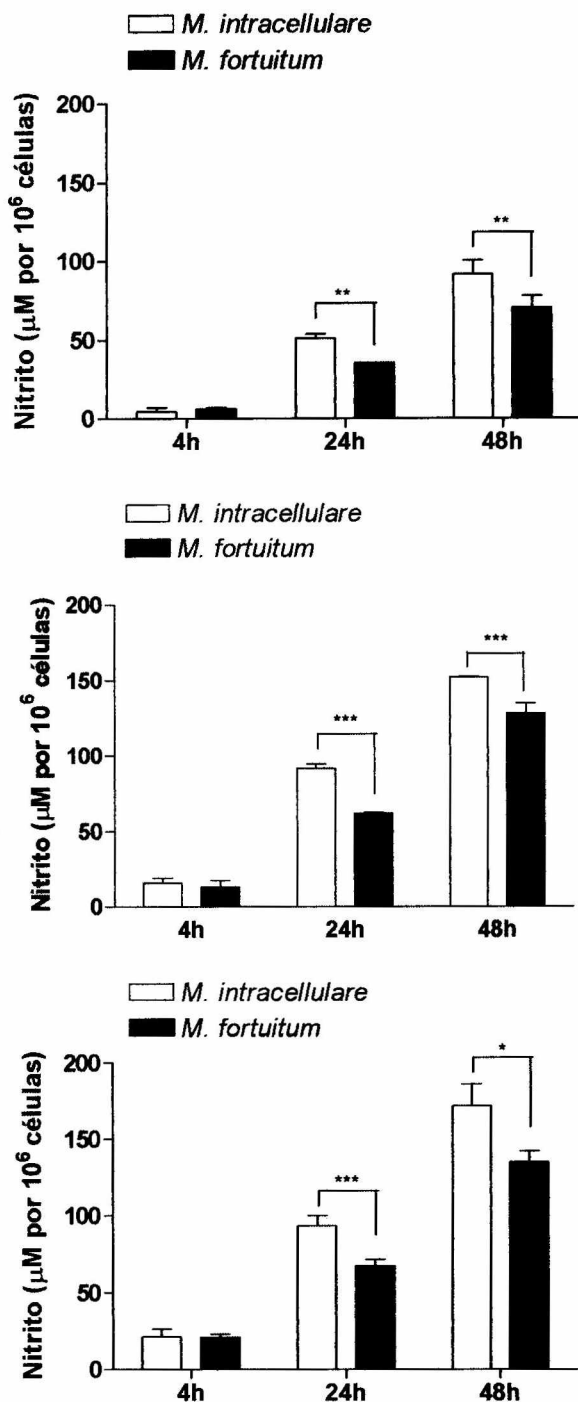


Fig 3 - A produção de óxido nítrico é maior nas células infectadas por *M. intracellulare*. Os sobrenadantes dos macrófagos peritoneais tratados com IFN- γ e infectados por *M. intracellulare* ou *M. fortuitum* foram coletados após 4, 24 e 48 horas de infecção para dosagem dos níveis de nitrito. O tratamento com IFN- γ induziu a produção de nitrito pelas células. (A) *M. intracellulare* induziu maior produção de nitrito por macrófagos peritoneais que *M. fortuitum* nos tempos de 24 e 48h após a infecção (*t* de Student; $p=0,0020$ e $p=0,0098$, respectivamente). (B) *M. intracellulare* induziu maior produção de nitrito por macrófagos peritoneais que *M. fortuitum* nos tempos de 24 e 48h após a infecção (*t* de Student; $p<0,0001$ e $p=0,0004$, respectivamente). (C) *M. intracellulare* induziu maior produção de nitrito por macrófagos peritoneais que *M. fortuitum* nos tempos de 24 e 48h após a infecção (*t* de Student; $p=0,0007$ e $p=0,0315$, respectivamente). As barras representam a média \pm SD.