UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Estudo dos mecanismos de virulência de cepas resistentes e
sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis***

Jamile Couto

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2008

Jamile Couto

Estudo dos mecanismos de virulência de cepas resistentes e
sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
orientador/presidente

Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite
1º. examinador

Profa. Dra. Daisy Nakamura Sato
2º. examinador

São Paulo, 14 de Novembro de 2008.

Mensagem

Tenho amigos que não sabem o quanto são meus amigos. Não percebem

o

amor que lhes devoto e a absoluta necessidade que tenho deles.

A amizade é um sentimento mais nobre do que o amor, eis que permite que o objeto dela se divida em outros afetos, enquanto o amor tem intrínseco o ciúme, que não admite a rivalidade. E eu poderia

suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos! Até

mesmo

aqueles que não percebem o quanto são meus amigos e o quanto minha vida depende de suas existências.

A alguns deles não procuro, basta-me saber que eles existem. Esta mera condição me encoraja a seguir em frente pela vida. Mas, porque não os procuro com assiduidade, não posso lhes dizer o quanto gosto deles.

Eles não iriam acreditar.

Muitos deles estão lendo esta crônica e não sabem que estão incluídos na sagrada relação de meus amigos. Mas é delicioso que eu saiba e

sinta que os adoro, embora não declare e não os procure. E às vezes,

quando os procuro, noto que eles não têm noção de como me são

necessários, de como são indispensáveis ao meu equilíbrio vital,

porque eles fazem parte do mundo que eu, tremulamente, construí e se tornaram alicerces do meu encanto pela vida. Se um deles morrer, eu

ficarei torto para um lado.

Se todos eles morrerem, eu desabo! Por isso é que, sem que eles saibam, eu rezo pela vida deles. E me envergonho, porque essa minha

prece é, em síntese, dirigida ao meu bem estar. Ela é, talvez, fruto

do meu egoísmo.

Por vezes, mergulho em pensamentos sobre alguns deles. Quando viajo

e

fico diante de lugares maravilhosos, cai-me alguma lágrima por não estarem junto de mim, compartilhando daquele prazer. Se alguma coisa

me consome e me envelhece é que a roda furiosa da vida não me permite ter sempre ao meu lado, morando comigo, andando comigo, falando

comigo, vivendo comigo, todos os meus amigos, e, principalmente os

que

só desconfiam ou talvez nunca vão saber que são meus amigos!

A gente não faz amigos, reconhece-os."

Amigos (Vinicius de Moraes)

Dedicatória

**Dedico esta dissertação aos meus pais Pedro Couto e Carmela
Montilha Couto,**

**Obrigada por vocês existirem e por serem quem são.
Obrigada pela dedicação, amizade e companheirismo.**

Obrigada pela vida que tive e que tenho.

Obrigada por me darem a vida,

Por todos os ensinamentos, sermões, castigos,

Palmas e, principalmente pelos exemplos.

Obrigada por ensinar o verdadeiro valor da vida.

Assim, eu pude ver que nem tudo é como a gente quer.

**Vocês são meus verdadeiros mestres, orientadores e
professores, um porto-seguro, um ombro amigo, uma mão pra
ajudar sempre ensinando que o amor, a educação e o respeito
ao próximo valem a pena.**

Vocês são as pessoas mais importantes na minha vida.

Amo vocês.

Às minhas irmãs:

Ligia Paula Couto e Renata Couto,

**Obrigada por cada minuto em que convivemos juntas,
pela Amizade, por me guiarem no caminho certo, pelas
palavras de Incentivo, pelo apoio, amor e compreensão.**

Amo vocês.

Pais e irmãs, fonte eterna de inspiração.

Este título também é de vocês.

Obrigada.

Agradecimentos

Ao prof. Titular Mario H. Hirata e à prof^a. Assoc. Rosario D. C. Hirata pela orientação, colaboração e paciência para a execução deste projeto.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas e à Universidade de São Paulo por esta oportunidade.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Às funcionárias da limpeza e organização do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Claudia, Dorlei, Rosi e Carmem.

Ao Prof. Rui Curi e a aluna de Doutorado Tavane pelos ensinamentos.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Sueli Providelo, Ana Maria Dias Dantas, Dora e Edna Batista Lima pelo auxílio profissional e pelas horas de conversa.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Jorge e Elaine pelo auxílio profissional.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa de mestrado concedida e à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio concedido a este e a tantos outros projetos do laboratório.

Ao Instituto Clemente Ferreira e aos funcionários, mas principalmente a Maria Idemar P. Albarral por toda colaboração, e ao Dr. Fernando Augusto Fiuza de Melo, pelas sugestões, colaborações e estímulo.

Às Profas. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite do Laboratório de Micobactérias da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (UNESP) e Dra. Daisy Nakamura Sato do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL) pelas sugestões, colaborações e carinho.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP) e um agradecimento muito especial aos amigos, que foram e são muito importantes nesta minha conquista vocês são MARA.

RESUMO

COUTO, J. **Estudo dos mecanismos de virulência de cepas resistentes e sensíveis de *Mycobacterium tuberculosis***, 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

A tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública mundial. O principal agente etiológico da doença é o *Mycobacterium tuberculosis*, infectando entre outras células, os macrófagos. A infecção pode manter-se latente por vários anos sem causar sintomas clínicos aparentes. Para esta pesquisa, foi proposto o estudo de indução de marcadores de resposta inflamatória em células THP-1 diferenciadas em macrófagos utilizando isolados micobacterianos sensíveis, uni ou multidrogas resistentes transfectados com o plasmídeo pFPCAGFP carreando o gene da proteína verde fluorescente, como marcador de infecção celular. Objetivou também avaliar a relação entre isolados clínicos de *M.tuberculosis* sensíveis ou com resistência a uma ou multidrogas e sua relação à virulência. Para isso, culturas da linhagem monocítica humana (THP-1) foram mantidas para posterior infecção por isolados clínicos, genotipicamente identificados pertencentes à nossa micobacterioteca. A expressão do RNAm foi quantificada e avaliada por RT-PCR e posteriormente, PCR em tempo real foi realizado. Após infecção das células THP-1 diferenciadas em macrófagos, observou-se que houve um aumento na expressão das citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 β* , *IL-6* e *TNF- α*) e TLRs (TLR2 e TLR4) em relação ao controle da infecção. As análises estatísticas permitiram a correlação na expressão destas citocinas e TLRs, e através desses resultados, foi possível constatar que TLR2 regula a expressão das citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 β* , *IL-6* e *TNF- α*) e que os Isolados clínicos com maior resistência, sinalizam melhor a expressão das citocinas pró-inflamatórias e TLRs, ao passo que isolados clínicos sensíveis, possuem uma fraca sinalização.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*. Células THP-1 diferenciadas. Citocinas pró-inflamatórias. TLRs. Expressão gênica.

ABSTRACT

COUTO, J. **Study of mechanisms of virulence of resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis***, 2008. 90 f. Dissertation (Masters Degree) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Tuberculosis is the major causative of death and morbidity and still is a serious problem to the health in the world. *Mycobacterium tuberculosis* is the major causative agent of tuberculosis disease, infecting cells like macrophages. The infection can keep dormant for several years without any clinical symptoms. For this research, the study was proposed for induction of markers of inflammatory response in cells differentiated THP-1 in macrophages by clinical isolates from sensitive or multidrug resistant mycobacteria carrying pFPCAGFP plasmid that contains green fluorescent protein gene, a marker of infection cell. Also objective assesses the relationship between clinical isolates of sensitive or with resistance to one or four drugs *M.tuberculosis* and its relationship to virulence. For this, cultures of monocytic lineage human (THP-1) were kept for subsequent infection by clinical isolates, genotypically identified belonging to our mycobacterioteca. The expression of mRNA was quantified and evaluated by RT-PCR and subsequently, real-time PCR was performed. After infection of the THP-1 differentiated cells in macrophages, it was observed that there was an increase expression of pro-inflammatory cytokines (*IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α*) and TLRs (TLR2 and TLR4) compared to infection control. Statistical analyses allowed expression correlation of these cytokines and TLRs, and through those results, it was possible to see that TLR2 regulates pro-inflammatory cytokines (*IL-1 β* , *IL-6* and *TNF- α*) expression and those clinical isolates with four resistance have better signal of pro-inflammatory cytokines and TLRs expression, while sensitive clinical isolates, has a weak signal.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*. Differentiated THP-1 cells. Cytokines proinflammatory. TLRs. Gene expression.

Sumário

Lista de abreviaturas	ix
Lista de figuras	xi
Lista de tabelas	xii
1 - Introdução	13
2 - Objetivos	22
3 - Metodologia	
3.1 - Isolados clínicos de <i>M.tuberculosis</i>	23
3.2 - Preparação de <i>E.coli</i> DH5 α	23
3.3 - Transformação de <i>E.coli</i> DH5 α	24
3.4 - Amostras micobacterianas	25
3.4.1 - Cultivo de isolados clínicos de <i>M.tuberculosis</i>	25
3.4.2 - Isolamento e cultura de micobactérias	26
3.5 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	26
3.5.1 - Preparo das suspensões micobacterianas	26
3.6 - Eletroporação de micobactérias	28
3.6.1 - Preservação de isolados clínicos eletroporados com pFPCAGFP	29
3.7 - Cultura de células	29
3.7.1 - Descongelamento de células	29
3.7.2 - Cultura de células	30
3.7.3 - Congelamento de células	30
3.7.4 - Diferenciação de células	31
3.8 - Infecção das células por <i>M.tuberculosis</i>	31
3.9 - Extração de RNA	33
3.10 - Análise estatística	35
4 - Resultados	36
5 - Discussão	60
6 - Conclusões	66
7 - Referências bibliográficas	67
8 - Anexos	74

Lista de Abreviaturas

μg	Micrograma
μL	Microlitro
Ba Cl_2	Cloreto de bário
C	Citosina
CaCl_2	Cloreto de cálcio
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, EUA
cDNA	DNA complementar
CIM	Concentração inibitória mínima
CO_2	Gás carbônico
CR	Controle de resistência
CR1	Receptor do sistema complemento 1
CR4	Receptor do sistema complemento 4
D.O.	Densidade ótica
D29	Bacteriófago D29
DEPEC	Dietilpolicarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GAPD	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GFP	Proteína verde fluorescente
H	Isoniazida
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
ICF	Instituto Clemente Ferreira
IFN- γ	Interferon gama
IL-12	Interleucina 12
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-27	Interleucina 27
IL-6	Interleucina 6
inhA	enoi-ACP redutase
kasA	B-cetoacetil ACP sintase
katG	Catalase peroxidase
KCl	Cloreto de potássio
kV	Kilowats
LAM	Lipoarabnomanose
LB	Meio de cultura Luria Bertani
L-J	Meio de cultura Lowenstein-Jensen
M	Molar
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR-TB	Micobactéria multi-resistente
MgCl_2	Cloreto de magnésio
MIRU	Mycobacterial interspersed repetitive units

N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NAT	Arilamina N-acetiltransferase
NF- κ B	Fator nuclear KappaB
OADC	Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMA	Acetato de forbol miristato
PRA	Reação em cadeia da polimerase – análise da restrição enzimática
qsp	Quantidade suficiente para
R	Rifampicina
r	Resistente
REMA	Resazurin microtiter assay plate
RNA _m	RNA mensageiro
RPMI	Meio de cultura celular
rpo β	Gene que codifica a subunidade beta da RNA polimerase micobacteriana
RT	Transcriptase reversa
s	Sensível
sIL-27R	Receptor solúvel da interleucina 27
SMS	Secretaria municipal da saúde
T	Tirosina
TB	Tuberculose
THP-1	Linhagem monocítica humana
TIR	Receptor Toll/interleucina
TLR2	Receptor Toll-like 2
TLR4	Receptor Toll-like 4
TLRs	Receptor Toll-like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
U	Unidade
UV	Ultravioleta
v/v	volume/volume
Ω	Ohm

Lista de Figuras

- Figura 1** Resposta inflamatória de células fagocitárias, após ativação por *M.tuberculosis*.
- Figura 2** Esquema de microplaca pelo REMA.
- Figura 3** Esquema da placa de 6 poços para infecção de células THP-1 diferenciadas para macrófagos por *M.tuberculosis*.
- Figura 4** Microfotografia de *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP.
- Figura 5** Microplaca de 96 orifícios representando o CIM pelo REMA após adição de resazurina.
- Figura 6** Microfotografias de THP-1 diferenciadas em macrófagos após estimulação. Aumento de 10x. Microscópio de fluorescência.
- Figura 7** Microfotografia (campo escuro) de células THP-1 diferenciadas para macrófagos 1 hora após infecção por *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP.
- Figura 8** Microfotografia (campo escuro) de células THP-1 diferenciadas para macrófagos 1 hora após infecção por *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP.
- Figura 9** Média de bacilos fagocitados nos tempos 0h, 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. e 1h após infecção por *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP. Aumento de 400x, microscópio de fluorescência.
- Figura 10** Microfotografia de células THP-1 diferenciadas para macrófagos 1 hora após infecção por *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP. Aumento de 400x. Microscópio de fluorescência.
- Figura 11** Gel de integridade das amostras de RNA.

Lista de Tabelas

- Tabela 1** Sequências dos oligonucleotídeos e sondas.
- Tabela 2** Resultados do teste de sensibilidade para os isolados clínicos de *M.tuberculosis* recombinadas com a proteína verde fluorescente.
- Tabela 3** Frequência da distribuição de resistência dos isolados clínicos envolvidos no estudo.
- Tabela 4** Número de bacilos fagocitados após infecção de células THP-1 diferenciadas para macrófagos nos tempos 0h, 5 min., 10 min., 15 min., 30 min., 1h., por três diferentes isolados clínicos (2 resistentes e 1 sensível).
- Tabela 5** Valores dos RNAm.
- Tabela 6** Valores de inclinação da curva de eficiência dos ensaios da PCR em tempo real.
- Tabela 7** Variação da expressão de RNAm dos genes estudados. Mediana (25% - 75%).
- Tabela 8** Variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like quando comparando-se os resultados dos isolados clínicos.

1– Introdução

O controle da Tuberculose (TB) ainda continua sendo um grande desafio para o sistema de saúde pública (Zager, E.M. & McNerney, R., 2008). Com o desenvolvimento e o uso de antibióticos para o controle de doenças infecciosas, houve diminuição dos casos da doença, entretanto, devido à terapia inadequada, em algumas regiões ocorreu o surgimento de linhagens multi-drogas resistentes (Zager, E.M. & McNerney, R., 2008; Jiang, X., *et al.*, 2008).

Atualmente, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), um terço da população mundial é infectado assintomaticamente por *Mycobacterium tuberculosis* (*M.tuberculosis*). Ainda segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2008) o Brasil continua na lista dos 22 países que somam 80% dos casos mundiais da doença, apresentando aproximadamente 85 mil novos casos e entre 5-6 mil mortes em decorrência da doença. O Ministério da saúde estima prevalência de 50/100.000 casos/habitantes (SMS).

Na cidade de São Paulo, a Secretaria Municipal de Saúde (SMS) entre os anos de 1996 – 2006 houve uma diminuição de 50% de mortes causadas por TB, passando de 6,1 para 2,9 óbitos em 100 mil habitantes. Ainda segundo a SMS, o número de novos casos da doença, diminuiu.

Segundo Frieden, T.R., *et al.*, 2003, embora tenha tratamento, nos últimos 100 anos estima-se que a TB matou cerca de 100 milhões de pessoas.

O principal agente etiológico da TB é o *Mycobacterium tuberculosis* e foi identificado por Robert Kock em 1882. Pertence ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* em associação com *M.bovis*, *M.microti*, *M.africanum*, *M.canetti*, *M.pinnipedii* e *M.caprae* (Shinnick, T.M., & Good, R.C., 1994; Aranaz, A., *et al.*, 1999; Soolingen, D., *et al.*, 1997; Pfyffer, G.E., *et al.*, 1998, Cousins, D.V., *et al.*, 2003).

As micobactérias pertencem à família *Mycobacteriaceae*, sub-ordem *Corynebacteriaceae*, ordem *Actinomycetales*. O gênero *Mycobacterium* apresenta atualmente mais de 100 espécies identificadas (Shinnick, T.M., & Good, R.C., 1994).

As micobactérias apresentam-se como bacilos finos e retos (0,2-0,6 µm de largura por 1 – 10 µm de comprimento), consideradas aeróbias estritas, são imóveis e não formam esporos (Youmans, G.P., 1979).

A parede celular das micobactérias é constituída principalmente pelos ácidos micólicos que promovem uma barreira hidrofóbica, conferindo resistência à descoloração por álcool-ácido, aos diversos agentes químicos e antibióticos. Por esta propriedade, as micobactérias têm a capacidade de formar complexos coloridos com os compostos derivados do trifenilmetano (fucsina e auramina) que resistem à descoloração pelo etanol-ácido. Esta importante característica se deve à grande quantidade de lipídeos presentes em sua parede celular (Silva, C.H.R.M., 1999, Kolattukudy, P.E., *et al.*, 1997; Yuan, Y., *et al.*, 1998).

Os estudos epidemiológicos foram responsáveis pelo conhecimento da doença, como também os estudos realizados em animais e a observação clínica.

O pulmão é a principal porta de entrada para vários patógenos, incluindo *M.tuberculosis* (Wong, K.C., *et al.*, 2007). Segundo van Crevel, R., *et al.*, 2002 existem quatro fases na tuberculose pulmonar. A primeira começa com a inalação do bacilo. Macrófagos alveolares fagocitam a micobactéria, podendo eliminar a infecção, o que vai depender da capacidade de fatores intrínsecos do hospedeiro durante a fagocitose e os fatores de virulência da bactéria.

Inicia-se então uma cascata de eventos resultando na diminuição da carga de bacilos, na maioria dos casos (cerca de 90%), mas em indivíduos com o sistema imune debilitado, a TB pode progredir (Frieden, T.R., *et al.*, 2003). A infecção ocorre em aproximadamente um terço dos indivíduos expostos ao bacilo da tuberculose, e destes, apenas 10% tornam-se sintomáticos (Mathema, B., *et al.*, 2006). O estabelecimento da infecção depende da habilidade do microorganismo em invadir o espaço alveolar e sobreviver no interior dos macrófagos (Giacomini, E., *et al.*, 2001).

Micobactérias que conseguem escapar do sistema imune multiplicam-se, nos macrófagos, atraindo monócitos e outras células do sistema imune ao pulmão, dando início a segunda fase, onde as micobactérias crescem em fase logarítmica, com

poucos danos teciduais e formação de tubérculos. Duas a três semanas após o início da infecção, linfócitos T desenvolvem-se com antígenos específicos e migram até o local da lesão ativam os macrófagos para matar as micobactérias intracelulares (van Crevel, R., *et al*, 2002).

À medida que a quantidade de bacilos aumenta, atrai novas células de defesa e desencadeiam resposta imunológica celular específica, que será crítica para impedir o avanço do processo infeccioso. Contudo, alguns bacilos escapam e disseminam-se através dos vasos linfáticos e sanguíneos podendo atingir, virtualmente, qualquer tecido ou órgão (Ferraz, J.C., *et al.*, 2006).

A eliminação do bacilo depende do sucesso da interação entre macrófagos infectados e linfócitos T. Como em imunodeficiências adquiridas, especialmente na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), a tuberculose demonstrou a importância de uma imunidade celular. Células T CD4 exercem seu efeito protetor através da produção de citocinas, principalmente interferon γ (IFN- γ), depois de estimuladas pelas micobactérias (van Crevel, R., *et al*, 2002).

Nesta fase da infecção, conhecida como *tuberculose primária*, os indivíduos acometidos geralmente não apresentam qualquer alteração clínica. Menos comumente, os mecanismos de defesa iniciais podem não ser inteiramente eficazes e possibilitar o avanço do foco pulmonar primário, que aumenta progressivamente, sofre necrose central e pode disseminar-se pelo restante dos pulmões (*broncopneumonia*) e para a cavidade pleural que envolve os pulmões (*tuberculose pulmonar primária progressiva*). Estes indivíduos, que constituem a minoria dos infectados, apresentam manifestações precoces como febre alta, prostração intensa, sudorese noturna e tosse (Ferraz, J.C., *et al.*, 2006).

Na maioria dos infectados a resposta imune celular específica é geralmente capaz de deter o agente infeccioso, no entanto, alguns bacilos persistem viáveis num estado de latência, multiplicando-se muito lentamente (terceira fase) (van Crevel, R., *et al*, 2002).

A persistência destes focos latentes na maioria dos pacientes infectados (cerca de 90%) permanece assintomática pelo resto da vida. Em alguns casos, estes focos latentes podem ser reativados, meses ou anos após a infecção primária, ocorrendo novamente multiplicação rápida da bactéria, o que resulta em manifestações clínicas da doença (*tuberculose pós-primária* – quarta fase). O período entre o contato inicial e as manifestações clínicas da doença é, em geral, prolongado (meses, anos). No primeiro ano após a infecção cerca de 3 a 4% dos indivíduos adoecem (Ferraz, J.C., et al., 2006).

A Tuberculose pode estar associada a outras doenças, além do HIV, como por exemplo, diabetes mellitus não controlada, falência renal e também em pacientes submetidos à quimioterapia e mal nutridos (Mathema, B., et al., 2006).

Quando o sistema imune do hospedeiro não elimina a infecção na fase inicial, a doença ativa ocorre. Isto é mais comum em crianças abaixo de 5 anos e em adultos com imunossupressão. Embora uma efetiva resposta imune consiga controlar a doença na fase inicial, na maioria dos casos, alguns fatores contribuem para a reativação ou persistência da TB. O HIV é o maior risco de progressão da tuberculose em adultos. Outras condições podem comprometer o sistema imune predispondo o seu desenvolvimento, como alcoolismo, diabetes mellitus, falência renal, quimioterapias, terapias com cortisol, desnutrição, falta de vitaminas A ou D, a não produção de IFN- γ e de seu receptor, fator de necrose tumoral – α (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12) (Frieden, T.R., et al., 2003).

A função mais importante do macrófago é como seu próprio nome diz englobar macromoléculas complexas. Entretanto este processo é diferente entre as células fagocitárias, mas macrófagos presentes nos tecidos são os que demonstram maior plasticidade (Rohde, K., et al., 2007).

A fagocitose de *M.tuberculosis* pelos macrófagos alveolares é o primeiro evento que ocorre entre o hospedeiro e o patógeno e também regula a homeostase (RAJA, 2004), no entanto, em infecções por *M.tuberculosis*, o bacilo desenvolve meios apropriados para se proteger desse sistema de defesa. A lipoarabinomanana (LAM), uma glicoproteína de superfície presente na parede celular da micobactéria,

interage com os receptores de manose nos macrófagos e inibe os compostos intermediários de formas reativas do oxigênio, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (Aderem, A. & Underhill, D.M., 1999).

Os macrófagos possuem receptores, como Toll-like receptors (TLRs) e outros receptores capazes de reconhecer e induzir resposta primária contra os microorganismos fagocitados (Rohde, K., *et al.*, 2007).

A estimulação dos TLRs é o primeiro passo para a transição do macrófago para célula efetora do sistema imune. Macrófagos ativados expressam TLRs, TNF- α e interleucinas (Rohde, K., *et al.*, 2007).

TLRs são receptores conservados durante a evolução e são mediadores da imunidade inata, essenciais para o reconhecimento microbiano. Atualmente são reconhecidos 10 TLRs, desses, TLR2, TLR4 e TLR9 parecem ser responsáveis pelo reconhecimento do peptídioglicano, endotoxinas e DNA bacteriano, respectivamente (Hajjar, A. M., *et al.*, 2001).

Através dos TLRs a célula infectada por *M.tuberculosis* produz IL-12, citocina pró-inflamatória, o que aumenta a expressão desses receptores na membrana celular dos macrófagos (Wang, T., *et al.*, 2000).

Estudos “*in vitro*”, demonstraram que TLRs desempenham um papel importante no reconhecimento micobacteriano, e isto também é válido para os humanos (Thoma-Uszynski, S., *et al.*, 2001).

Atualmente é conhecida a localização cromossômica de cada TLR de mamíferos, com exceção ao TLR10. Os genes de TLR2, TLR4 e TLR9 estão nos cromossomos 4, 9 e 3, respectivamente (Quresh, S.T. & Medzhitov, R., 2003).

Segundo Qureshi & Medzhitov, 2003, a linhagem THP-1 durante a exposição à bactérias vivas, alterou os níveis de citocinas e mRNA. Durante a incubação de *Escherichia coli* (*E.coli*) com sangue humano, houve um aumento da expressão de TLR3 e TLR7 ao passo que diminuiu a expressão de TLR1, TLR6 e TLR9.

Ligantes microbianos, lipopolissacarídeos e lipoproteínas bacterianas quando reconhecidas pelos TLRs, facilitam a translocação do NF- κ B até o núcleo do macrófago o que resulta na transcrição de genes com função imunorregulatório, incluindo as citocinas **Figura 1** (Röllinghoff, M. & Stenger, S., 2001).

Figura 1: Resposta inflamatória de células fagocitárias, macrófagos e células dendríticas, após ativação por *M.tuberculosis* (van Crevel et al, 2002).

É conhecido que durante o reconhecimento de *M.tuberculosis* pelas células do sistema imune ocorre à ativação e produção de citocinas que desempenham um papel crucial na resposta inflamatória (van Crevel, R., et al, 2002).

Citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α induzem a resposta imune inata quando a bactéria é detectada. Ocorre dano no tecido e aumenta o recrutamento de células de defesa do organismo para o local da infecção (Koul, A., et al., 2004).

TNF- α é produzido pelos monócitos/macrófagos e células dendríticas. Desempenha um papel fundamental na formação do granuloma, induz a ativação de macrófagos e tem propriedades imunorregulatórias. Em pacientes com TB, a sua expressão é alta no local da infecção (van Crevel, R., et al, 2002).

IL-1 β (interleucina 1 β) também é produzida por monócitos/macrófagos e células dendríticas. Está envolvida na resposta imune durante a infecção por *M.tuberculosis*. Em pacientes com TB é expressa em excesso no local da inflamação (van Crevel, R., *et al*, 2002).

IL-6 possui propriedades pró e anti-inflamatórias, é produzido precocemente durante a infecção micobacteriana. Pode ser prejudicial, pois inibe a produção de TNF- α e IL-1 β (van Crevel, R., *et al*, 2002). Segundo (Ladel, C. H., *et al.*, 1997) ratos com deficiência desta interleucina, demonstram um aumento na susceptibilidade à infecção por *M.tuberculosis*, o que parece estar relacionado com a produção de IFN- γ no início da infecção.

Segundo Chacón-Salinas *et al.*, 2005, camundongos infectados com cepas conhecidas, CDC1551 (menos virulentas), aumentam os níveis de TNF- α , IFN- γ , IL-12 e IL-6 quando comparado com camundongos infectados com a cepa padrão H37Rv (sensível).

Em camundongos cepas de diferentes genótipos demonstraram comportamentos diferentes. *M.canetti* induz elevada mortalidade em pouco tempo de infecção. A cepa Beijing aumenta a expressão de TNF- α durante um curto período de tempo, o que não ocorre com *M.canetti*, onde o tempo de expressão de TNF- α é maior (Chacón-Salinas *et al.*, 2005).

Embora estudos em modelos animais, como camundongos sejam mais eficazes, a caracterização da infecção por *M.tuberculosis* e a sua capacidade de sobreviver em macrófagos é essencial para determinar a virulência e a patogenicidade da bactéria (Wong, K.C., *et al.*, 2007).

Para estudos dos primeiros estágios da tuberculose, macrófagos humanos são usados, pois mimetizam a infecção. Macrófagos ativados na presença de células T e citocinas tornam-se eficazes na eliminação das bactérias. Entretanto, diferentes cepas de *M.tuberculosis* podem estar envolvidas em mecanismos que interferem na ação das células de defesa do organismo, permitindo seu crescimento e sobrevivência nos macrófagos (Wong, K.C., *et al.*, 2007).

Um problema no controle da tuberculose são as linhagens que não podem ser eliminadas com os fármacos de primeira linha no tratamento da doença (Isoniazida e Rifampicina). Estas linhagens (denominadas multi-droga resistente MDR-TB) são resultantes de mutações decorrentes de uma quimioterapia inadequada (Zager, E.M. & McNerney, R., 2008).

Outras vias de transmissão da micobactéria são incomuns, porém não podem ser desconsideradas e entre esses mecanismos de infecção estão as vias congênita, ferimentos ou através do ato sexual (Angus *et al.*, 2001).

Em nosso laboratório temos estudado resistência micobacteriana avaliando novas técnicas ou genes relacionados. CAMPOS, 2001, avaliou a resistência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* à R (rifampicina) e correlacionou com o gene *rpoβ*. Optimizando o teste de MIC (concentração inibitória mínima) com o fago D29 em microplacas.

Cardoso, R., 2003, avaliou mutações relacionadas à resistência a isoniazida (H) e concluiu que, nos isolados de *M.tuberculosis* de origem brasileira, a maioria apresentaram mutações no gene *KatG*, e um pequeno número de isolados com alterações nos genes *inhA* e região intergênica *oxiR-ahpC*. Neste mesmo estudo, observaram-se 26 novas mutações no gene *KatG* até então não descritas, verificaram também que mutações no gene *KasA* estavam presentes tanto em isolados de *M.tuberculosis* resistentes quanto nos sensíveis à H. (Cardoso, R., *et al.*, 2004).

Barco, P., *et al*, 2006, estudaram por sequenciamento mutações do gene *pncA* em 36 isolados clínicos de *M.tuberculosis* e genotipou com resistência testadas através da técnica de MIC (Blokpoel, M.C., *et al.*, 2003). Destas, 31 amostras apresentaram pelo menos uma mutação para o gene estudado (*pncA*). Das 31 amostras, 20 tinham novas mutações para o gene *pncA* sendo 17 substituições, 2 inserções e 1 deleção, as quais não tinham sido descritas em estudos anteriores para o mesmo gene (Barco, P., *et al.*, 2006).

Carbone, P.H.L., 2006 estudou o desenvolvimento de um fago lítico com promotor Hsp70 e gene da *GFP* pra uso em testes de susceptibilidade a drogas para

o *Mycobacterium* sp com o objetivo de avaliar a atividade lítica do fago recombinado D29 e a expressão da proteína verde gfp como indicador.

Cecon, L., 2008 tem por objetivo avaliar a existência e a frequência de mutações específicas do gene *NAT* e sua influência na resistência à H e na atividade da enzima nat em cepas de *M.tuberculosis*.

O gene *GFP* tem sido usado em estudos de infecção por *M.tuberculosis* como marcador fluorescente (Gangopadhyay, J.P., *et al.*, 2003; Changsen, C., *et al.*, 2003), em expressão gênica (Blokpoel, M.C., *et al.*, 2003; O'toole, R., *et al.*, 2003; Purkayastha, A., *et al.*, 2002; Sampson, S.L., *et al.*, 2001; Tullius, M.V., *et al.*, 2001; Jensen-Cain, D.M., *et al.*, 2001), em estudo de cultura micobacteriana e resistência ao quimioterápicos (Castro-Garza, J., *et al.*, 2002; Master, S., *et al.*, 2001). No presente estudo o gene da proteína verde fluorescente foi utilizado como marcador de infecção micobacteriana nas células THP-1 diferenciadas em macrófagos após estimulação.

Infelizmente, os fatores de resistência do *M.tuberculosis* ainda são desconhecidos tornando a bactéria mais complicada de ser avaliada. O conhecimento obtido nos últimos 100 anos não permitiu o completo entendimento do mecanismo de virulência (Smith, I., 2003).

Embora a descoberta de Robert Koch tenha ocorrido em 1882 e da quimioterapia eficaz nos últimos 50 anos, a TB continua sendo um grave problema de saúde mundial, com altas taxas de mortalidade e morbidade. A incidência da doença tem caído em países desenvolvidos, mas o mesmo não acontece nos subdesenvolvidos ou nos países em desenvolvimento, que somam mais de 90% dos casos da doença no mundo (Mathema, B., *et al.*, 2006). Embora muito se saiba a respeito da sua epidemiologia, ainda é pouco conhecido os seus fatores de virulência e apenas recentemente estudos começaram a ser feitos em humanos para avaliar e entender a resposta imune à TB. Em estudos feitos em animais, descobriu-se que durante a infecção, ocorre resposta imune celular predominantemente por linfócitos T e macrófagos, além da participação de citocinas. Entretanto estudos “*in vivo*” em humanos ainda não foram suficientes (POVEDA, F., *et al.*, 1999).

2 – Objetivo

Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão das principais citocinas pró-inflamatórias e TLRs envolvidas na resposta imune celular durante a infecção por diferentes isolados clínicos de *M. tuberculosis* com o gene *GFP* e o promotor da Acetamidase em linhagens de células de monócitos que foram transformadas em macrófagos. As micobactérias foram genotipicamente identificadas e classificadas de acordo com o perfil de resistência aos fármacos utilizados no tratamento da doença.

Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α*) em modelos *in vitro* de infecção de macrófagos com isolados clínicos com perfil de resistência de um a 4 quimioterápicos.
- Avaliar pela PCR em tempo real a expressão de TLR2 e TLR4 e sua associação com a expressão das citocinas pró-inflamatórias em modelos *in vitro* de infecção de macrófagos com diferentes isolados clínicos com perfil de resistência de um a 4 quimioterápicos.
- Estudar a possível relação entre a expressão das diversas citocinas e TLR com a virulência de isolados clínicos de *M. tuberculosis* utilizando modelos *in vitro* de infecção de macrófagos com diferentes isolados clínicos com perfil de resistência de um a 4 quimioterápicos.

3 – Material e Métodos

3.1 – Isolados clínicos de *M. tuberculosis*

A partir de resultados obtidos por Carbone, P.H.L., 2007, 30 isolados clínicos mais dois controles da resistência (H37Rv e o controle resistente) foram selecionados para dar início ao trabalho. Destes isolados caracterizados fenotipicamente (CIM) e genotipicamente (PRA, MIRU) 5 isolados clínicos foram selecionados para a análise da expressão gênica e contagem de bacilos fagocitados.

3.2 – Preparação de *E.coli* DH5α

O plasmideo pFPCAGFP, contendo o gene da proteína verde fluorescente, gentilmente cedido pelo Dr. Scott Franzblum – Universidade de Chicago, foi expandido em *E.coli* linhagem DH5α e posteriormente transfectado nos isolados clínicos de *M. tuberculosis*.

A cepa de *E.coli* DH5α foi semeada em meio LB Agar (triptona 10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1mL; agar 15 g; água destilada qsp 1000 mL BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA), em placa de Petri e incubada em estufa (Fanem® São Paulo, Brasil) por 16 horas a 37° C, para obtenção de colônias isoladas.

Uma colônia isolada foi transferida para um frasco contendo 50 mL de LB líquido (triptona 10 g; de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; água destilada qsp 1000 mL; BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA) sem antibiótico e incubada em agitação constante (250 ciclos/min) (TECNAL®, Piracicaba, Brasil) a 37°C, até a obtenção do crescimento exponencial ($D.O_{600}$ nm de 0,6 = aproximadamente 6 horas).

O preparo de *E.coli* DH5α competente foi feito segundo protocolo descrito por SAMBROOK & RUSSEL, 2001: o frasco contendo 50 mL de meio LB líquido (triptona 10 g; de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; água destilada qsp 1000 mL; BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA) foi incubado em banho de gelo por 10 minutos e em seguida, centrifugado (Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Germany) a 4.000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas

em 5 mL de solução de CaCl_2 0,1M gelada. Foram realizadas mais duas lavagens cuidadosamente, com a mesma solução e com procedimento de centrifugação.

As células bacterianas foram ressuspensas em 2 mL de solução de CaCl_2 0,1M gelado estocadas em criotubos contendo alíquotas de 100 μL acrescentando 70 μL de dimetilsulfóxido (DMSO) e imediatamente levado ao nitrogênio líquido até o momento de seu uso.

3.3 – Transformação de *E.coli* DH5 α

Uma alíquota de 100 μL foi descongelada em banho de gelo durante 15 minutos e em seguida transferida para um tubo Falcon de 15 mL (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Adicionou-se 2 μL do plasmídeo à alíquota de *E.coli* DH5 α e o frasco foram novamente deixados em banho de gelo por 30 minutos. Esta suspensão foi incubada a 42°C no termobloco (TECHNE, DRI-BLOCK®, Cambridge, Inglaterra) por 1,5 minutos e imediatamente levada ao banho de gelo por mais 5 minutos. Um mL do meio SOC (triptona 2 g; extrato de levedura 0,5 g; NaCl 0,05; e água destilada qsp 100 mL; BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA) com a adição de 10 μL de MgCl_2 1M e 20 μL de glicose 1M, foi acrescentado ao tubo Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

Esta suspensão foi incubada por 30 minutos a 37°C (FANEM®, modelo 102, São Paulo, Brasil) sem agitação e a seguir por 60 minutos a 37°C com agitação constante. Foram semeados 100 μL em meio LB Agar (triptona 10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; Agar 15 g; água destilada qsp 1000 mL; BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) e incubados a 37°C durante 16 horas (NOVA ÉTICA, São Paulo, Brasil).

Colônias isoladas foram selecionadas e semeadas em 5 mL de meio LB líquido (triptona 10 g; extrato de levedura 5 g; NaCl 5 g; NaOH 1N 1 mL; água destilada qsp 1000 mL; BBL, Franklin Lakes, NJ, EUA) com 10 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO, EUA) a 37°C durante 16 horas em agitação constante (TECNAL®, Piracicaba, Brasil).

O DNA plasmidial foi extraído com o kit DNA plasmidial Qiaprep (QIAGEN, Strasse, Hilden, Germany), segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

Este plasmídeo foi inserido em amostras micobacterianas, através da técnica de eletroporação, descrita no item **3.5**.

3.4 – Amostras micobacterianas

Todos os isolados clínicos de micobactérias deste estudo e da nossa micobacterioteca foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira (ICF – São Paulo) sobre a direção do Dr Fernando Fuiza de Melo.

Todos os isolados foram avaliados através do teste de CIM, onde se estudou a resistência e sensibilidade a quatro fármacos utilizados no tratamento contra tuberculose (H – isoniazida; R – rifampicina; S – estreptomicina; E – etambutol).

Aproximadamente 150 isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* foram analisados pelo REMA (PALOMINO *et al.*, 2002). Foram caracterizados genotipicamente através de técnicas moleculares para identificação da espécie micobacteriana [Reação em cadeia da polimerase – PCR, para amplificação da seqüência de inserção IS6110 (van EMBDEN *et al.*, 1993), PRA (“PCR-Restriction Enzyme Analysis”) para amplificação e posterior digestão do fragmento do gene *hsp65* (TELENTI *et al.*, 1993) e MIRU (“Mycobacterial Interspersed Repetitive Units”) (SUPPLY *et al.*, 2000)], pelo Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Campus de Araraquara (FCFAR – UNESP) sobre a coordenação da Profa. Titular. Clarice Queico Fujimura Leite.

3.4.1 – Cultivo dos isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

Todos os isolados clínicos foram cultivados em meio L-J (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) a 37°C durante 30 dias aproximadamente. Estes isolados fazem parte da micobacterioteca pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências

Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP). Estes estão estocados em criotubos (Axygen, Union City, CA, EUA) com miçangas em seu interior, onde foi adicionado 1 mL do meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e congelados a -80°C (Forma Scientific, Ohio, EUA).

3.4.2 – Isolamento e cultura de micobactérias

A descontaminação do escarro foi feita através do método de Petroff (Petroff, 1915) no Laboratório de Micobactérias do Instituto Clemente Ferreira (ICF – SP).

3.5 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação do MIC para os isolados clínicos do *Mycobacterium* sp foi realizada pelo REMA utilizando a resazurina (SIGMA-AKDRICH Inc., St Louis, MO, EUA) que é um indicador de oxido-redução (PALOMINO *et al.*, 2002).

3.5.1 – Preparo das suspensões micobacterianas

As micobactérias foram preparadas dispensando-se uma alçada da amostra que estava em crescimento no meio L-J (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) em tubos de vidros de 16x15 mm, com tampa de rosca, contendo pérolas de vidro estéreis em 2 mL de água destilada estéril. Após homogeneização em agitador mecânico, 200 µL dessa mistura foram transferidas para um tubo contendo 2 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA).

Estas culturas foram incubadas em estufa (Fanem® São Paulo, Brasil) a 37°C durante 8 a 10 dias e a comparação visual da turvação (crescimento bacteriano) com a escala de McFarland nº1 (o que equivale a aproximadamente 3×10^8 bactérias/mL).

Quando o crescimento micobacteriano apresentou maior turvação que a escala de McFarland nº1 as culturas foram diluídas utilizando-se o meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology

Systems, Sparks, MD, EUA). Quando a turvação foi menor ao ser comparada com a escala de McFarland nº1 foram realizados repiques em novo meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA). Dessa forma, a cultura utilizada para a determinação do MIC apresentou-se em fase logarítmica de crescimento.

Uma vez padronizada a suspensão micobacteriana, realizou-se uma diluição na proporção 1:25 em meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) para em seguida fazer a sementeira em microplacas de 96 poços (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA). Todos os procedimentos foram realizados em fluxo laminar apropriado (classe II B2) dentro do Laboratório de Biossegurança Nível 3 que é anexo ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF – USP).

A **Figura 2** demonstra o esquema de diluição dos fármacos, bem como suas concentrações. Cada placa foi utilizada para o teste em dois isolados clínicos. Como controle de sensibilidade e resistência, foi utilizada a cepa H37Rv e uma cepa padrão representada apenas por CR (controle resistente aos quatro fármacos), respectivamente.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	H2O	H	R	S	E	Cont. meio	H	R	S	E	Cont. meio	H2O
B	H2O	1ug/mL	1ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	Cont. meio	1ug/mL	1ug/mL	8 ug/mL	16 ug/mL	Cont. meio	H2O
C	H2O	0,5 ug/mL	0,5 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	Cont. meio	0,5 ug/mL	0,5 ug/mL	4 ug/mL	8 ug/mL	Cont. meio	H2O
D	H2O	0,25 ug/mL	0,25 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	Cont. meio	0,25 ug/mL	0,25 ug/mL	2 ug/mL	4 ug/mL	Cont. meio	H2O
E	H2O	0,125 ug/mL	0,125 ug/mL	1ug/mL	2 ug/mL	Cont. bact.	0,125 ug/mL	0,125 ug/mL	1ug/mL	2 ug/mL	Cont. bact.	H2O
F	H2O	0,06 ug/mL	0,06 ug/mL	0,5ug/mL	1ug/mL	Cont. bact.	0,06 ug/mL	0,06 ug/mL	0,5ug/mL	1ug/mL	Cont. bact.	H2O
G	H2O	0,03 ug/mL	0,03 ug/mL	0,25 ug/mL	0,5ug/mL	Cont. bact.	0,03 ug/mL	0,03 ug/mL	0,25 ug/mL	0,5ug/mL	Cont. bact.	H2O
H	H2O	0,015 ug/mL	0,015 ug/mL	0,125 ug/mL	0,25 ug/mL	Cont. bact.	0,015 ug/mL	0,015 ug/mL	0,125 ug/mL	0,25 ug/mL	Cont. bact.	H2O

Figura 2: esquema de uma placa onde é feito o MIC; H – isoniazida, R – rifampicina, S – estreptomicina, E – etambutol; e as respectivas concentrações em forma decrescente da linha B para a H.

3.6 – Eletroporação de Micobactérias

A eletroporação foi feita segundo metodologia descrita por COOKSEY *et al.*, 1993, com algumas modificações.

Isolados clínicos de *M.tuberculosis* de cada perfil de resistência pertencentes a nossa micobacteriotéca foram cultivadas em meio Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) durante aproximadamente *Mycobacterium tuberculosis* durante 21 dias a 37°C em agitação constante.

A suspensão foi centrifugada (Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Germany) por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet lavado duas vezes em 1,5 mL de glicerol 10% gelado. Em seguida as células foram ressuspensas em 50 µL da mesma solução. O plasmídeo pFPCAGFP (5 µg do plasmídeo em 5 µL de água) foi adicionado à suspensão e em seguida transferido para uma cubeta de eletroporação.

Foi utilizado para a eletroporação o equipamento Gene Pulser apparatus BioRad (BioRad, Hercules CA, EUA) nas condições 2.5kV e 129Ω para inserir o plasmídeo pFPCAGFP de interesse nos isolados clínicos.

A suspensão foi transferida novamente para um tubo Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), contendo 5 mL de meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA), sem antibiótico e deixado a 37°C durante 24 horas em agitação constante.

Após este período, as culturas de *M.tuberculosis* foram centrifugadas (Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Germany) por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 200 µL do mesmo meio de cultivo e plaqueados em Middlebrook 7H10 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA), contendo 10 µg/mL de kanamicina (Sigma ALDRICH, St Louis, MO, EUA). Estas foram então incubadas por aproximadamente 21 dias para os isolados clínicos de *M.tuberculosis*. Colônias

isoladas foram transferidas para tubos Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA), contendo 5 mL de meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA), contendo 10 µg/mL de kanamicina (Sigma ALDRICH, St Louis, MO, EUA), para manter o crescimento de *M.tuberculosis* contendo o plasmídeo de interesse neste estudo.

3.6.1 – Preservação de isolados clínicos eletroporados com pFPCAGFP

Os isolados clínicos de *M. tuberculosis* que foram transfectados com o plasmídeo de interesse, estão preservados em meio L-J (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e também em criotubos (Axygen, Union City, CA, EUA) com miçangas em seu interior. O meio de preservação dos isolados é o meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e 10 µg/mL de kanamicina (Sigma ALDRICH, St Louis, MO, EUA). Estes isolados estão congelados a -80°C (Forma Scientific, Ohio, EUA).

3.7 – Cultura de células

A linhagem humana de promonócito (THP-1) foi obtida no Laboratório de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) sobre a coordenação do Prof. Titular Rui Curi.

3.7.1 – Descongelamento de células

A suspensão de THP-1 estocadas em criotubos (Axygen, Union City, CA, EUA) foi retirada do nitrogênio líquido e deixada descongelando a 37°C por 15 minutos em banho de água (Fanem® São Paulo, Brasil).

Em seguida o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e completado para 5 mL com o meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA) e centrifugado a 4°C por 10min a

1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1 mL do mesmo meio e transferido para a garrafa de cultura de células (Corning, Acton, MA, EUA) e completado para 5 mL de meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA).

Esta garrafa foi levada à incubadora de CO₂ (Sanyo, Osaka, Japão) a 37°C com 5% de CO₂.

É bem conhecido na literatura que células desta linhagem comportam-se como macrófagos humanos derivados dos monócitos (Dhiman, R., *et al.*, 2007).

3.7.2 – Cultura de células

In vitro, as células THP-1 se desenvolvem em suspensão e foram cultivadas em garrafas estéreis (Corning, Acton, MA, EUA) com 20 mL de meio de cultura RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA), com adição de Gentamicina 40 mg/mL (Schering Plough, New Jersey, USA), para evitar a contaminação do meio durante a manipulação. A cultura foi mantida em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) sob atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C.

Os repiques foram realizados a cada 2 dias, onde 18 mL de meio eram substituídos por novos 18 mL de RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA), mantendo assim a cultura em ambiente favorável ao seu crescimento, seguindo a rotina do laboratório.

3.7.3 – Congelamento de células

Após duas semanas de cultivo, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer, em seguida centrifugada a 1200 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspensionado em volume suficiente para ser estocado em alíquotas de 1 mL de meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal

bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA) suplementado com dimetilsulfóxido (DMSO), tendo 1×10^6 células/mL e imediatamente levadas ao freezer -80°C por 24 horas e em seguida transferidas para nitrogênio líquido.

3.7.4 – Diferenciação de células

Após o tempo de cultura, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e repicadas em placas com 6 poços. O experimento começou com 1×10^6 células/mL e deixadas em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) sob atmosfera contendo 5% de CO_2 a 37°C por 24 horas para a total adaptação ao novo meio.

Para a diferenciação celular, foi acrescentado Acetado de Forbol Miristato (PMA, Sigma-Aldrich St. Louis, USA) na concentração de 10 nM/mL e as placas contendo as células foram mantidas em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) sob atmosfera contendo 5% de CO_2 a 37°C durante mais 24 horas.

Após este período as células foram usadas para o experimento, como descrito no item **3.8**.

3.8 – Infecção das células por *M. tuberculosis*

A infecção das células foi feita de acordo com metodologia descrita por Stokes, R.W., *et al.*, 2004.

Os isolados clínicos de *M.tuberculosis* foram cultivados em meio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e 10 µg/mL de kanamicina (Sigma ALDRICH, St Louis, MO, EUA) a 37°C por 8 a 10 dias e a comparação visual da turvação (crescimento bacteriano) com a escala de Mcfarland nº1 (o que equivale a aproximadamente 3×10^8 bactérias/mL). As amostras foram centrifugadas 13.000 rpm durante 10 minutos a 4°C , o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 600 µL de meio de cultura meio RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10 mM de piruvato de sódio – Gibco – Carlsbad, CA, EUA).

A **Figura 3** demonstra o esquema de infecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos pelos isolados clínicos de *M.tuberculosis*.

O experimento foi feito em triplicada em placas de 6 poços. Em cada poço foi acrescentado 1×10^6 células/mL e deixadas por 24 horas a 37°C em ambiente de 5%CO₂. Após este período, em uma das placas, foi acrescentado 10 nM de PMA e uma lamínula em cada poço, nas outras duas, somente 10 nM de PMA e novamente deixadas por 24 horas a 37°C em ambiente de 5%CO₂, para diferenciação celular.

A infecção foi feita com a adição de 3×10^8 bactérias/mL em cada poço. Na placa onde foi acrescentando lamínula, as amostras foram colhidas em 0h, 5 min., 10 min., 15 min., 30 min., 1h após a infecção, fixadas em lâminas e 10 células foram analisadas, em microscópio de fluorescência.

Nas duas placas restantes, foram acrescentadas 3×10^8 bactérias/mL em cada poço e as amostras colhidas em 0, 1h, 2h, 4h, 12h, 24h após a infecção. O cDNA feito a partir do RNA extraído e analisado por PCR em Tempo Real.

Figura 3: Esquema de infecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos pelos isolados clínicos de *M.tuberculosis*.

As amostras foram colhidas e o RNA extraído segundo protocolo descrito no item 3.9.1.

3.9 – Extração de RNA

O RNA das células foi extraído com RNase Plus Mini Kit (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante. Este RNA foi mantido em freezer -80°C até o momento de seu uso.

O grau de pureza das amostras foi medido em NanoDrop (A260/A280) (ND-3300, NanoDrop Technologies, EUA) e a análise feita em gel de agarose a 1%, 100 V a 60 mΩ durante 30 minutos.

A expressão de RNAm dos genes listados na **Tabela 1**, juntamente com a expressão do gene gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPD), como referência endógena, foi medida por transcrição reversa (RT) seguida de PCR em tempo real. O cDNA foi gerado a partir de 600 ng de RNA, utilizando-se 200 ng de iniciadores aleatórios (*Random Primers*) (Invitrogen, Califórnia, EUA), ditiotretol (DTT) a 10

mmoles/L (Invitrogen, CA, EUA), dNTPs a 500 μ moles/L (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200 U de transcriptase reversa (SuperScript™ II Reverse Transcriptase RNase H⁻) e tampão de RT [Tris-HCl a 250 mmoles/L (pH=8,3), KCl a 375 mmoles/L e MgCl₂ 15 mmoles/L] (Invitrogen, CA, EUA). O ensaio de RT foi realizado em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA), com as seguintes etapas: 25°C por 10 min, 42°C por 50 min, e 70°C por 15 min. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

A medida quantitativa da expressão do RNAm de *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *TLR2* e *TLR4* foi realizada por PCR em tempo real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan*® PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O sinal de fluorescência emitido pelo fluoróforo da sonda *TaqMan*® foi detectado em tempo real. A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene *GAPD* como referência endógena.

Para os ensaios de PCR em tempo real, os cDNAs dos genes foram amplificados por PCR individual e realizados no termociclador ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

O programa de PCR em tempo real utilizado foi constituído de: (1) um ciclo 2 min a 50°C, (ativação da UNG); (2) um ciclo de 10 min a 95°C (inativação da UNG); (3) 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os dados foram analisados utilizando-se o programa Sequence Detection Software v 1.2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) que gera curvas semi-logarítmicas dos sinais de amplificação.

A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios foi otimizada a partir de uma curva-padrão, realizada com diferentes concentrações de amostra de cDNA. A curva-padrão permite avaliar a linearidade da amplificação bem como a eficiência da mesma. Segundo LIVAK E SCHMITTGEN (2001), para uma reação de PCR em tempo real ter eficiência de 100%, a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próxima de -3,3. A eficiência de cada ensaio foi considerada adequada para valores acima de 90%.

A eficiência da reação foi calculada de acordo com a inclinação da curva gerada pela seguinte fórmula: $E = 10^{-1/\alpha} - 1 \times 100$, onde α é a inclinação da curva (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 1: Oligonucleotídeos e sondas que foram utilizados nos experimentos de expressão, pelo sistema *TaqMan*® *RT-PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Gene	Seqüência	Tamanho
GAPD	5'GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA3' 5'CTGGAAGATGGTGATGGGATTTTC3' 5'VIC CATGGCACCGTCAAGGCTGAGAACG TAMRA3'	229 pb
TNF- α	5'CCTGCCCCAATCCCTTTATT3' 5'CCAATTCTCTTTTTGAGCCAGAA3' 5'FAM CCCCTCCTTCAGACACCCTCAACC TAMRA3'	71 pb
IL-6	5'CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA3' GGCGCTTGTGGAGAAGGA3' 5'FAM CGCCTCCAGGAGCCCAGCTATAG TAMRA3'	68 pb
IL-1 β	5'GCACGATGCACCTGTACGAT3' AGACATCACCCAAGCTTTTTTGCT3' 5'FAM ACTGAACTGCACGCTCCGGGACTC TAMRA3'	70 pb
TLR-2	5'CCCTGGGCAGTCTTGAACATT3' CCCTAGGGTTTTGTAAAGATTTC3' 5'FAM TTTATCGTCTTCTGGTTCAAGCCCCTTTC TAMRA3'	128 pb
TLR-4	5'AGCGAGCCACGCATTAC3' 5'GCCATGGCTGGGATCAGA3' 5'FAM ATGTCTGCCTCGCGCCTGGC TAMRA3'	107 pb

3.10 – Análises Estatísticas

Os valores de expressão foram transformados em log para fazer os testes paramétricos. Para comparar os valores de expressão gênica entre os diferentes isolados clínicos foram utilizados Wilcoxon Signed Rank Test e Teste t.

Os programas utilizados nas análises estatísticas foram SigmaStat para Windows, versão 1,0, Sigma Chemical, Co., (St Louis, MO, EUA) e apresentados na forma gráfica com utilização do *Software Prism* (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO, EUA).

4 – Resultados

4.1 – *M.tuberculosis* transfectadas com o plasmideo pFPCAGFP

O plasmideo pFPCAGFP possui o gene da proteína verde fluorescente (*GFP*) com o promotor da Acetamidase que sob a luz ultra-violeta (UV) emite a fluorescência foi expandido segundo metodologia descrita nos itens 3.2 e 3.3.

Estes plasmideos foram transfectados em isolados clínicos de *M.tuberculosis* (cepa padrão H37Rv e um controle da resistência (CR) e mais 30 isolados clínicos) caracterizadas através do REMA e genotipadas pelo MIRU (Carbone, P.H.L., 2007) e pertencentes em nossa micobacteriotéca (**Figura 4**).

Figura 4: Microfotografia de *Mycobacterium tuberculosis* transfectadas com plasmideo pFPCAGFP, observada em luz ultravioleta (1000x), caracterizando a expressão da proteína verde fluorescente para identificação e visualização do microorganismo vivo.

Após a transfecção realizou-se a repetição dos CIM, cujos resultados estão listados na **Tabela 2**.

Tabela 2: Resultado dos CIMs em isolados clínicos e controle 37HRV transfectados com o plasmídeo pFPCAGFP, para os quatro fármacos usados no CIM.

Nº do isolado clínico	REMA antes da transfecção	REMA depois da transfecção
1	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
2	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
3	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
4	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
5	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
6	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
7	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
8	H – s, R – s, S – s, E – s	H – s, R – s, S – s, E – s
9	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – s, E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – s, E – s
10	H – r (0,03ug/mL), R – s, S – s, E – s	H – r (0,03ug/mL), R – s, S – s, E – s
11	H – s, R – s, S – r (4ug/mL), E – s	H – s, R – s, S – r (4ug/mL), E – s
12	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (1ug/mL), E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (1ug/mL), E – s
13	H – r (≥ 1 ug/mL), R – r (≥ 1 ug/mL), S – s, E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – r (≥ 1 ug/mL), S – s, E – s
14	H – r (0,5ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – s	H – r (0,5ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – s
15	H – s, R – s, S – r (0,125ug/mL), E – r (2ug/mL)	H – s, R – s, S – r (0,125ug/mL), E – r (2ug/mL)
16	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (≥ 8 ug/mL), E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (≥ 8 ug/mL), E – s
17	H – r (0,5ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – s	H – r (0,5ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – s
18	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – s, E – r (≥ 16 ug/mL)	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – s, E – r (≥ 16 ug/mL)
19	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (2ug/mL), E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (2ug/mL), E – s
20	H – r (≥ 1 ug/mL), R – r (≥ 1 ug/mL), S – s, E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – r (≥ 1 ug/mL), S – s, E – s
21	H – r (0,25ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – s, E – s	H – r (0,25ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – s, E – s
22	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (1ug/mL), E – s	H – r (≥ 1 ug/mL), R – s, S – r (1ug/mL), E – s
23	H – s, R – s,	H – s, R – s,

	S – r (1ug/mL), E – r (8ug/mL)	S – r (1ug/mL), E – r (8ug/mL)
24	H – s, R – r (0,03ug/mL), S – r (4ug/mL), E – r (8ug/mL)	H – s, R – r (0,03ug/mL), S – r (4ug/mL), E – r (8ug/mL)
25	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – r (4ug/mL), E – s	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – r (4ug/mL), E – s
26	H – r (0,25ug/mL), R – r (0,015ug/mL), S – s, E – r (4ug/mL)	H – r (0,25ug/mL), R – r (0,015ug/mL), S – s, E – r (4ug/mL)
27	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – s, E – r (8ug/mL)	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,5ug/mL), S – s, E – r (8ug/mL)
28	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – r (4ug/mL)	H – r (≥1ug/mL), R – r (0,25ug/mL), S – s, E – r (4ug/mL)
29	H – s, R – r (0,5ug/mL), S – r (0,5ug/mL), E – r (≥16ug/mL)	H – s, R – r (0,5ug/mL), S – r (0,5ug/mL), E – r (≥16ug/mL)
30	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)
31	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)
32	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)	H – r (≥1ug/mL), R – r (≥1ug/mL), S – r (≥8ug/mL), E – r (≥16ug/mL)

Nota: H – isoniazida; R – rifampicina; S – estreptomicina; E – etambutol; s – isolado clínico sensível; r – isolado clínico resistente; H37Rv – cepa de *Mycobacterium tuberculosis* controle de sensibilidade; CR – cepa de *Mycobacterium tuberculosis* controle da resistência aos quatro fármacos; REMA – Resazurin microtiter assay plate; MIRU – Mycobacterial interspersed repetitive units.

Estes isolados clínicos transfectados com pFPCAGFP foram utilizados para infecção de células THP-1 diferenciadas para macrófagos após estimulação com 10 nM/mL de acetat de forbol miristato (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), como descrita no item **3.7.2**.

Os isolados clínicos da **Tabela 2** foram testados em relação à sensibilidade e resistência aos fármacos já descritos (H, R, S, E). Através do REMA foi possível verificar a distribuição das concentrações dos fármacos quando os isolados clínicos foram considerados como resistentes. Analisando as concentrações das diluições dos fármacos, pode-se verificar que 22 amostras apresentaram resultados $\geq 1 \mu\text{g/mL}$,

sendo que destas, 14 isolados clínicos são resistentes a Isoniazida.

Ainda segundo a **Tabela 2**, podemos verificar a distribuição das frequências de resistência aos fármacos, verificada no resultado dos CIMs correspondentes. Esta frequência está descrita na **Tabela 3** abaixo.

Tabela 3: Frequência da distribuição de resistência dos isolados clínicos envolvidos neste estudo.

Resistência	Nº de Isolados Clínicos	%
Sensível	8	25%
H	2	6,25%
S	1	3,13%
HR	5	15,62%
HS	4	12,5%
HE	1	3,13%
SE	2	6,25%
HRS	1	3,13%
HRE	3	9,37%
SER	2	6,25%
HRSE	3	9,37%
Total	32	100%

Nota: H – isolado clínico resistente: isoniazida; S – isolado clínico resistente: estreptomicina; HR – isolado clínico resistente: isoniazida + rifampicina; HS – isolado clínico resistente: isoniazida + estreptomicina; HE – isolado clínico resistente: isoniazida + etambutol; SE – isolado clínico resistente: estreptomicina + etambutol; HRS – isolado clínico resistente: isoniazida + rifampicina + estreptomicina; HRE – isolado clínico resistente: isoniazida + rifampicina + etambutol; RSE – isolado clínico resistente: rifampicina + estreptomicina + etambutol; HRSE – isolado clínico resistente: isoniazida + rifampicina + estreptomicina + etambutol;

De acordo com a **Tabela 3** podemos destacar que, neste estudo, isolados clínicos sensíveis foram os mais frequentes (n = 8; 25%). Analisando as frequências

das amostras resistentes podemos verificar que houve uma maior resistência a Isoniazida com e sem combinação com os outros fármacos, uma vez que este é considerado como sendo droga de primeira linha no tratamento da tuberculose, seguido de Estreptomicina.

Com base nos resultados do CIM (**Tabela 2**) 5 isolados clínicos foram selecionados para os experimentos.

O Isolado clínico 6 possui resistência aos 4 fármacos, considerado multi-resistente pois é resistente ao mesmo tempo para H, R e mais dois fármacos, com as respectivas concentrações: H – r ($\geq 1\mu\text{g/mL}$); R – r ($\geq 1\mu\text{g/mL}$); S – r ($\geq 8\mu\text{g/mL}$); E – r ($\geq 16\mu\text{g/mL}$).

O Isolado clínico 25 possui resistência a 3 fármacos, sendo considerado multi-resistente, pois é resistente ao mesmo tempo para H, R e S, com as respectivas concentrações: H – r ($\geq 1\mu\text{g/mL}$); R – r ($0,5\mu\text{g/mL}$); S – r ($4\mu\text{g/mL}$); E – s.

Os isolados clínicos 13 e 23 resistentes a dois fármacos, não sendo considerados multi-resistentes, pois como preconizado no Ministério da Saúde, para um isolado clínico ser considerado como tal, precisa ser resistente a isoniazida e rifampicina e mais um fármaco, estreptomicina ou etambutol, por exemplo, ao mesmo tempo. Segundo o CIM as respectivas concentrações são: H – r ($\geq 1\mu\text{g/mL}$); R – r ($\geq 1\mu\text{g/mL}$); S – s; E – s; e H – s; R – s; S – r ($1\mu\text{g/mL}$); E – r ($8\mu\text{g/mL}$).

O Isolado clínico 5 segundo os resultados do CIM, é considerado sensível, pois não houve mudança de cor de azul para rósea após o acréscimo de resazurina ao teste.

A **Figura 5** abaixo exemplifica os resultados dos CIMs de duas amostras de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*, segundo protocolo descrito no **item 3.5.1**, onde a manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como sensibilidade ao(s) fármaco(s) e a cor rósea, como sendo resistente, pois houve o crescimento micobacteriano.

Figura 5 – Fotografia de uma placa com 96 orifícios representando o CIM pelo REMA após revelação com resazurina.

Nota: colunas 1 e 12 – linhas a-h: 100 μ L H₂O; colunas 2 e 7 – linhas a-h: isoniazida; colunas 3 e 8 – linhas a-h: rifampicina; colunas 4 e 9 – linhas a-h: estreptomicina; colunas 5 e 10 – linhas a-h: etambutol; colunas 6 e 11 – linhas a-d: controle do meio de cultura, linhas e-h: controle do Isolado Clínico.

Na **Figura 5** acima se pode notar que, no **Isolado clínico A** houve a manutenção da cor azul somente na coluna onde foi estudada a resistência para estreptomicina (S), nas demais, ocorreu a mudança para rósea, indicando resistência ($H \geq 1 \mu\text{g/mL}$; $R \geq 1 \mu\text{g/mL}$; $E \geq 16 \mu\text{g/mL}$) para estes fármacos. O **Isolado clínico B** apresentou-se resistente a todos os fármacos tendo como resultado $H \geq 1 \mu\text{g/mL}$; $R \geq 1 \mu\text{g/mL}$; $S \geq 8 \mu\text{g/mL}$; $E \geq 16 \mu\text{g/mL}$, observando-se a mudança da cor azul para rósea, indicando crescimento micobacteriano e, portanto, resistência.

4.2 – THP-1 diferenciada para Macrófagos

Células da linhagem celular THP-1 crescem na suspensão, a **Figura 6** abaixo exemplifica a diferenciação das células THP-1 para macrófagos em 2 (a) e 24 (b) horas após o acréscimo de 10 nM/mL acetato de forbol miristato (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

Figura 6: Microfotografia de THP-1 diferenciadas em macrófagos. A e B: 2 e 24 horas após acréscimo de 10 nM/mL de forbol miristato acetato (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), respectivamente. Aumento de 400x. Microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA).

4.3.1 – Infecção de THP-1 diferenciadas em macrófagos por *Mycobacterium tuberculosis* recombinadas com o plasmídeo pFPCAGFP e expressão gênica

Com base na metodologia descrita no item **3.8**, após a diferenciação das células THP-1 para macrófagos foi feita a infecção com *Mycobacterium tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP a partir da escala de McFarland nº1, o que equivale a aproximadamente 3×10^8 bactérias/mL.

A partir dos resultados da **Tabela 2**, alguns isolados clínicos foram selecionados para dar continuidade aos experimentos. Os isolados **31** (H – r $\geq 1 \mu\text{g/mL}$; R – r $\geq 1 \mu\text{g/mL}$; S – r $\geq 8 \mu\text{g/mL}$; E – r $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ – 4 resistências), **13** (H – r $\geq 1 \mu\text{g/mL}$; R – r $1 \mu\text{g/mL}$; S – s; E – s – 2 resistências), **25** (H – r $\geq 1 \mu\text{g/mL}$; R – r $0,5 \mu\text{g/mL}$; S – r $4 \mu\text{g/mL}$; E – s – 3 resistências), **23** (H – s; R – s; S – r $1 \mu\text{g/mL}$; E – r $8 \mu\text{g/mL}$ – 2 resistências) e **5** (H – s; R – s; S – s; E – s – sensível) foram usados para infecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos. Esta infecção se deu a partir do momento em que o bacilo entrou em contato com as células. As amostras foram colhidas nos tempos determinados, ou seja, colhidas nos tempos 0 h, 1 h, 2 h, 4 h, 12 h e 24 h após infecção.

Com as mesmas amostras foi possível fazer lâminas a partir do material colhido e fixado nos tempos 0 h, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min e 1h após infecção por *M.tuberculosis*. No campo claro (**Figura 7**) e campo escuro (**Figuras 8A e 8B**), observando-se as células THP-1 diferenciadas para macrófagos, foi constatada a formação de vacúolos, sugerindo a presença de fagolisossoma.

Figura 7: Microfotografia de células THP-1 diferenciadas para macrófagos, em campo claro, após 1 hora de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Aumento de 1000x. Microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA). Setas em vermelho: formação de vacúolos.

Figuras 8A e 8B: Microfotografia de células THP-1 diferenciadas para macrófagos, em campo escuro, após 1 hora de infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Aumento de

1000x. Microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA). Setas em vermelho: indicando formação de vacúolos; Setas em amarelo: indicando bacilos fagocitados.

Analisando-se as lâminas preparadas, foi possível determinar o número e a média de bacilos fagocitados nos tempos 0h, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min e 1h após infecção (**Tabela 4 e Figura 9**) em microscópio de fluorescência, segundo metodologia descrita no item **3.8**.

Tabela 4: Número de bacilos fagocitados após infecção de células THP-1 diferenciadas para macrófagos nos tempos 0h, 5 min., 10 min., 15 min., 30 min., 1h., por três diferentes isolados clínicos (2 resistentes e 1 sensível).

Isolado 31	Tempo de infecção	Macrófagos infectados	Média	p = 0,05
	0h	18	3,27	<0,0001*
	5 min.	21	3,81	0,0002*
	10 min.	16	2,91	<0,0001*
	15 min.	16	2,91	<0,0001*
	30 min.	19	3,45	<0,0001*
	1h	20	3,63	<0,0001*
Isolado 13	Tempo de infecção	Macrófagos infectados	Média	p = 0,05
	0h	0	0	0
	5 min.	14	2,54	0,0001*
	10 min.	19	3,45	<0,0001*
	15 min.	3	0,54	0,1934*
	30 min.	4	0,36	0,1679*
	1h	11	2	0,0002*
Isolado 5	Tempo de infecção	Macrófagos infectados	Média	p = 0,05
	0h	20	3,63	0,0007*
	5 min.	16	2,91	<0,0001*
	10 min.	16	2,91	<0,0001*

15 min.	26	4,72	<0,0001*
30 min.	24	4,36	0,0005*
1h	21	3,81	0,0004*

Nota: Isolado 31: H – r $\geq 1\mu\text{g/mL}$; R – r $\geq 1\mu\text{g/mL}$; S – r $\geq 8\mu\text{g/mL}$; E – r $\geq 16\mu\text{g/mL}$ – 4 resistências; Isolado 13: H – r $\geq 1\mu\text{g/mL}$; R – r $1\mu\text{g/mL}$; S – s; E – s – 2 resistências; Isolado 5: H – s; R – s; S – s; E – s – sensível; * Teste t;

Figura 9: Média de bacilos fagocitados nos tempos 0h, 5 min., 10 min., 15 min., 30 min. e 1h após infecção por *Mycobacterium tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP. Contagem feita em aumento de 400x, Microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA).

A partir da **Tabela 4** foi possível constatar que a fagocitose ocorreu a partir do momento 0 hora, ou seja, a partir do momento em que o bacilo entrou em contato com as células. Com o isolado clínico 13 ocorreu somente 5 minutos após o início da infecção.

Das lâminas analisadas foi possível verificar que houve uma maior variação de bacilos fagocitados do isolado 5, o que não se pode observar no isolado 13 que foi mais constante. Fazendo-se uma análise de variância (ANOVA) entre os isolados clínicos, foi possível verificar que entre o isolado 31 (4 resistências) e o isolado 13 (2 resistências) e entre o isolado 13 e o isolado 5 (sensível) houve uma diferença estatisticamente significativa, $p = 0,015$ e $p = 0,006$, respectivamente. Em relação a

análise feita entre os isolados 31 e 5, não houve uma diferença estatisticamente significativa, $p = 0,272$.

Para exemplificar os bacilos englobados pelas células THP-1 diferenciadas para macrófagos foram tiradas microfotografias em microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA) das lâminas preparadas. A **Figura 10** demonstra células com formações de vacúolos no tempo de 1 hora de infecção pelo isolado clínico 31 (4 resistências) sugerindo que o bacilo é fagocitado no momento em que entra em contato com as células do sistema fagocitário.

Figura 10: Microfotografia de células THP-1 diferenciadas para macrófagos 1 hora após infecção por *Mycobacterium tuberculosis* transfectadas com o plasmídeo pFPCAGFP. Aumento de 400x. Microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, EUA). **Foto A:** setas em vermelho: bacilos fagocitados; c – células (macrófagos); n – núcleo. **Foto B:** setas em

vermelho: bacilos fagocitados; c – células (macrófagos). **Foto C:** setas em vermelho: bacilos fagocitados; setas em amarelo: bacilos não fagocitados; n – núcleo; c – células (macrófagos). **Foto D:** setas em vermelho: bacilos fagocitados; setas em amarelo: bacilos não fagocitados; n – núcleo; c – células (macrófagos).

Ao mesmo tempo em que as lâminas eram preparadas, as amostras contendo células diferenciadas e *Mycobacterium tuberculosis* transfectados com o plasmídeo fagocitadas, foram preparadas para a extração do RNA, feita a partir do kit RNase Plus Mini Kit (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, como descrito no item 3.8. Nesta etapa, somente o RNA celular foi extraído e a análise em eletroforese em gel de agarose demonstra a integridade do material. As bandas ribossomais 28S e 18S podem ser visualizadas na **Figura 11**.

Figura 11: Gel de integridade das amostras de RNA: Eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídeo. Géis A – D amostras após 1, 4, 12 e 24 horas de infecção pelos isolados de *Mycobacterium tuberculosis*, respectivamente. (MV) macrófago vazio – controle da infecção, (31) isolado clínico 31 – quatro resistências; (13) isolado clínico 13 – 2 resistências (H e R); (25) isolado clínico 25 – 3 resistências (H, R e S); (23) isolado clínico 23 – 2 resistências (S e E); (5) isolado clínico 5 – sensível.

A partir do RNAm obtido pela extração através da metodologia descrita no item 3.9, foi avaliada a expressão gênica dos genes listados na **Tabela 1**, juntamente com

a expressão do gene gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPD), como referência endógena, pela transcrição reversa (RT) seguida da PCR em tempo real. Os valores da quantificação dos RNAm, feitos no NanoDrop (A260/A280) (ND-3300, NanoDrop Technologies, EUA), nos diferentes tempos de infecção estão listados na **Tabela 5** abaixo.

Tabela 5: valores dos RNAm nos diferentes tempos dos isolados clínicos e do controle MV (macrófago vazio).

		0 h	1 h	2 h	4 h	12 h	24 h
MV							
	ng/mL	181,62	94,5	711,78	138,6	736,01	513,11
	260/280	1,91	2,09	2,06	2,01	2,05	2,03
Isolado clínico 31							
	ng/mL	1143,2	383,54	653,14	728,62	860,48	424,53
	260/280	2,15	1,93	2,05	2,05	2,09	1,98
Isolado clínico 13							
	ng/mL	147,96	165,83	528,88	707,52	1647,4	641,26
	260/280	2,13	2,12	2,03	2,08	2,05	1,98
Isolado clínico 25							
	ng/mL	329,36	415,13	855,22	136,05	715,95	679,14
	260/280	1,86	1,9	1,99	2,04	2,04	2,02
Isolado clínico 23							
	ng/mL	880,36	613,05	562,03	715,54	829,18	523,97
	260/280	1,72	1,78	2,04	2,05	1,94	1,99
Isolado clínico 5							
	ng/mL	388,33	348,15	372,32	898,02	426,07	472,6
	260/280	1,87	1,89	1,95	2,02	1,96	1,97

De acordo com os resultados da **Tabela 5** foi possível verificar, com os valores dos RNAs extraídos durante os experimentos, houve um aumento da expressão entre 2 e 12 horas após infecção. Com essas amostras foram gerados os cDNAs e testados através da curva de eficiência (slope) dos genes estudados. Os resultados das curvas de eficiências estão descritos na **Tabela 6**, e a partir destas curvas, foram feitas as análises da expressão dos genes envolvidos no estudo.

Tabela 6: Valores de inclinação da curva de eficiência dos ensaios da PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da curva (slope)	Eficiência
<i>GAPD</i>	-3,15	107%
<i>IL-1β</i>	-3,30	100%
<i>IL-6</i>	-3,16	107%
<i>TNF-α</i>	-3,43	96%
<i>TLR2</i>	-3,48	93%

Nota: *GAPD* - Ggliceraldeído 3-Fostato Desidrogenase; *IL-1 β* – Interleucina 1 beta; *IL-6* – Interleucina 6; *TNF- α* – Fator de Necrose Tumoral alfa; *TLR2* – Receptor Toll-Like 2.

A expressão dos genes foi realizada analisando-se isolados clínicos dos 4 perfis de resistência mais a cepa controle H37Rv. A expressão relativa de RNAm de cada gene em relação à do *GAPD* (controle endógeno) foi analisado a partir dos Cts obtidos nos ensaios em relação aos Cts controle (MV) denominado de Delta Delta Ct ($\Delta\Delta\text{Ct}$) **Tabela 7.**

Tabela 7: Variação do RNAm dos genes *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *TLR2*, *TLR4* e *GAPD* em células THP-1 diferenciadas para macrófagos após infecção por diferentes isolados clínicos de *M.tuberculosis*.

Gene s	Tempo de infecção					p = 0,05
	0 h	1 h	2 h	4 h	12 h	24 h
MV	664,8 (616,5; 713,1)	595,7 (323,1; 868,3)	47,98 (44,72; 51,23)	21,86 (0,0000000413; 43,71)	169,5 (7,548; 331,5)	918,4 (764,8; 1072)
						0,0458**
IL-6	0,0002132	0,00009451	0,00005474	0,0001057	0,00005905	0,0003718
	(0,000213; 0,0002134)	(0,00008973; 0,00009929)	(0,00004835; 0,00006112)	(0,0001039; 0,0001075)	(0,00005566; 0,00006245)	(0,0003538; 0,0003898)
TNF- α	487457 (459275; 515638)	126393 (120527; 132258)	47370 (46599; 48142)	23429 (3320; 43538)	49803 (1708; 97899)	297782 (246290; 349274)
						0,0710*
TLR2	0,001894	0,001464	0,0006679	0,001480	0,001259	0,001550
	(0,001573; 0,002214)	(0,001370; 0,001558)	(0,005827; 0,007530)	(0,001469; 0,001491)	(0,001115; 0,001402)	(0,001347; 0,001753)
TLR4	0,0009634 (5,263; 0,001926)	0,001460 (0,001460; 0,001461)	0,5045 (0,0006569; 1,008)	0,5151 (0,001438; 1,029)	0,5265 (0,001212; 1,032)	0,4834 (0,001592; 0,9653)
						0,0248**
Isolado 31	5841 (0,5340; 11682)	12340 (0,0773; 24679)	8558 (0,0528; 17115)	54388 (0,001216; 108776)	147492 (56,53; 294927)	11270 (2,608; 22537)
						0,1390*

IL-6	0,00001095	0,00002175	0,00009401	0,0001608	0,001576	0,00002709	
	(0,000007354;	(0,00002358;	(0,00001419;	(0,0000007986;	(0,00001509;	(0,000007498;	0,2686*
	0,00001454)	0,00004114)	0,0001738)	0,0003208)	0,003138)	0,00004668	
TNF-α	71632	116103 (7,563;	41809 (8181;	0,000002582	0,000002804	89153 (0,0162,	0,0414**
	(35315;107950)	232199)	75438)	(2,772;	(11,62;	178307)	
				0,000005164)	0,000005608)		
TLR2	0,003645	0,004180	0,002631	0,003836	0,01707	0,005318	0,0401**
	(0,001972;	(0,0004769;	(0,00047;	(0,00002642;	(0,000239; 0,0339)	(0,001768;	
	0,005318)	0,007883)	0,004793)	0,007646)		0,008869)	
TLR4	0,0033619	0,0045	0,002799	0,004517	0,01851 (0,00022;	0,005953	0,0414**
	(0,002004;	(0,0004271;	(0,0004361;	(0,00002243;	0,0368)	(0,001505; 0,0104)	
	0,005234)	0,008573)	0,005162)	0,009012)			
Isolado 13	92,35 (0,1408;	7,865 (1,099;	71,96 (0,006896;	215,5 (0,3872;	275,7 (54,53; 497)	624,5 (0,4965;	0,0654*
	184,6)	14,63)	143,9)	430,5)		1249)	
IL-6	0,0001484	0,0002053	0,0001324	0,0003732	0,004442	0,02492	0,2673*
	(0,00006876;	(0,00005928;	(0,00004058;	(0,0001183;	(0,001691;	(0,001438; 0,0484)	
	0,000228)	0,0003513)	0,0002242)	0,0006280)	0,007194)		

TNF- α	0,3967 (0,1408; 0,6525)	190686 (57290; 324082)	7564 (9911; 15118)	41158 (13854; 68461)	13489 (2487; 24492)	288643 (68747; 508539)	0,1263*
	0,013 (0,005601; 0,0204)	0,01346 (0,003821; 0,0231)	0,001001 (0,0003604; 0,001642)	0,007901 (0,002803; 0,013)	0,003539 (0,001826; 0,005252)	0,05815 (0,0121; 0,1042)	0,12*
	0,01297	0,01140	0,0001556	0,006350	0,004329	0,0291	
TLR4	(0,005735; 0,0202)	(0,000001119; 0,0228)	(0,0000006061; 0,0003105)	(0,0000006323; 0,0127)	(0,0000008092; 0,008657)	(0,0000007703; 0,0582)	0,0490**
<hr/>							
Isclado 25	0,5570 (0,1250; 0,9890)	89,38 (5,724; 173)	19,19 (0,006003; 38,37)	24,55 (0,3550; 48,74)	367 (253,4; 480,7)	420 (115,4; 724,6)	0,1035*
IL-6	0,0000819	0,0001614	0,00007611	0,0002721	0,002369	0,03995 (0,0227; 0,0572)	0,3260*
	(0,00002114; 0,0001427)	(0,0001154; 0,0002074)	(0,000004719; 0,0001475)	(0,0002169; 0,0003273)	(0,001169; 0,00357)		
TNF- α	0,4091 (0,1786; 0,6395)	143,8 (0,3436; 287,2)	1,101 (0,1390; 2,063)	36649 (31850; 41448)	0,2031 (0,0877; 0,3184)	210,7 (0,2507; 421,1)	0,3581*
TLR2	0,0376 (0,0137; 0,0615)	0,0408 (0,0314; 0,0502)	0,004947 (0,0002219; 0,009672)	0,009836 (0,008173; 0,0115)	0,0214 (0,0110; 0,0318)	0,05965 (0,0353; 0,0840)	0,0187**

	TLR4	38,40 (0,000009341; 76,80)	16,90 (0,000008349; 33,80)	4,611 (0,2460; 8,976)	8,094 (5,712; 10,48)	1371 (15,07; 2727)	4,457 (0,000001873; 8,914)	0,3361*
Isolado 23	IL-1 β	46,29 (0,1118; 92,48)	0,5909 (0,1357; 1,046)	0,1765 (0,0152; 0,3377)	0,0764 (0,0702; 0,0826)	36,35 (0,1409; 72,55)	269,3 (0,3169; 538,2)	0,2290*
	IL-6	0,00001776 (0,000006781; 0,00002873)	0,00001492 (0,00000547; 0,00002438)	0,00003505 (0,000004367; 0,00006573)	0,00001975 (0,00001554; 0,00001396)	0,0000564 (0,00001701; 0,00008578)	0,0002741 (0,0001483;0,0003 999)	0,1530*
	TNF- α	12005 (138,4; 23871)	4419 (281,1; 8558)	506,6 (86,46; 926,7)	2982 (65,12; 5898)	299,2 (5,445; 593)	5692 (278,6; 11106)	0,0582*
	TLR2	356,8 (0,004803; 713,6)	357,8 (0,003966; 715,6)	0,00726 (0,00001991; 0,0145)	56,14 (0,0006074; 112,3)	25,34 (0,003545; 50,67)	462,4 (0,0138; 924,8)	0,0536*
	TLR4	10,31 (0,00002873; 20,62)	6,395 (0,00002438; 12,79)	0,006808 (0,000004367; 0,0136)	0,0002433 (0,00001554; 0,000471)	10,01 (0,00002701; 20,03)	22,30 (0,0003999; 44,60)	0,0607*
Isolado 5	IL-1 β	67,55 (31,21; 103,9)	0,5712 (0,0867; 1,056)	8,387 (0,0137; 16,76)	0,4853 (0,0498; 0,9208)	1015 (77,39; 1952)	618,2 (458,6; 778,2)	0,1663*

	89,08	0,2242	3,104	7,760			
IL-6	(0,000005698; 178,2)	(0,000003103; 0,4484)	(0,00001648; 6,207)	(0,00009957; 15,52)	786,3 (0,0001859; 1573)	304 (0,0002479; 608)	0,1785*
TNF- α	119074 (23888; 214260)	313164 (102766; 523562)	16784 (4663; 28904)	15914 (10521; 21306)	45989 (0,2770; 91978)	114184 (0,02; 228368)	0,0718*
TLR2	0,01521 (0,002922; 0,0275)	0,03112 (0,003446; 0,0588)	0,00201 (0,0004286; 0,003592)	0,002495 (0,001797; 0,003193)	758 (0,007432; 1516)	0,0136 (0,0128; 0,0144)	0,3632*
TLR4	0,0149 (0,002991; 0,0268)	0,0192 (0,006306; 0,0321)	0,001794 (0,0004985; 0,00309)	0,002547 (0,001684; 0,00341)	7,764 (0,7637; 14,76)	0,0137 (0,0121; 0,0153)	0,3597*

Nota: Amostras utilizadas no estudo – RNAm de células THP-1 diferenciadas para macrófagos, após infecção por M.tuberculosis em tempos diferentes: 0h, 1h, 2h, 4h, 12h, 24h. $\Delta\Delta Ct$: $2^{-(Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ GAPD da amostra})}$. Valores de expressão apresentados como mediana (25% - 75%). Resultados comparados por: *Wilcoxon Signed Rank Test; ** Test T.

De acordo com os resultados da mediana em cada tempo do experimento nas diferentes amostras (**Tabela 7**) foi possível comparar a variação da expressão dos genes *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* , *TLR2*, *TLR4*, de acordo com o perfil de resistência de cada isolado clínico (**Tabela 8a-e**).

Tabela 8: Variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like quando comparado os resultados dos isolados clínicos.

Tabela 8a: Análise da variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like em relação ao isolado clínico 31.

	<i>IL-1β</i> •						<i>IL-6</i> •						<i>TNF-α</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
25*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓
13*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↑
23*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↓
5*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑

	<i>TLR2</i> •						<i>TLR4</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
25*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
13*	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑
23*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑
5*	↑	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑	↑

Nota: * isolados clínicos; • Genes Estudados; ↑ - aumento da expressão em relação ao isolado clínico 31; ↓ - diminuição da expressão em relação ao isolado clínico 31; h – tempo do experimento em horas.

Quando comparado os isolados clínicos em relação ao multi-resistente (isolado 31 – 4 resistências), observou-se que não houve aumento da expressão de *IL-1 β* . Também foi possível verificar que durante as 24 horas do experimento, o gene *TLR2*, aumentou sua expressão.

Tabela 8b: Análise da variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like em relação ao isolado clínico 25.

	<i>IL-1β</i> •						<i>IL-6</i> •						<i>TNF-α</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑		↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
13*	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑
23*	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑
5*	↑	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑

	<i>TLR2</i> •						<i>TLR4</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
13*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
23*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↑
5*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

Nota: * isolados clínicos; • Genes Estudados; ↑ - aumento da expressão em relação ao isolado clínico 25; ↓ - diminuição da expressão em relação ao isolado clínico 25; h – tempo do experimento em horas.

Comparando-se os isolados clínicos com o também multi-resistente (25 – 3 resistências) foi possível verificar que houve uma diminuição da expressão do gene *TLR4*, e que ocorreu um aumento da expressão das interleucinas pró-inflamatórias durante as 24 horas do experimento.

Tabela 8c: Análise da variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like em relação ao isolado clínico 13.

	<i>IL-1β</i> •						<i>IL-6</i> •						<i>TNF-α</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
25*	↓	↑	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
23*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓
5*	↓	↓	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓

	<i>TLR2</i> •						<i>TLR4</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
25*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
23*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
5*	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓

Nota: * isolados clínicos; • Genes Estudados; ↑ - aumento da expressão em relação ao isolado clínico 13; ↓ - diminuição da expressão em relação ao isolado clínico 13; h – tempo do experimento em horas.

O isolado clínico 13 possui duas resistências (H - $\geq 1\mu\text{g/mL}$, R - $\geq 1\mu\text{g/mL}$) e segundo a **Tabela 8c**, pode-se observar que a expressão de *TLR2* e *TLR4* aumentou em relação a este isolado clínico.

Tabela 8d: Análise da variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like em relação ao isolado clínico 23.

	<i>IL-1β</i> •						<i>IL-6</i> •						<i>TNF-α</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↑
25*	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↑	↓	↓
13*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑
5*	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

	<i>TLR2</i> •						<i>TLR4</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
25*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
13*	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑
5*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑

Nota: * isolados clínicos; • Genes Estudados; ↑ - aumento da expressão em relação ao isolado clínico 23; ↓ - diminuição da expressão em relação ao isolado clínico 23; h – tempo do experimento em horas.

O isolado clínico 23 também com duas resistências (S – 1ug/mL; E – 8ug/mL), assim como em relação ao isolado clínico 25, houve aumento da expressão dos genes pró-inflamatórios e diminuição da expressão dos receptores Toll-Like.

Tabela 8d: Análise da variação da expressão dos genes pró-inflamatórios e receptores Toll-Like em relação ao isolado clínico 5.

	<i>IL-1β</i> •						<i>IL-6</i> •						<i>TNF-α</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓	↓
25*	↓	↑	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↓
13*	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↓	↑
23*	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓

	<i>TLR2</i> •						<i>TLR4</i> •					
	0h	1h	2h	4h	12h	24h	0h	1h	2h	4h	12h	24h
31*	↓	↓	↑	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↓	↓
25*	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↑
13*	↓	↓	↓	↑	↓	↑	↓	↓	↓	↓	↑	↑
23*	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑	↑	↑	↓	↑	↑

Nota: * isolados clínicos; • Genes Estudados; ↑ - aumento da expressão em relação ao isolado clínico 5; ↓ - diminuição da expressão em relação ao isolado clínico 5; h – tempo do experimento em horas.

Na cepa sensível (5) quando comparada com os demais isolados, observou-se que houve uma diminuição na expressão de *IL-6* e *TNF- α* e aumento da expressão de *IL-1 β* , demonstrando uma possível relação entre a cepa sensível com o seu aumento da virulência.

5 – Discussão

O presente estudo foi realizado com 30 isolados clínicos caracterizados através do REMA e genotipadas pelo MIRU (CARBONE, 2007), mais a cepa padrão H37Rv e um controle da resistência (CR), pertencentes em nossa micobacteriotéca.

A TB continua sendo um grave problema de saúde pública e o tratamento com quimioterápicos específicos está sendo dificultado devido à presença das cepas multidrogas resistentes (COKER, R.J., 2004).

A virulência de alguns patógenos é determinada pela habilidade de adaptação no hospedeiro (CHANGSEN, C., *et al.*, 2003). O diagnóstico da TB é realizado empregando a cultura do espécime clínico, caracterização bioquímica e identificação do bacilo. O teste de sensibilidade aos fármacos empregados no tratamento dessa infecção é também realizado nos centros de referência que possuem condições adequadas de manipulação de culturas de micobactérias (BRASIL, 2004).

Segundo FIÚZA DE MELO & AFIÚNE, 1993, o tratamento atual é eficaz na cura da doença. Os principais responsáveis pelo surgimento ou seleção de cepas resistentes aos fármacos utilizados, são as falhas significativas e o abandono no tratamento. Na população brasileira, as resistências aos fármacos antituberculose estão relacionados ao uso irregular da medicação, a alta taxa de abandono do tratamento de muitos pacientes ainda com a doença ativa e também pelas prescrições inadequadas (FIUZA DE MELO, F.A., *et al.*, 2000).

Estes isolados clínicos foram transfectados com plasmídeo pFPCAGFP o qual possui o gene da proteína verde fluorescente (GFP) com o promotor da Acetamidase que sob a luz ultra-violeta (UV) emite a fluorescência, servindo como marcador de infecção micobacteriana. Trabalhos realizados anteriormente usaram esta proteína em infecção por *M.tuberculosis*, na expressão gênica, em estudos de cultura micobacteriana e resistência a quimioterápicos.

Os resultados do REMA antes e após a transfecção com o plasmídeo pFPCAGFP (**Tabela 2**) demonstram que a utilização deste plasmídeo com o gene da

proteína verde fluorescente não altera o resultado do CIM dos isolados clínicos em questão, o que é corroborado com estudos feitos por CHANGSEN, C., *et al.*, 2003, cujos resultados de isolados clínicos de *M.tuberculosis* transfectados com o gene da *GFP* e submetidos ao CIM, são coerentes aos obtidos antes da recombinação.

O gene da *GFP* (*Aequorea Victoria*) tem sido estudado em procariontes (DHANDAYUTHAPANI, S., *et al.*, 1995; KAIN, S. R., *et al.*, 1995; KREMER, L., *et al.*, 1995; VALDIVIA, R. H., & S. FALKOW., 1996). Devido as suas propriedades, como baixa toxicidade, produção contínua de fluorescência, pode ser usada como marcador de viabilidade e crescimento bacteriano.

Avaliando-se a distribuição dos CIMs entre os isolados clínicos de *M.tuberculosis* (**Tabela 3**), observou-se que 8 (25%) apresentaram-se sensíveis a todos os fármacos empregados nesta técnica assim como a cepa padrão H37Rv, e que dentre as resistências, o fármaco mais freqüente foi isoniazida. A TB resistente a múltiplas drogas é internacionalmente definida como resistência a pelo menos, H e R, podendo não haver resistência a outros fármacos (COUSINS, D.V., *et al.*, 2003). No Brasil, o conceito de multidroga resistente refere-se aos casos que apresentam falência no tratamento com a utilização do esquema III, preconizado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose, ou quando o bacilo é resistente a H e R e ainda um ou mais fármacos componentes dos esquemas I, II e III (FIUZA DE MELO, F.A., *et al.*, 2003).

No presente estudo foi utilizada cultura celular de THP-1, linhagem de leucemia humana em monócitos. Elas se tornam aderentes após estimulação com acetato de forbol miristado (PMA – 10 nM/mL). Estas células possuem características morfológicas similares aos macrófagos humanos (LIU, G. *et al.*, 2006). Segundo o estudos feitos por LIU, G. *et al.*, 2006, as THP-1 induzidas com sobrenadante de córion IV e análise por transcriptase reversa demonstrou que houve a indução da expressão do receptor Scavenger A, sugerindo que esta linhagem celular também é morfológica e funcionalmente diferenciadas em macrófagos.

A imunidade inata é mais do que fagocitose, que compreende diferentes tipos celulares, e tem seu próprio sistema de reconhecimento de patógenos sendo

importante para o desenvolvimento da resposta imune adaptativa do hospedeiro. Patógenos evoluíram maneiras bem sucedidas para escapar deste sistema inato, para continuar seu desenvolvimento no hospedeiro, como *M.tuberculosis* (BHATT, K., & SALGAME, P., 2007).

Macrófagos alveolares representam a primeira linha de defesa do organismo durante a infecção por *M.tuberculosis*. Segundo SCHLESINGER, L.S., *et al.*, 1990, demonstraram que em estudos “*in vitro*”, o receptor 3 (CR3) do sistema complemento é o mais importante durante a fagocitose do bacilo. Outros receptores também são importantes, como receptores 1 (CR1, CR4) do sistema complemento, manose, e receptores Scavenger também podem reconhecer *M.tuberculosis*, “*in vitro*” (BHATT, K., & SALGAME, P., 2007).

A resposta imune na infecção por micobactérias envolve principalmente linfócitos T e suas funções microbidas através da expressão de IFN- γ importante na formação dos granulomas, crucial para a contenção dos bacilos, e macrófagos ativados. Macrófagos e células dendríticas são encontradas no centro desses granulomas, juntamente com micobactérias cercadas por linfócitos T (NICOD, L.P., 2007).

A infecção por *M.tuberculosis* resulta na indução de uma série de citocinas, algumas delas desempenhando um papel fundamental na resistência (FERRAZ, J.C., *et al.*, 2006). Para a infecção das células THP-1 diferenciadas para macrófagos, cinco isolados clínicos com diferentes perfis de CIM foram usados nos experimentos. O número de bacilos fagocitados não foi estatisticamente significativo para a diferença de expressão dos genes em estudo (**Tabela 3**).

A caracterização dos determinantes da virulência de *M. tuberculosis* relevantes para a patogenia da tuberculose humana é importante. Embora estudos sejam feitos em modelos animais, como cobaias e camundongos para a caracterização da infecção por micobactérias, a avaliação da capacidade em persistir nos macrófagos humanos é essencial para a determinação da virulência micobacteriana. O pulmão é a principal portal para a entrada dos bacilos, a causa do quadro pulmonar tuberculose. Cepas virulentas podem escapar do sistema imune do hospedeiro dentro dos

pulmões, podendo atingir outros órgãos e causar uma forma mais grave da doença, tais como tuberculose extrapulmonar ou tuberculose miliar. Portanto, a identificação específica de cepas virulentas pode ajudar na elucidação da patogenia do bacilo (WONG, K.C *et al.*, 2007).

Monócitos/macrófagos não podem destruir ou inibir o crescimento de algumas micobactérias. Sua ativação exige a libertação de um número de citocinas pelos linfócitos, tais como interleucina 2 (IL-2), *IFN-γ*, *TNF-α*. *IFN-γ* exerce uma variedade de funções sobre o macrófago, incluindo a produção de *TNF-α*, radicais livres e a síntese de óxido nítrico. A produção de radicais livres parece estar parcialmente correlacionada com a capacidade bactericida dos macrófagos. O óxido nítrico parece ser mais importante, pelo menos em ratos, embora não se possa deixar de lado o papel das lisozimas, proteases, e hidrolases (QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R., 2003).

A **Tabela 6** demonstra os resultados das medianas (25% - 75%) na avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias e TLRs.

Uma constatação importante neste estudo foi o estabelecimento de uma expressão significativa das citocinas pró-inflamatórias, *IL-1β*, *IL-6* e *TNF-α* nos isolados clínicos 31 e 23 de *M.tuberculosis* com diferentes perfis de sensibilidades (resistência a quatro e dois fármacos, respectivamente).

Pôde-se observar também que a expressão das citocinas pró-inflamatórias e TLRs nestes mesmos isolados clínicos de *M.tuberculosis* 31 e 23, com perfis de resistência diferentes, foram estatisticamente significantes sugerindo maior virulência destas amostras.

Segundo (POVEDA, F., *et al.*, 1999) estudos recentes têm incluído *TNF-α* e outras citocinas pró-inflamatórias na resposta imune na infecção por micobactérias em humanos, sugerindo sua importância na proteção contra *M.tuberculosis*.

TNF-α, por si só não consegue inibir o crescimento de micobactérias, mas parece ser mais importante do que *IFN-γ* na indução bactericida dos macrófagos

humanos. Modelos de estudos experimentais e clínicos têm demonstrado *TNF- α* como um dos principais fatores de defesa contra infecções por micobactérias. Também funciona como um segundo sinal de ativação das células T bem como na ativação dos macrófagos (NICOD, L.P., 2007).

ROBINSON, C.M., & NAU, G.J., 2008, estudando a regulação da expressão de *IL-12* e *IL-27* no controle de *M.tuberculosis* observaram a indução da expressão de *TNF- α* e *IL-6* durante infecção, aumentando ainda mais a expressão de *IL-12* e, após adição de *sIL-27R* (receptor solúvel) em 2 h, 8 h houve aumento de *TNF- α* , e 24 h aumento de *IL-6*. As células infectadas continuaram a produzir *TNF- α* e *IL-6*, mesmo após 48 h de infecção. A combinação de *IL-12* e *sIL-27R* estimulou a produção mais *IL-1 β* nas células infectadas, após 48 h de infecção.

Em estudo realizado por LIEN, E., *et al.*, 1999, *IL-12* e *sIL-27R* influenciaram quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos. *IL-12* também aumentou a expressão de *IFN- γ* e *IL-6* pelas células infectadas. Os autores salientam que *IL-27* aumentou os níveis de *TNF- α* numa fase precoce da infecção, *IFN- γ* às 24 h e que a expressão de *IL-1 β* ocorreu durante todo o período da infecção.

TLRs de mamíferos é uma família de receptores transmembrânicos. Extracelularmente é rico em leucina com um grupo carboxi terminal, o domínio intracelular possui um receptor Toll/interleucina 1 (TIR) essencial para transmitir o sinal para iniciar a resposta (QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R., 2003).

O domínio citoplasmático de TLR4, o primeiro TLR identificado em mamíferos, exibe um maior grau de conservação da seqüência em relação ao seu homólogo em ratos. Todos os TLRs de mamíferos são reconhecidos pelo sinal feito através do MyD88, uma proteína citoplasmática, que quando recrutado para o TIR, ativa os TLRs, sinalizando uma cascata de eventos, facilitando a translocação de NF- κ B, resultando na transcrição de genes com funções imunorregulatórios, incluindo citocinas e moléculas coestimulatórias (RÖLLINGHOFF, M. & STENGER, S., 2001) nucleares, bem como ativação de MAP kinases (QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R., 2003).

TLR2 pode ser um potencial candidato na resistência à infecção por *M.tuberculosis*. (YANG, T.J, *et al.*, 2001) realizaram estudos em um grupo de 86 indivíduos coreanos infectados com *Mycobacterium leprae*, o agente causador da lepra. Neste estudo, os doentes foram classificados como tendo um dos dois padrões das principais doenças, tuberculoide (caracterizada por algumas bactérias e uma acentuada resposta imune celular) e lepromatosa (caracterizada por apresentar alta carga bacilar e baixa resposta imune). Dez indivíduos, dos 45 (22%) classificados como lepromatosos, apresentaram uma mutação na posição 2029 (C-T), resultando na substituição de uma arginina por triptofano no aminoácido 677, enquanto que nenhum paciente classificado como tuberculoide e do grupo controle apresentaram esta mutação. Estudos funcionais não foram realizados nestes pacientes, no entanto, os autores sugeriram que esta mutação no TLR2 poderia dar origem a uma fagocitose de micobactérias defeituosa pelos macrófagos, resultando em uma imparidade na resposta imune característica de pacientes com lepra.

No presente estudo a expressão de TLR2 e *TLR4* foi estatisticamente significativa nos macrófagos vazios e nos isolados clínicos de *M.tuberculosis* 31, 25 e 23. A expressão desses mesmos genes não foi significativa nos isolados clínicos de *M.tuberculosis* 13 e 5, respectivamente. Estudos “*in vitro*” demonstraram que *TLR2*, *TLR4*, e *IL-1R* são importantes para regular a expressão de *IL-1 β* e a sinalização de TLRs (QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R., 2003).

Modelos experimentais específicos analisam a contribuição de TLRs na defesa do hospedeiro na infecção por micobactérias ainda não estão elucidados. No entanto, estudos “*in vitro*” demonstram que *TLR2* está relacionado no reconhecimento da lipoarabinose presente na membrana celular micobacteriana (QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R., 2003). LIEN, E., *et al.*, 1999, sugerem que um ou mais de TLR participe no reconhecimento do bacilo.

Todos estes estudos sugerem que as citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel importante na proteção durante a infecção por *M.tuberculosis* a qual juntamente com linfócitos T, fazem parte da formação dos granulomas, potencializando a capacidade bactericida de macrófagos na proteção do organismo.

6 CONCLUSÕES

Com os resultados do presente trabalho, pode-se concluir que:

1. A proteína verde fluorescente pode ser usada como marcador celular no modelo proposto;
2. Citocinas pró-inflamatórias são expressas pelas células THP-1 diferenciadas para macrófagos quando são infectadas por *M.tuberculosis*;
3. Os experimentos sugerem que os bacilos são fagocitados a partir do momento em que entram em contato com as células do sistema fagocítico.
4. TLRs são expressos pelas células THP-1 diferenciadas em macrófagos quando infectadas por *M.tuberculosis*;
5. TLR2 é o receptor que regula a expressão de citocinas pró-inflamatórias (*IL-1 β* , *IL-6* e *TNF- α*);
6. O isolado clínico sensível aos quatro fármacos utilizados no tratamento da tuberculose sinaliza melhor a expressão das citocinas pró-inflamatórias e TLRs, ao passo que isolados clínicos resistentes, possuem uma fraca sinalização;

7 Referências Bibliográficas

- ANGUS, B.J.; YATES, M.; CONTON, C.; BYREN, I. Cutaneous tuberculosis of the penis and sexual transmission of tuberculosis confirmed by molecular typing. **Clinical Infectious Diseases**. v.33, p.32-4, 2001.
- ADEREM, A. & UNDERHILL, D.M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annu. Rev. Immunol.** v.17, p.593-23, 1999.
- ARANAZ, A.; LIÉBANA, E.; GÓMEZ-MAMPASSO, E.; GALÁN, J.C.; COUSINS, D.; ORTEGA, A.; BLÁZQUEZ, J.; BAQUERO, J.; MATEOS, A.; SUAREZ, G.; DOMINGUEZ, L. *M.tuberculosis* subs. *caprae* sbs. nov: a taxonomia study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v.49. p.1263-73, 1999.
- BARCO, P.; CARDOSO, R.F.; HIRATA, R.D.C; LEITE, C.Q.F.; PANDOLFI, J.R.; SATO, D.N.; SHIKAMA, M.L.; FIÚZA DE MELO, F.; MAMIZUKA, E.M.; CAMPANERUT, P.A.Z.; HIRATA, M.H. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. **J. Ant. Chemot.** v.58, n.5, p.930-5, 2006.
- BHATT, K., & SALGAME, P. Host Innate Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Immunology**. v.27, n.4, p.347-62, 2007.
- BLOKPOEL, M.C., O'TOOLE, R., SMEULDERS, M.J., WILLIAMS, H.D. Development and aplication of unstable GFP variants to kinetic studies of mycobacterial gene experession. **J. Microbiol. Methods**. v.54, n.2, p.203-11, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Departamento de Vigilância Epidemiológica**. Sistemas de Informações de Agravos Notificáveis, 2004
- CAMPOS, M.M.A. **Emprego do bacteriófago D29 na determinação quantitativa da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à rifampicina e sua correlação com o gene *rpoβ***. São Paulo, 2001, p.91. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CARBONE, P.H. **Construção de fago lítico com promoter hsp70 e gene GFP com potencial uso em testes de susceptibilidade a drogas para o *Mycobacterium* sp.** São Paulo, 2007, p.124. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.
- CARDOSO, R., COOKSEY, R.C., MORLOCK, G.P., BARCO, P., CECON, L., FORASTIERO, F., LEITE, C.Q.F., SATO, D.N., SHIKAMA, M.L., MAMIZUKA, E.M., HIRATA, R.D.C., HIRATA, M.H. Isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brazil: Screening and characterization of mutations. **Anti. Age. Chemoth.** v.48, n.9, p.3373-81, 2004.
- CARDOSO, R.F. **Análise de mutações nos genes relacionados com resistência a isoniazida (INH) em isolados clínicos de *Mycobacterium tuverculosis* de origem**

brasileira. São Paulo, 2003, p.135. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CASTRO-GARZA, J., KING, C.H., SWORDS, W.E., QUINN, F.D. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. **FEMS Microbiol. Lett.** v.212, n.2, p.145-49, 2002.

CECON, L. **Mutações no gene NAT: efeito na atividade enzimática e no perfil de resistência a isoniazida de cepas de *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo, 2008, p.101. Tese de Doutorado – em andamento – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

CHACÓN-SALINAS, R.; SERAFÍN-LÓPEZ, L.; RAMOS-PAYÁN, R.; MÉNDEZ-ARAGÓN, P.; HERNÁNDEZ-PANDO, P.; VAN SOOLINGEN, D.; FLORES-ROMO, L.; ESTRADA-PARRA, S.; ESTRADA-GARCÍA, I. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* Genotypes. **Clinical and Experimental Immunology**. v.140, p.443-49.

CHANGSEN, C., FRANZBLAU, S.G., PALITTAPONGARNPIM, P. Improved Green Fluorescent Protein Reporter Gene-Based Microplate Screening for Antituberculosis Compounds by Utilizing an Acetamidase Promoter. **Antimicrob. Agents Chemotherapy**. v.47, n.12. p.3682-87, 2003.

COKER, R.J. Multidrug-resistant tuberculosis: public health challenges. **Tropical Medicine & International Health**. v.9, n.1, p.25-40, 2004.

COOKSEY, R.C.; CRAWFORD, J.T.; JACOBS, W.R.J.R.; SHINNICK, T.M. A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of *Mycobacterium tuberculosis* expressing firefly luciferase. **Antimicrob. Agents. Chemother.** v.37, n.6, p.1348-52, 1993.

COUSINS, D.V.; BASTIDA, R.; CATALDI, A.; QUSE, V.; REDROBE, S.; DOW, S.; DUIGNAN, P.; MURRAY, A.; DUPONT, C.; AHMED, N.; COLLINS, D.M.; BUTLER, W.R.; DAWSON, D.; RODRÍGUEZ, D.; LOUREIRO, J.; ROMANO, M.I.; ALITO, A.; ZUMARRAGA, M.; BERNARDELLI, A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. **Intern. J. System Evolut. Microbiol.** v.52, p.1305-14, 2003.

DHANDAYUTHAPANI, S.; VIA, L.E.; THOMAS, C.A.; HOROWITZ, P.M.; DERETIC, D.; DERETIC, V. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and cell biology of mycobacterial interactions with macrophages. **Mol. Microbiol.** v.17, p.901–12, 1995.

DHIMAN, R.; RAJE, M.; MAJUMDAR, S. Differential expression of NF- κ B in mycobacteria infected THP-1 affects apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1770, p.649-58, 2007.

FERRAZ, J.C.; MELO, F.B.S.; ALBUQUERQUE, M.F.P.M.; MONTENEGRO, S.M.L.; ABATH, F.G.C. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. v.39, p.1387-97, 2006.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B. Transmissão e imunopatologia da tuberculose. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.19, n.1, p.19-24, 1993.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B.; ALMEIDA, E.A.; SPADA, D.T.A.; CASTELO FILHO, A. A resistência primária do *Mycobacterium tuberculosis* em uma unidade de referência na cidade de São Paulo: evolução por quatro décadas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.26, supl.2, p.S130, 2000.

FIUZA DE MELO, F.A.; AFIUNE, J.B.; IDE NETO, J.; ALMEIDA, E.A.; SPADA, D.T.A.; ANTELMO, A.N.L.; CRUZ, M.L. Aspectos epidemiológicos da tuberculose multirresistente em serviço de referência na cidade de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.36, n.1, p.27-34, 2003.

FRIEDEN, T.R.; STERLING, T.R.; MUNSIFF, S.S.; WATT, C.J.; DYE, C. Tuberculosis. **Lancet**. v.362, p.887-99, 2003.

GANGOPADHYAY, J.P., JIANG, S.Q., PAULUS, H. An *in vitro* screening system for protein splicing inhibitors based on green fluorescent protein as an indicator. **Anal. Chem**. v.75, n.10, p.2456-62, 2003.

GIACOMINI, E.; IONA, E.; FERRONI, L.; MIETTINEN, M.; FATTORINI, L.; OREFICI, G.; JULKUNEN, I.; COCCIA, E.M. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. **The Journal of Immunol**. v.22, p.7033-41, 2001.

HAJJAR, A. M.; O'MAHONY, D.S.; OZINSKY, A.; UNDERHILL, D.M.; ADEREM, A.; KLEBANOFF, S.J.; WILSON, C.B. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. **J. Immunol**. v.166, p.15–19, 2001.

HART, S.P.; DRANSFIELD, I.; ROSSI, A.G.; Phagocytosis of apoptotic cells. **Methods**. v.44, p.280-85, 2008.

JENSEN-CAIN, D.M. & QUINN, F.D. Differential expression of sig E by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. **Microb. Pathog**. v.30, n.5, p.271-78, 2001.

JIANG, X.; ZHANG, W.; ZHANG, Y.; GAO, F.; LU, C.; ZHANG, X.; WANG, H. Assessment of Efflux Pump Gene Expression in a Clinical Isolate *Mycobacterium tuberculosis* by Real-Time Reverse Transcription PCR. **Microb Drug. Resis**. v. 14, n.1, p.7-11, 2008.

KAIN, S. R.; ADAMS, M.; KONDEPUDI, A.; YANG, T.T.; WARD, W.W.; KITTS, P. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization. **BioTechniques**. v.19, p.650–55, 1995.

KOLATTUKUDY, P.E.; FERNANDES, N.D.; AZAD, A.K.; FITZMAURICE, A.M.; SIRAKOVA, A.T. Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in micobactéria. **Molecular Microbiology**. v.24, p.263-70, 1997.

KOUL, A.; HERGET, T.; KLEBL, B.; ULLRICH, A. Interplay between micobactéria and hos signaling pathways. **Nature Rev. Microbiol.** v.2, p.189-02, 2004.

KREMER, L.; BAULARD, A.; ESTAQUIER, J.; POULAIN-GODEFROY, O.; LOCHT, C. Green fluorescent protein as a new expression marker in mycobacteria. **Mol. Microbiol.** v.17, p.913–22, 1995.

LADEL, C. H.; BLUM, C.; DREHER, A.; REIFENBERG, K.; KOPF, M.; KAUFMANN, S.H. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect. Immun.** v.65, p.4843-49, 1997.

LIEN, E.; SELLATI, T.J.; YOSHIMURA, A.; FLO, T.H.; RAWADI, G.; FINBERG, R.W.; CARROLL, J.D.; ESPEVIK, T.; INGALLS, R.R.; RADOLF, J.D.; GOLENBOCK, D.T. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. **J Biol Chem.** v.274, p.33419–25, 1999.

LIU, G.; WUY, C.; WU, Y.; ZHAO, Y. Phagocytosis of Apoptotic Cells and Immune Regulation. **Journal of Immunology.** v.64, p.1–9, 2006.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Mehtod. **Methods.** v.25, n.3, p.402-08, 2001.

MASTER, S., ZAHRT, T.C., SONG, J., DERETIC, V. Mapping of *Mycobacterium tuberculosis* katG promoters and their differential expression in infected macrophages. **J. bacterial.** v.183, n13, p. 4033-39, 2001.

MATHEMA, B.; KUREPINA, N.E.; BIFANI, P.J.; KREISWIRTH, B.N. Molecular epidmiology of tuberculosis: current insights. **Clinical Microbiol Reviews.** v.19, n.4, p.658-85, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA: **Guia de Vigilância Epidemiológica** (SMS), 2005.

NICOD, L.P. Immunology of tuberculosis. **Swiss Med Wkly.** v.137, p.357–62, 2007.

O'TOOLE, R., SMEULDERS, M.J., BLOKPOEL, M.C., KAY, E.J., LOUGHEED, K., WILLIAMS, H.D. A two component regulator of universal stress protein expression and adaptation to oxygen starvation in *Mycobacterium smegmatis*. **J. bacterial.** v.185, n.5, p.1543-54, 2003.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.46, n.8, p.2720-2, 2002.

PETROFF, A.S. A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from sputum and fess. **The Journal of experimental Medicine.** v.21, p.38, 1915.

PFFYFFER, G.E.; AUCKENTHALER, R.; EMBDEN, J.D.A.; SOOLINGEN, D. *Mycobacterium canetti*, the smooth variant of *M.tuberculosis*, isolated from a swiss patient exposed in Africa. **Emerg. Infect. Dis.** v.4, n.4. p.631-4, 1998.

POVEDA, F.; CAMACHO, J.; ARNALICH, F.; CODOCEO, R.; DEL ARCO, A.; MARTNEZ-HERNANDEZ, P. Circulating Cytokine Concentrations in Tuberculosis and Other Chronic Bacterial Infections. **Infection.** v.27, n.4/5, 1999.

PURKAYASTHA, A., Mc CUE, L.A., Mc DONOUGH, K.A. Identification of a *Mycobacterium tuberculosis* putative classical nitroreductase gene whose expression is coregulated with that of the *acr* gene within macrophages in standing versus shaking cultures, and under low oxygen conditions. **Infect. Immun.** v.70, n.3, p.1518-29, 2002.

QURESH, S.T. & MEDZHITOV, R. Toll-like receptors and their role in experimental models of microbial infection. *Genes and Immunity.* v.4, p,87-94, 2003.

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. **Indian J. Med. Res.** n.120, p.213-32, 2004.

ROBINSON, C.M. &1 NAU, G.J. Interleukin-12 and Interleukin-27 Regulate Macrophage Control of *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Infectious Diseases.** v.198 p.1-8, 2008.

ROHDE, K.; YATES, R.M.; PURDY, G.E.; RUSSELL, D.G. *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. **Immunological Reviews.** v.219, p.37-54, 2007.

RÖLLINGHOFF, M. & STENGER, S. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. **Ann. Rheum. Dis.** v.60, p.43-46, 2001.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001. v.1, p.2-85-4.54.

SAMPSON, S.L., LUKEY, P., WARREN, R.M., WAN HELDEN, P.D., RICHARDSON, M., EVERETT, M.J. Expression, characterization and subcellular localization of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE gene Rv1917c. **Tuberculosis.** v.81, n.5-6, p.305-17, 2001.

SCHLESINGER, L.S.; BELLINGER-KAWAHARA, C.G.; PAYNE, N.R.; HORWITZ, M.A. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement C3. **J Immunol.** v.144, p.2771-80, 1990.

SHINNICK, T. M. & GOOD, R.C. Mycobacterial Taxonomy. **Eur J. Clin Infect. Dis.** v.13, n.11, p.884-901, 1994.

SILVA, C.H.R.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado.** Eventos: Rio de Janeiro, 1999. 285p.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microb. Rev.** v.16, n.3. p.463-90, 2003.

SOOLINGEN, D.; HOOGENBOEZEM, T.; HAAS, P.E.W.; HERMANS, P.W.M.; KOEDAM, M.A.; TEPPEMA, R.S.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S.; PORTAELS, F.; TOP, J.; SCHOULS, L.M.; EMBDEN, J.D.A. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, *canetti*: characterization of an exceptional isolate from Africa. **Intern. J. System Bacteriol.** v.47, n.4. p.1236-45, 1997.

STOKES, R.W., NORIS-JONES, R., BROOKS, D.E., BEVERIDGE, T.J., DOXSEE.D., THORSON, L.M. The Glycan-Rich Outer Layer of the Cell Wall of *Mycobacterium tuberculosis* Acts as an Antiphagocytic Capsule Limiting the Association of the Bacterium with Macrophages. **Infect. Immun.** v.72, n.10, p.5676-86, 2004.

SUPPLY, P.; LESJEAN, S.; SAVINE, E.; KREMER, K.; SOOLINGEN, D.; LOCHT, C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial repetitive units. **Journal of Clinical Microbiology.** v.39, n.10, p.3563-71, 2001.

TELENTI, A.; IMBODEN, P.; MARCHESI, F.; SCHMIDHEINI, T.; BODMER, T. Direct, automated detection of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction and single-strand conformation polymorphism analysis. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.37, n.10, p.2054-8, 1993.

THOMA-USZYNSKI, S.; STENGER, S.; TAKEUCHI, O.; OCHOA, M.T.; ENGELE, M.; SIELING, P.A.; P. BARNES, F.; ROLLINGHOFF, M.; BOLCSKEI, P.L.; WAGNER, M.; AKIRA, S.; NORGARD, M.V.; BELISLE, J.T.; GODOWSKI, P.J.; BLOOM, B.R.; MODLIN. R.L. Induction of direct antimicrobial activity through mammalian Toll-like receptors. **Science.** v.291, p.1544-47, 2001.

TULLIUS, M.V., HARTH, G., HORWICTZ, M.A. High extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. **Infect. Immun.** v.69, n.10, p.6348-63, 2001.

VALDIVIA, R. H., & FALKOW, S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. **Mol. Microbiol.** v.22, p.367–78, 1996.

van CREVEL, R.; OTTENHOFF, H.M.; van der MEEN, J.W.M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiol Reviews.** v.15, n.2, p.294-09, 2002.

van EMBDEN, J.D.A.; CRAWFORD, J.T.; DALE. J.W.; EISENACH, K.D.; GICQUEL, B.; HERMANS, P.; MARTIN, C.; MCADAM, R.; SHINNICK, T.M.; SMALL, P.M. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J. Clin. Microbiol.** v.31, n.2, p.406-9, 1993.

WANG, T.; LAFUSE, W.P.; ZWILLING, B.S. Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. **J. Immunol.** v.165, p.6308-13, 2000.

WONG, K.C.; LEONG, W.M.; LAW, H.K.W.; IP, K.F.; LAM, J.T.H.; YUEN, K.Y.; HO, P.L.; TSE, W.S.; WENG, X.H.; ZHANG, W.H.; CHEN, S.; YAM, W.C. Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. **Clinical and Vaccine Immunol.** v.14, n.10, p.1279-84, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing** (WHO/HTM/TB/2008.393). Report 2008.

YANG, T.J. & CHAE, G.T. Detection of Toll-like receptor 2 (TLR2) mutation in the lepromatous leprosy patients. **Immunol Med Microbiol.** v.31, p.53–58, 2001.

YUAN, Y.; MEAD, D.; SCHROEDER, B.G.; ZHU, Y.; BARRY, C.E. The biosynthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry.** v.273, n.23, p.1282-90, 1998.

YOUMANS, G.P.; **Tuberculosis**. Washington: Saunders, 1979. 511p.

ZAGER, E.M. & McNERNEY, R. Multidrug-resistant tuberculosis. **BMC Infect. Diseases.** v.8, n.10, p.2334-8, 2008.

8 Anexos

Anexo A – Cópia da ficha do aluno

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

9136 - 5579401/1 - Jamile Couto

Email: jamile.couto@usp.br

Data de Nascimento: 23/09/1981

Cédula de Identidade: RG - 30.675.196-3 - SP

Local Nascimento: Estado de São Paulo

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Biologia - Universidade Presbiteriana Mackenzie - - São Paulo - Brasil - 2006

Curso: Mestrado em Farmácia

Área: Análises Clínicas

Data da Matrícula: 17/02/2006

Início da Contagem de Prazo: 17/02/2006

Data Limite: 17/08/2008

Orientador(es): Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 17/02/2006 a 15/02/2007
 E.Mail: dspa@usp.br
 Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 16/02/2007 a -- E.Mail: mhhirata@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 17/02/2006

Exame de Qualificação: Aprovado em 14/02/2008

Data do Depósito do Trabalho:

Data máxima para aprovação da Banca:

Título do Trabalho:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Ocorrência: Última matrícula em 22/07/2008

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Hor.	Cre d.	Freq.	Con c.	Ex c.	Sit. Matric.
FBC5761-5	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	06/03/2006	02/04/2006	60	4	75.00	A	N	Concluída

HEP5732-9	Bioestatística I	09/03/2006	12/04/2006	30	2	100.00	C	N	Concluída
HEP5750-3	Bioestatística II	11/04/2006	18/05/2006	45	3	100.00	C	N	Concluída
BTC5701-5	Metabolismo Microbiano	28/04/2006	29/06/2006	90	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
FBC5757-1	Seminários em Análises Clínicas II	02/08/2006	14/11/2006	30	2	100.00	A	N	Concluída
HEP5765-2	Métodos de Diagnóstico da Tuberculose	11/09/2006	06/10/2006	30	0	0.00	-	N	Pré-matrícula indeferida
BTC5703-4	Biologia Molecular	02/10/2006	14/01/2007	75	5	81.00	A	N	Concluída
FBA5728-2	Aprimoramento Didático	03/10/2006	30/10/2006	60	4	90.00	A	N	Concluída
FBC5716-5	Tuberculose: Métodos Laboratoriais Clássicos e de Biologia Molecular na Detecção, Identificação e no Estudo de resistência de Mycobacterium spp Patogênicos	07/11/2006	28/11/2006	90	6	100.00	B	N	Concluída
HEP5713-4	Epidemiologia e Controle da Tuberculose	06/03/2007	20/04/2007	60	0	0.00	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-8	Seminários em Análises Clínicas	14/03/2007	27/06/2007	30	2	100.00	A	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos	Para Exame de Qualificação	Para Depósito de Dissertação/Tese	Créditos obtidos	
Disciplinas:	25	25	Disciplinas:	28
Atividades Programadas:	0	0	Atividades Programadas:	0
Seminários:	0	0	Seminários:	0
Estágios:	0	0	Estágios:	0
Total:	25	25		28

Créditos Atribuídos à Dissertação : 71

<p>Conceito até 31/12/1996:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; D - Insuficiente, sem direito a crédito; E - Reprovado, sem direito a crédito; I - Incompleto; J - Abandono Justificado; T - Transferência.</p> <p>Conceito a partir de 02/01/1997:</p> <p>A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.</p> <p>Um(1) crédito equivale a (15) horas de atividade programada.</p>

Anexo B – Currículo Lattes

Jamile Couto
Dados Pessoais

Nome: Jamile Couto
CPF: 30651841844

Endereço profissional Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
 Av. Professor Lineu Prestes 580, laboratório de Biologia Molecular
 Aplicado ao Diagnóstico, - São Paulo, 05508-040, SP - Brasil

Endereço eletrônico e-mail para contato: jamile.couto@usp.br

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Mestrado em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico.
 Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
 Título: Estudo de marcadores dos mecanismos de virulência de isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* sensíveis e resistentes aos quimioterápicos vigentes, Ano de obtenção: 2008
 Orientador: Mario Hiroyuki Hirata
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 1999 - 2005** Graduação em Biologia.
 Universidade Presbiteriana Mackenzie, MACKENZIE, São Paulo, Brasil
 Título: Prevalência de Enteroparasitoses em crianças de uma escola de ensino fundamental, ciclo 1, situada no centro da cidade de São Paulo
 Orientador: Professora Doutora Ligia Beatriz Lopes Persoli

Atuação profissional

- 1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP - FCF-USP**
2006 - Vínculo: Mestrado, Enquadramento funcional: Aluno de Pós Graduação, Carga horária: 40, Regime: Dedicação Exclusiva
- 2. Universidade de São Paulo - USP**
2005 - 2006 Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Aprimoramento, Carga horária: 36, Regime: Parcial
- 02/2006 - Atual** Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Linhas de Pesquisa:
Estudo de marcadores dos mecanismos de virulência de isolados clínicos de Mycobacterium tuberculosis sensíveis e resistentes aos quimioterápicos vigentes
- 08/2005 - 01/2006** Estágio, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Estágio:

Estágio realizado no laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico com a finalidade de ingressar na Pós Graduação na mesma área

3. Instituto de Medicina Tropical

2004 - 2005 Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

08/2004 - 07/2005 Estágio, Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina de São Paulo

Estágio:

Iniciação Científica em Parasitologia

4. Instituto Butantan - IBU

2002 - 2004 Vínculo: Estágio, Enquadramento funcional: Iniciação Científica, Carga horária: 20, Regime: Parcial

01/2002 - 03/2004 Estágio, Centro de Biotecnologia

Estágio:

Iniciação Científica

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. COUTO, J., JARED, S. G. S., BASTOS, V. K., PERSOLI, L. B. L.

Ocorrência De Parasitos Intestinais Em Crianças De Uma Escola Estadual De Ensino Fundamental Ciclo I Situada No Centro Da Cidade De São Paulo In: 3 CICAM - Congresso de Iniciação Científica em Ciências, 2005, São Paulo.

Arquivos do Instituto Biológico. São Paulo: 2005. v.72.

2. COUTO, J., BASTOS, V. K., JARED, S. G. S., PERSOLI, L. B. L.

Prevalência de enteroparasitoses em crianças de uma escola estadual de ensino fundamental - ciclo I situada no centro da cidade de São Paulo. In: XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul, 2005, Florianópolis.

XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul. 2005.

3. COUTO, J., BASTOS, V. K., JARED, S. G. S., PERSOLI, L. B. L.

Prevalência De Enteroparasitoses Em Crianças De Uma Escola Estadual De Ensino Fundamental – Ciclo I Situada No Centro Da Cidade De São Paulo In: XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2005, Porto Alegre.

Sociedade Brasileira de Parasitologia. 2005.

4. COUTO, J., JARED, S. G. S., BASTOS, V. K., PERSOLI, L. B. L.

Prevalência de enteroparasitoses em crianças da escola estadual Professora Marina Cintra (ensino fundamental - ciclo 1) situada no centro da cidade de São Paulo In: V Encontro de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação, 2004, São Paulo.

V Encontro de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação. 2004.

5. COUTO, J., GRELLET, S., LEITE, L.

Expressão de Antígenos de Superfície de Pneumococo (PspA) em BCG recombinante.

In: Encontro Anual do Instituto Butantan, 2002, São Paulo.

Encontro Anual do Instituto Butantan. 2002.

Eventos

Participação em eventos

1. **Real Time PCR: Users Meeting**, 2007.
2. **Métodos de extração de ácidos nucleicos. I Curso de atualização em biologia molecular aplicada ao diagnóstico**. 2006.
3. **I Curso teórico de atualização em biologia molecular aplicada ao diagnóstico**. 2006.
4. **Real Time PCR: Users Meeting**. 2006.
5. **Congresso Paulista de Farmacêuticos**. 2007.
6. **Toll-Like Receptor Expression in a Model of Growth Hormone-Induced Glomerulosclerosis**. 2007.
7. **VII Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**. 2007.
8. **Cloning and Gene Expression Techniques: Fundamentals and Applications**. 2006.
9. **Novas Estratégias para Reparação Cardíaca Baseadas em Terapia Gênica/Celular**. 2006.
10. **VI Simpósio de Biossegurança e Descartes De Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2006.
11. **Atualização em Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico**, 2006.
12. **XLI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - I Encontro de Medicina Tropical do Cone Sul**, 2005.
13. **XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia**, 2005,
14. **3 CICAM - Congresso de Iniciação Científica em Ciências**, 2005.
15. **Análises de lesões em biomoléculas (aductos) como ferramenta para elucidação de mecanismos de toxicidade e avaliação da exposição de xenobióticos**, 2005.

16. **Aplicação de técnicas multivariadas em meta-análises envolvendo alimentos funcionais**, 2005.
17. **Métodos modernos para separações enantioméricas**, 2005.
18. **Recuperação de poluentes prioritários de soluções aquosas por extração líquido-líquido com tratamento simultâneo de gases ácidos**, 2005.
19. **V Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2005.
20. **O gene supressor de tumor e metástase Reck e seu potencial para marcador diagnóstico**, 2005.
21. **V Encontro de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pós-Graduação**, 2004.
22. **Atualização em Parasitoses Humanas: Toxoplasmose, Leishmaniose e Malária**, 2003.
23. **Encontro Anual do Instituto Butantã**, 2002.
24. **XVIII Semana das Ciências - Ecossistemas Marinhos**, 1999.
25. **XVIII Semana das Ciências - Manejo de plantas medicinais em Mata Atlântica**, 1999.