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

Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* uni e multi-drogas resistentes

Walkíria de Araújo Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profº. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2011

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

Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* uni e multi-drogas resistentes

Walkíria de Araújo Souza

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profº. Titular Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Souza, Walkíria de Araújo
S729a Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos
infectados por *Mycobacterium tuberculosis* uni e multi-drogas
resistentes / Walkíria de Araújo Souza. -- São Paulo, 2011.
82p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

I. Droga : Resistência em microorganismo : Microbiologia
médica I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.01 CDD

Walkíria de Araújo Souza

Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por
Mycobacterium tuberculosis uni e multi-drogas resistentes

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/ Presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 20 de Dezembro de 2011.

Dedico esse trabalho,

*Ao Deus Pai, criador de todas as coisas,
A Jesus Cristo, meu salvador, e
Ao Espírito Santo, meu melhor amigo e consolador.*

*Aos meus amados pais,
Vanderlei e Josilda,
por todo amor, incentivo e dedicação.*

Agradecimentos

Ao Deus soberano, pela dádiva da vida, por todo amor e cuidado para comigo durante toda a caminhada da minha vida. Eu o louvo e o glorifico, pois foi ELE que me sustentou e me deu forças para seguir em frente e superar os obstáculos que surgiram nessa jornada.

Aos meus queridos pais que, mesmo estando distantes durante esse tempo, nunca me desampararam. Vocês são presentes de Deus para minha vida e eu não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Obrigada por todo amor, dedicação, incentivo, investimento e esforços sem limite para proporcionar sempre o melhor para mim. Amo muito vocês.

Ao Prof. Tit. Mario H. Hirata, meu orientador, que mesmo sem me conhecer abriu a porta do seu laboratório para mim. Obrigada pela oportunidade, incentivo e ensinamentos.

À Prof^ª Tit. Rosário D. C. Hirata, pelo exemplo de determinação e dedicação à pesquisa.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome de seu Diretor, Prof. Tit. Jorge Mancini Filho.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em nome do seu Chefe, Prof^ª Marina Baquerizo Martinez.

À Prof^ª Tit. Primavera Borelli, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Análises Clínicas, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, em especial aos meus amigos do grupo TB (Gisele Medeiros Bastos, Gabriela Guimarães e Joás Lucas Silva), pelo apóio, ensinamentos e amizade. Obrigada, vocês foram muito importantes na realização e concretização desse trabalho, pois sem a amizade de vocês tudo teria sido mais difícil.

Ao meu amigo do Laboratório de Imunologia das Parasitoses do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Eduardo Pinheiro Amaral, por todo ensinamento, apóio e ajuda sem medida. Sem palavras pra você amigo.

À Cristina Moreno Fajardo, técnica do laboratório LBMAD, pela paciência, dedicação e disposição em nos ajudar sempre. Muito obrigada.

A todos os funcionários da Universidade de São Paulo, em especial aos que fazem o Departamento de Análises Clínicas, que trabalham por trás dos bastidores e nem por isso são menos importantes.

À Pro^{fa} Daisy Nakamura Sato que doou os isolados clínicos utilizados nesse estudo. Obrigada também pelo apóio e sugestões.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apóio financeiro concedido para a realização do presente trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida.

A todos os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por *Mycobacterium tuberculosis* uni e multi-drogas resistentes

A Tuberculose é uma das doenças infecciosas mais antiga e bem descrita. Entretanto, ainda permanece como um dos principais problemas de saúde pública a ser enfrentado em âmbito global. A implantação de novas estratégias no controle da Tuberculose requer uma melhor compreensão dos mecanismos que sucedem a fagocitose das micobactérias por macrófagos. Após a fagocitose, as micobactérias dão início a um conjunto de ações para sobreviverem e se replicarem no ambiente intracelular, entre as quais a provável interferência no processo de morte celular. Estudos mostram que *M. tuberculosis* pode apresentar habilidade de interferir no mecanismo de morte celular. Essa habilidade se tornou um desafio a ser estudado devido às implicações que isso deve ter na patogênese da doença. O nosso estudo teve por objetivo analisar a expressão de genes anti-apoptóticos (*bcl-2*, *bcl-x* e *mcl-1*) e pro-apoptóticos (*bak*, *bax* e *bid*) por PCR em tempo Real em macrófagos humanos derivados de células THP-1 após diferenciação induzida por PMA. Além disso, analisar a porcentagem de fragmentação de DNA nesses macrófagos, utilizando a citometria de fluxo, pois a fragmentação internucleossômica do DNA é uma das características apresentadas por células apoptóticas. Para as infecções foram utilizados isolados clínicos de *M. tuberculosis* com perfil de suscetibilidade a fármacos diferentes e a cepa padrão H37Rv (ATCC). Os dados de expressão foram analisados pela diferença de entre os isolados clínicos sensíveis, resistentes a três dos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose humana e a cepa padrão H37Rv, utilizando-se o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para comparar os resultados de expressão gênica, bem como a porcentagem de fragmentação de DNA, nos macrófagos infectados com os diferentes isolados clínicos, foram utilizadas análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados sugerem, que os isolados clínicos resistentes a INH, RIF e EMB utilizados no nosso estudo, bem como a cepa padrão H37Rv (ATCC), não induzem mecanismos anti-apoptóticos para evadir da resposta imune. A ocorrência de fragmentação de DNA nos macrófagos infectados é um indicativo de morte por apoptose ou pyroptose. Além disso, o tempo de infecção é um fator importante e, com certeza, infecções com tempos maiores poderiam induzir ainda mais a morte dos macrófagos infectados.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, Bcl-2, apoptose.

ABSTRACT

Analyse of genes expression of the Bcl-2 family in macrophages infected for uni and multi-drugs resistance *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberculosis, an ancient infection disease, continues to thrive. Although well described, it remains a world health problem to overcome. The development and application of new strategies to control Tuberculosis requires a better understanding of mechanisms involved in mycobacteria-macrophages interaction. Following phagocytosis, mycobacteria initiates a variety of actions to survive and multiply themselves inside macrophages. According to researches, mycobacteria might interfere in the cell death mechanism. This ability became a challenge to be studied due to its implications in the pathogenesis of the disease. The aim of this study was to analyze the gene expression of anti-apoptotic (*bcl-2*, *bcl-x* e *mcl-1*) and pro-apoptotic genes (*bak*, *bax* e *bid*) in PMA-treated THP-1 cells by Real Time qPCR. Moreover, the percentage of macrophage DNA fragmentation was assessed by flow cytometry because internucleosomal DNA fragmentation is characteristic of apoptotic and pyroptotic cell death. The infection was carried out using clinical isolates of *M. tuberculosis* resistant to multiple drugs, drug susceptibility and the *M. tuberculosis* H37Rv strain. The difference in the expression profile among clinical isolates, susceptible and resistant to three drugs used in the TB treatment, and the *M. tuberculosis* H37Rv were evaluated with the method $2^{-\Delta\Delta CT}$. In order to compare gene expression patterns as well as the percentage of DNA fragmentation in macrophages infected with different clinical isolates, it was used analysis of variance (ANOVA) and Tukey's multiple comparison test. The results suggest that *M. tuberculosis* H37Rv and the clinical isolates presenting higher drug resistant profile might induce programmed cell death in macrophages after 24-h infection. This was observed in the gene expression pattern and also in the macrophage DNA fragmentation profile, which identifies apoptosis or pyroptosis. Therefore, it is suggested these clinical isolates and *M. tuberculosis* H37Rv do not present anti-apoptotic mechanisms to evade immune response. Moreover, the infection time is an important factor and, definitely, infections for long time could induce increase death of the infected macrophages.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Bcl-2, apoptosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIF	Fator de indução de apoptose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
AMI	Amicacina
CAP	Capreomicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
DO	Densidade Óptica
EMB	Etambutol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETH	Etionamida
FasL	Fas ligante
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IAP	Proteína inibidora de apoptose
INH	Isoniazida
KAN	Kanamicina
LJ	Lowenstein-Jensen
MDR-TB	Tuberculose multidrogaressistente
MGB	<i>Minor groove binding</i>
MHA	Muller Hinton Agar
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
OADC	Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia pela polimerase

PI	Iodeto de propídeo
PMA	Acetado de Forbol Miristato
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Transcrição Reversa seguida da PCR
SDHA	Succinato desidrogenase
TB	Tuberculose
THP-1	Macrófagos humanos derivados de pro-monócitos
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor de Fator de necrose tumoral
UBC	Ubiquitina
UFC	Unidade Formadora de Colônia

ÍNDICE DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Esquema de sinalização da via intrínseca e extrínseca da apoptose.	20
Figura 2	Representação esquemática dos efeitos de BCL-2, MCL-1, BID e BCL-XL no ciclo celular.	28
Figura 3	Perfil eletroforético de amostra de RNA total concentrado analisado em <i>Bioanalyzer</i> .	35
Figura 4	Esquema representativos dos experimentos realizados no nosso estudo.	41
Figura 5	Microfotografia de THP-1 diferenciadas para macrófagos, infectadas com <i>M.tuberculosis</i> .	42
Figura 6	Microfotografia das células THP-1, após os respectivos tempos de infecção com H37Rv (ATCC) e coloração por <i>Ziehl-Neelsen</i> .	43
Figura 7	Gráficos da Expressão Relativa dos genes anti-apoptóticos e pro-apoptóticos da família Bcl-2.	45
Figura 8	Gráficos da porcentagem de fragmentação de DNA dos controles positivo e negativo.	49
Figura 9	Gráficos da porcentagem de fragmentação de DNA dos macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i> .	50

ÍNDICE DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Perfil de suscetibilidade aos fármacos dos isolados clínicos utilizados.	34
Tabela 2	Sequência de oligonucleotídeos iniciadores e das sondas utilizados na PCR em tempo real.	38
Tabela 3	Valores de inclinação da curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real.	44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Epidemiologia e Tratamento da Tuberculose.....	14
1.2. <i>M. tuberculosis</i> resistentes às drogas	15
1.3. <i>M. tuberculosis</i> e Apoptose.....	17
1.4. Ciclo celular e sua regulação por proteínas da família BCL-2	22
2. OBJETIVOS	29
2.1. Objetivo Geral	29
2.2. Objetivos Específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Amostras micobacterianas.....	30
3.2. Cultivo dos isolados clínicos de <i>M. tuberculosis</i>	30
3.3. Cultura de células	31
3.3.1. Descongelamento de células.....	31
3.3.2. Cultivo das células THP-1	32
3.3.3. Congelamento de células	32
3.3.4. Diferenciação das células THP-1.....	33
3.4. Infecção dos macrófagos com <i>M. tuberculosis</i>	34
3.5. Extração, avaliação da integridade e quantificação de RNA.....	35
3.6. PCR em tempo Real	36
3.7. Análise de Fragmentação Nuclear por Citometria de Fluxo.....	40
3.8. Análise Estatística.....	41
4. RESULTADOS	42

4.1. THP-1 diferenciadas para macrófagos.....	42
4.2. Avaliação do tempo de fagocitose da <i>M. tuberculosis</i> pelos macrófagos	42
4.3. Teste de Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real	43
4.4. Expressão gênica relativa em macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	44
4.5. Análise da Fragmentação Nuclear por Citometria de Fluxo	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia e tratamento da Tuberculose

A tuberculose (TB) afeta a humanidade há pelo menos 8.000 anos. Até a metade do século XIX o caráter infecto-contagioso da tuberculose não era reconhecido e a doença era atribuída a diversas causas como a hereditariedade e a outros determinantes ambientais e sociais. Em 1882, Robert Koch identificou *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) como agente etiológico da TB, caracterizando-a como uma doença infecciosa (RODRIGUES *et al.*, 2007).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), a TB se mantém como um dos principais problemas de saúde pública enfrentado em âmbito global, sendo a segunda causa de morte entre as doenças infecciosas do mundo. Em 2010, foram registrados 8,8 milhões de casos incidentes de TB, ocorrendo 1,1 milhão de mortes entre pessoas HIV negativas e 0,35 milhões de mortes entre pessoas HIV positivas (WHO, 2011).

Com relação ao Brasil, a OMS mostra que houve uma redução na incidência de TB e uma melhora na sua posição na lista dos países com maior número de casos. A OMS revela que o Brasil passou de 18º para 19º posição e está próximo de sair da lista dos 22 países que concentram 80% dos casos de Tuberculose no mundo (WHO, 2011).

A TB afeta principalmente os pulmões (TB pulmonar), mas também pode afetar outros órgãos, caracterizando a TB extrapulmonar. A transmissão se dá através do ar quando uma pessoa com TB pulmonar expulsa o bacilo durante a tosse. Em geral, uma proporção relativamente pequena de pessoas infectadas com o bacilo irá desenvolver a doença, entretanto a probabilidade de desenvolver TB é alta em pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WHO, 2011).

1.2. *M. tuberculosis* resistente às drogas

A estratégia de controle da TB é elaborada por programas governamentais e consiste, basicamente, no diagnóstico e tratamento a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença. No Brasil, o II Inquérito Nacional de Resistência aos Fármacos anti-TB, realizado no período de 2007-2008, mostrou, em relação ao primeiro Inquérito (1997), um aumento na taxa de resistência primária à isoniazida (INH) de 3,5% para 6% e, à rifampicina (RMP), de 0,2% para 1,5%. Estes fatores levaram o Programa Nacional de Controle da Tuberculose a acrescentar o etambutol (EMB) no esquema inicial (INH, RMP e pirazinamida, PZA), com o objetivo de eliminar o risco de falência e de recidiva nos pacientes com resistência primária à INH e RMP. Este esquema já é utilizado em muitos países há alguns anos e o tempo de tratamento é de seis meses. Por ser um tratamento complexo e demorado a taxa de abandono é alta e pode resultar no surgimento de formas resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETI *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Na clínica, a resistência bacteriana pode ser classificada como: intrínseca, quando o paciente é infectado com cepas naturalmente resistentes, e adquirida, quando bactérias resistentes são selecionadas após um tratamento ineficiente (ZHANG & YEW, 2009).

Mutações no genoma de *M. tuberculosis* que pode conferir resistência a drogas anti-tuberculose ocorrem espontaneamente com uma frequência estimada de $3,5 \times 10^{-6}$ para INH e $3,1 \times 10^{-8}$ para RMP. Como o loci cromossomal responsável pela resistência a vários fármacos não são ligados, o risco de mutação duplo espontânea é extremamente baixo, 9×10^{-14} tanto para INH como para RIF (DOOLEY & SIMONE, 1994).

M. tuberculosis multi-drogas resistentes (MDR-TB) é caracterizado como resistência a pelo menos INH e RIF, e pode surgir em consequência de um tratamento ineficaz, dentre outros (ZHANG & YEW, 2009).

A resistência aos fármacos da primeira linha de tratamento contra TB está associada a mutações em pelo menos 10 genes: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *KasA* e *ndh* para resistência a INH; *rpoB* para resistência a RMP; *embB* para resistência a EMB; *pncA* para resistência a PZA, e *rpsL* e *rrs* para resistência a estreptomicina (STR) (ZHANG *et al.*, 1992; RAMASWAMY & MUSSER, 1998; SAYLDEN & BARRY, III, 2000).

Os fármacos utilizados na segunda linha de tratamento da TB são a kanamicina (KAN), amicacina (AMI), capreomicina (CAP), etionamida (ETH), dentre outros. Estes são mais tóxicos e menos eficientes que os fármacos utilizados na primeira linha (OMS, 2001). A segunda linha é usada principalmente para o tratamento de MDR-TB, prolongando o tratamento de 6 para 9 meses. A resistência aos fármacos da segunda linha de tratamento está associada a mutações nos genes: *gyrA* (DNA girase), *rrs* (16S rRNA), *inhA* (Enoyl-ACP redutase), *ethA* (Flavina monooxygenase), *ethR* (Repressor transcrricional), *air* (D-alanina racemase), *ddl* (D-alanina e D-alanina ligase) e *rrS* (16S rRNA) (CHENG *et al.*, 2004).

Diante da emergência de cepas MDR-TB, mais esforços são necessários para melhor compreender os mecanismos moleculares de resistência aos fármacos anti-TB nos isolados clínicos. O uso de métodos moleculares para identificar mutações em genes que conferem resistência podem ser meios rápidos para identificar isolados de *M. tuberculosis* resistentes (VERNET *et al.*, 2004).

1.3. *M. tuberculosis* e Apoptose

M. tuberculosis é um patógeno intracelular que infecta os macrófagos alveolares. Após a fagocitose, bactérias não virulentas são degradadas pela acidificação do vacúolo fagocítico e pela fusão subsequente com lisossomos que contém hidrolases ativas em pH ácido (LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

Por outro lado, cepas virulentas são capazes de impedir a captação de ATP pela bomba de prótons na membrana do fagossomo e sua fusão com o lisossomo. Assim, o vacúolo fagocítico passa a apresentar características de um endossomo primário, onde *M. tuberculosis* fica protegida e com um ambiente favorável para sua multiplicação (FLYNN and CHAN, 2001; LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

A apoptose é uma morte celular programada, considerada uma importante estratégia na defesa do sistema imune contra parasitas intracelulares. Essa morte celular em resposta ao parasitismo intracelular por vírus é um paradigma bem estabelecido na biologia (ROULSTON, MARCELLUS and BRANTON, 1999). Muitos patógenos virais codificam genes cujos produtos suprimem a apoptose da célula hospedeira e com isso sustentam o nicho de replicação viral (CLOUSTON and KERR, 1985; CLEM, FECHHEIMER and MILLER, 1991; RAY *et al.*, 1992; ZYCHLINSKY, 1993; MCCORMICK, 2008). A extensão desse paradigma para o patógeno intracelular bacteriano é mais recente, mas um grande número de casos tem sido identificado, entre eles a infecção do macrófago por *M. tuberculosis* (LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

Enquanto alguns estudos sugerem algumas condições em que a *M. tuberculosis* pode induzir a apoptose da célula hospedeira (ROJAS *et al.*, 1997; DANELISHVILI *et al.*, 2003; SCHAIBLE *et al.*, 2003; DERRICK and MORRIS, 2007), há um grande número de evidências apontam firmemente a expressão de mecanismos anti-apoptóticos pela *M. tuberculosis* e outros relatam

minuciosamente sobre a virulência da bactéria (VELMURUGAN *et al.*, 2007). Além disso, essa capacidade não é observada em espécies não virulentas, sugerindo uma relação entre a virulência da micobactéria e a inibição da apoptose dos macrófagos (ODDO *et al.*, 1998; KEANE *et al.*, 2000; SLY *et al.*, 2003).

Após a fagocitose da *M. tuberculosis* o processo de apoptose dos macrófagos pode ser iniciado (KEANE *et al.*, 1997; DANELISHVILI *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005). Esse processo é importante para beneficiar o hospedeiro, uma vez que está associado com a diminuição da sobrevivência da micobactéria presente no macrófago apoptótico (MOLLOY, LAOCHUMROONVORAPONG and KAPLAN, 1994; ODDO *et al.*, 1998) e com o aumento da capacidade de células dendríticas apresentadoras de antígenos fagocitar moléculas apoptóticas (WINAU, KAUFMANN and SCHAIBLE, 2004).

A apoptose de macrófagos é abundante em granulomas humanos, todavia micobactérias virulentas estimulam menos a apoptose do que as não virulentas (KEANE *et al.*, 1997; DANELISHVILI *et al.*, 2003). O bloqueio da apoptose parece ser um mecanismo virulento que está associado com a super expressão de genes anti-apoptóticos como *bcl-2*, *mcl-1* e com a redução da expressão de genes pro-apoptóticos como *bax* (MOGGA *et al.*, 2002; SLY *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005).

A apoptose pode ser ativada por várias vias distintas, dentre elas se destacam a via intrínseca e a via extrínseca das caspases. A via intrínseca é induzida por estresse intracelular, tal como: danos no DNA, falta de nutrientes, infecções e estresse oxidativo. Esses aumentam a permeabilidade da membrana externa mitocondrial, permitindo a translocação citosólica do citocromo C. No citosol, o citocromo C se associa com a procaspase-9 e o fator-1 de ativação da protease apoptótica, que forma um sinal complexo chamado apoptossomo (RIEDL and SALVESEN, 2007). A CASPASE-9 ativada desencadeia uma cascata de

reações que culmina na ativação da caspase efetora e na indução da apoptose (LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

A permeabilidade mitocondrial é controlada pela ação integrada de proteínas da família BCL-2 pro-apoptóticas e anti-apoptóticas (YOULE and STRASSER, 2008). As proteínas pro-apoptóticas BAX E BAK formam poros na membrana externa da mitocôndria, permitindo que o citocromo C seja liberado. Já as proteínas anti-apoptóticas, incluindo BCL-2, BCL-X e MCL-1 desempenham uma função contrária a essa (LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

O destino da célula é determinado pelo equilíbrio entre a expressão de proteínas anti-apoptóticas e proteínas pro-apoptóticas (KAYAGAKI *et al.*, 1995; KIENER *et al.*, 1997). A proteína pro-apoptótica da família BCL-2 denominada de BID é ativada por clivagem enzimática. Uma vez ativada, a proteína BID é responsável por coordenar a atividade de BAX e BAK para promover a liberação do citocromo C da mitocôndria. A clivagem de BID pode ser mediada por várias proteases, sendo essa uma característica marcante da via intrínseca. A CASPASE-8 também pode clivar e ativar BID, permitindo a ligação cruzada entre a via apoptótica intrínseca e a extrínseca (LEE, HARTMAN and KOMFELD, 2009).

Figura 1: Esquema de sinalização da via intrínseca e extrínseca da apoptose (DUPREZ *et al.*, 2009).

A via apoptótica extrínseca envolve a estimulação de receptores de morte celular, sendo induzida pela ligação e oligomerização de receptores da superfície celular da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), incluindo TNFR1 e Fas, entre outros, e por seus ligantes TNF- α e Fas ligante (FasL), respectivamente (CHEN and WANG, 2002). FasL é expresso tanto na superfície da célula como intracelularmente e pode existir, ainda, na forma solúvel (KAYAGAKI *et al.*, 1995; KIENER *et al.*, 1997).

Um sinal complexo de indução de morte é formado pelo recrutamento de domínios de morte associados a Fas e os iniciadores procaspases-8 ou procaspases-10 que são ativados por esse sinal. Estas caspases iniciadoras acionam uma cascata através de um processo proteolítico de seus precursores zimogênicos, terminando com a ativação de uma caspase efetora, incluindo CASPASE-3, CASPASE-6 e CASPASE-7, cuja função, juntamente com outras enzimas, resulta na condensação do núcleo, clivagem do DNA e formação de vesículas apoptóticas (TAYLOR, CULLEN and MARTIN, 2008).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que pode apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. Posteriormente, a membrana forma prolongamentos (*blebs*) e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam em número e tamanho e rompem, originando estruturas contendo o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem causar um processo inflamatório (ZIEGLER & GROSCURTH, 2004).

Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Esse padrão é ocasionado por uma endonuclease que é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de base (SARASTE & PULKKI, 2000).

Alguns estudos realizados em lesões pulmonares de camundongos mostraram que a *M. tuberculosis* H37Rv, que é uma cepa bem caracterizada e considerada padrão, pode influenciar na expressão de proteínas reguladoras da apoptose, por causar o aumento da expressão de FasL e BCL-2 em macrófagos infectados. Este mecanismo permite que a micobactéria possa inibir a apoptose em células infectadas através da expressão do gene *bcl-2*, e estas células poderão escapar da ativação e morte pela expressão linfocitária de Fas e pelo aumento da expressão de FasL (MUSTAFA *et al.*, 1999; MUSTAFA *et al.*, 2001; MOGGA *et al.*, 2002).

1.4. Ciclo Celular e sua regulação por proteínas da família BCL-2

A dinâmica de uma célula pode ser compreendida examinando-se o curso de sua vida. Uma nova célula surge quando outra se divide ou quando duas células se fundem. Ambos os eventos têm seu início em um programa de replicação celular. Esse programa geralmente envolve um período de crescimento celular, durante o qual proteínas são construídas e o DNA é replicado, seguido pela divisão celular, quando uma célula se divide em duas células filhas. Essa seqüência ordenada de eventos, que duplicam os componentes de uma célula e depois a dividem em duas, constitui um ciclo, conhecido como ciclo celular, que é o mecanismo essencial pelo qual todos os seres vivos se reproduzem (LODISH *et al.*, 2000).

O progresso oportuno do ciclo de divisão celular assegura a transmissão correta da informação genética de uma célula mãe para suas células filhas. Uma vez estimuladas em um ambiente adequado com fatores de crescimento apropriados, as células quiescentes saem da fase G0 do ciclo celular e entram na fase G1 que antecede a replicação de DNA ou fase de síntese (S), seguida pela fase G2 e a fase de divisão celular ou mitose (M) (SCHMITT *et al.*, 2007).

A homeostasia do tecido requer o balanço cuidadosamente orquestrado entre a proliferação, senescência e morte da célula. A proliferação da célula é uma atividade rigorosamente regulada por quinases dependente de ciclinas. A senescência é um programa de proteção que limita a capacidade proliferativa das células num organismo vivo e ocorre por meio de uma programação genética que envolve a deterioração dos telômeros e a ativação de genes supressores de tumor. A apoptose elimina células indesejadas através da atividade coordenada por produtos gênicos que regulam e desencadeiam a morte da célula (SCHMITT *et al.*, 2007).

Durante muito tempo, a morte celular foi considerada um processo passivo de caráter degenerativo, que ocorre em situações de lesão celular, infecção e ausência de fatores de crescimento. Como consequência, a célula altera a integridade da membrana plasmática, aumenta o seu volume e perde as suas funções metabólicas (YU & CHOI, 2000). Entretanto, nem todos os eventos de morte celular são processos passivos. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares e extracelulares (HENGARTNER, 2000).

Captadores de danos no DNA e vias de sinalização, referidas como sistema de resposta aos danos no DNA, estão ligados a proliferação celular, detenção do ciclo celular, senescência celular e apoptose. As respostas aos danos no DNA são complexas e envolvem proteínas que captam os danos e transmitem os sinais a proteínas transdutoras que, por sua vez, vão transmitir os sinais a numerosas proteínas efetoras envolvidas em vias celulares específicas, incluindo vias de mecanismos de reparos, pontos de checagem do ciclo celular, senescência celular e apoptose (SCHMITT *et al.*, 2007).

As proteínas da família BCL-2 estão entre as principais proteínas reguladoras da apoptose e, portanto, desempenham funções vitais para vida ou morte da célula. O gene *bcl-2* foi identificado no linfoma folicular humano

(CLEARY *et al.*, 1986) e codifica a proteína BCL-2 que pertence a uma grande família de proteínas reguladoras da apoptose e promovem a sobrevivência ou facilitam a morte da célula. Os membros da família BCL-2 possuem pelo menos um dos quatro domínios conservados, conhecidos como domínios de homologia a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4) (SCHMITT *et al.*, 2007).

De acordo com Ponting e Russel (2002), domínios são polipeptídeos com mais de uma centena de resíduos de aminoácidos que se enovelam em duas ou mais unidades globulares estáveis e estão relacionados com a função da proteína.

As proteínas anti-apoptóticas BCL-2, BCL-X e MCL-1 possuem os quatro domínios BH (CLEARY *et al.*, 1986). As proteínas pro-apoptóticas BAK e BAX são compostas pelos domínios BH1, BH2 e BH3 (BOISE *et al.*, 1993), enquanto a proteína pro-apoptótica Bid possui apenas o domínio BH3 (GUO *et al.*, 2001).

As várias funções homologas das proteínas BCL-2, pelo menos em parte, através da interação proteína-proteína, formam um complexo sistema dinâmico de homodímeros e heterodímeros, dependendo do ambiente celular e da localização subcelular (SCHMITT *et al.*, 2007).

Alguns estudos sugerem que o potencial de dimerização de proteínas semelhantes a BCL-2 é influenciado pelas combinações específicas dos domínios BH (CHITTENDEN *et al.*, 1995; KELEKAR & THOMPSON, 1998; YIN *et al.*, 1994). A heterodimerização entre proteínas pro-apoptóticas e anti-apoptóticas pode neutralizar uma outra atividade, sugerindo que a concentração relativa de um fator versus o outro pode influenciar na suscetibilidade da célula a um sinal de morte (OLTVAI *et al.*, 1993; SEDLAK *et al.*, 1995).

O domínio proteico BH3 tem grande capacidade de ligação e por isso se tornou um potente mediador de morte, sendo, freqüentemente, requerido para atividade de morte da célula (POLSTER *et al.*, 2001). Dois modelos diferentes têm

sido propostos para explicar a atividade de morte de proteínas com um único domínio BH3. O modelo de ativação direta, em que proteínas com um único domínio, BH3, se ligam a proteínas inibidoras da apoptose (BCL-2, BCL-X, MCL-1, dentre outras) ou a agonistas de morte, tais como proteínas com múltiplos domínios como BAK e BAX, que são ativadas e exercem suas atividades pro-apoptóticas em nível mitocondrial (ADAMS & CORY, 2007).

O modelo de ativação indireta sugere que proteínas com um único domínio, BH3, se ligam a proteínas anti-apoptóticas e atuam impedindo a inibição da ativação de BAK e BAX por essas proteínas (CHEN *et al.*, 2005; WILLIS *et al.*, 2005; 2007).

Na ausência de sinais de morte, geralmente os membros da família BCL-2 se localizam em diferentes compartimentos celulares. As proteínas anti-apoptóticas, como BCL-2 e BCL-X, geralmente se localizam na face citoplasmática da membrana externa da mitocôndria, retículo endoplasmático e envelope nuclear (ZAMZAMI *et al.*, 1996). Em contraste, as proteínas que induzem a morte, tais como BAX, BAD e BID permanecem livres nas células não estimuladas, exceto a proteína de multidomínio BAK, que se localiza constitutivamente na membrana externa da mitocôndria (KORSMEYER *et al.*, 2000).

Após um sinal de morte, a proteína pro-apoptótica multidomínio, BAX, sofre uma mudança conformacional a qual lhe garante a capacidade de se inserir na membrana intracelular, especialmente da mitocôndria. O domínio transmembrana parece ser importante para conferir capacidade tanto para as proteínas pro-apoptóticas como para as anti-apoptóticas se inserir na membrana, bem como para promover a estabilidade dessas proteínas. Porém, alguns estudos mostram que a deleção desse domínio não anula a função da maioria das proteínas da família BCL-2 (BORNER *et al.*, 1994; NGUYEN *et al.*, 1994).

A regulação da permeabilidade da membrana mitocondrial é o principal mecanismo que as proteínas da família BCL-2 desempenham para regular a apoptose da célula. Como os múltiplos sinais de estímulo de morte convergem na mitocôndria, esta representa o centro do controle da vida ou da morte através da liberação, ou não, de fatores apoptóticos no citosol. Essas moléculas que induzem a morte estão localizadas no espaço intermembrana da mitocôndria e incluem o citocromo C (YANG *et al.*, 1997), DIABLO/Smac (um fator que promove a ativação de caspases por atuar em proteínas inibidoras da apoptose, IAP) (DU *et al.*, 2000), um fator de indução da apoptose (AIF) que ativa nuclease, dentre outros (SUSIN *et al.*, 1996).

A permeabilização da membrana externa da mitocôndria é seguida pela ativação de CASPASE 9 e apoptose irreversível. As proteínas da família BCL-2 podem controlar a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria por três modelos pré-estabelecidos: primeiro, pela formação de canais autônomos na membrana; segundo, por interferir na permeabilidade dos poros mitocondriais; e, finalmente, por promover alterações dinâmicas na estrutura da bicamada lipídica (EPAND *et al.*, 2002; KUWANA *et al.*, 2002).

As proteínas anti-apoptóticas exercem suas funções inibindo as proteínas pro-apoptóticas de iniciarem a formação de poros na membrana externa da mitocôndria. De acordo com Shimizu *et al.* (1998), a proteína BCL-2 inibe potencialmente a apoptose por estimular o efluxo de H^+ da mitocôndria, preservando o potencial transmembrana da mitocôndria (SCHMITT *et al.*, 2007).

Além disso, as proteínas anti-apoptóticas também podem proteger as células da morte por inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (KANE *et al.*, 1993), por impedir a acidificação intracelular (GOTTLIEB *et al.*, 1996), por aumentar o cálcio mitocondrial (SUSIN *et al.*, 1996) e por promover a estabilização da membrana em que elas estão inseridas (VANDER HEIDEN *et al.*, 1997).

No primeiro modelo de controle de permeabilidade da membrana mitocondrial, as proteínas da família BCL-2 modulam a permeabilização da membrana sem alterar a função mitocondrial, ou seja, tanto o potencial transmembrana como a produção de ATP são mantidos. Isso é importante, pois na ausência de ATP o apoptossomo não é formado, a CASPASE 9 não é ativada e as células tendem a morrer por necrose e não por apoptose (CHAUTAN *et al.*, 1999; NICOTERA *et al.*, 1999).

Em adição a sua função central no controle de morte da célula, alguns estudos têm relacionado às proteínas da família Bcl-2 com a progressão do ciclo celular. Primeiramente, a proteína BCL-2 parece atrasar a entrada da fase quiescente G0 para a fase G1, que antecede a replicação de DNA, em linhagens de células e em camundongos transgênicos (**Figura 2**). Em contraste, células *knockout* para BCL-2 entram na fase S mais rapidamente. Esse efeito de BCL-2 na proliferação celular é geneticamente distinto de sua função na apoptose (BORNER, 1996; DOMEN *et al.*, 2000; VAIL *et al.*, 2002)

Com relação a outras proteínas da família BCL-2 e seus efeitos no ciclo celular, sabe-se que a proteína anti-apoptótica MCL-1 inibe a progressão da fase S (FUJISE *et al.*, 2000). Alguns estudos recentes mostraram a função da proteína pro-apoptótica BID nos pontos de checagem da fase S, após o estresse replicativo induzido por agentes que causam danos ao DNA (ZINKEL *et al.*, 2005; KAMER *et al.*, 2005). A forma isomérica de BCL-X, a BCL-XL, interage e inibe potencialmente a atividade de quinases promovendo uma estabilização no ponto de checagem do ciclo celular induzido por danos no DNA. Esse efeito é geneticamente distinto de sua função na apoptose (SCHIMITT *et al.*, 2007).

Figura 2: Representação esquemática dos efeitos de BCL-2, MCL-1, BID e BCL-XL no ciclo celular (SCHIMITT *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o estudo da interação entre macrófagos e micobactérias pode contribuir de forma significativa para o desenvolvimento de novas estratégias de controle da TB. Assim, partindo do ponto que *M. tuberculosis* são indutores eficientes da apoptose de macrófagos e que esta morte celular é uma resposta imunológica que está associada com a morte de micobactérias intracelulares, é de grande interesse avaliar a expressão de genes pro-apoptóticos e anti-apoptóticos da família Bcl-2, bem como a ocorrência de morte celular, pois alguns estudos publicados têm sugerido que micobactérias virulentas inibem a apoptose como estratégia para sobreviver (KREMER *et al.*, 1997; HUNG & CHOW, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2009). Por outro lado, a emergência de isolados clínicos multi-resistentes torna importante inseri-los nesse estudo a fim de enriquecer a literatura com dados relacionados a esses isolados clínicos que têm aumentado o índice de mortalidade por TB.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão de genes anti-apoptóticos e pro-apoptóticos da família Bcl-2, como uma provável via de evasão da resposta imune inata do hospedeiro, no modelo *in vitro* de células de linhagem humana infectadas com isolados clínicos de *M. tuberculosis*. Para isso, será realizada a cultura de células de linhagem de macrófagos humanos derivados de monócitos (THP-1) que serão infectadas com *M. tuberculosis* sensíveis e resistentes a vários fármacos, além da cepa padrão H37Rv (ATCC).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Estudar a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x*, *mcl-1* e dos genes pro-apoptóticos *bak*, *bax* e *bid* em cultura de linhagem de macrófagos humanos derivados de monócitos (THP-1) infectados com isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e multi-resistentes, e com a cepa padrão H37Rv (ATCC), utilizando PCR em Tempo Real.

2.2.2. Correlacionar as várias resistências dos isolados clínicos com a expressão dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x* e *mcl-1* e dos genes pro-apoptóticos *bak*, *bax* e *bid*.

2.2.3. Avaliar a indução de morte em macrófagos infectados com isolados clínicos de *M. tuberculosis* sensíveis e multi-resistentes, e com a cepa padrão H37Rv (ATCC).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras micobacterianas

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) e pela professora Daisy Nakamura Sato do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL-RP).

Este estudo foi realizado com cepas que apresentam diferentes perfis de resistência a fármacos e também com a cepa padrão H37Rv (*American Type Culture Collection*, ATCC).

3.2. Cultivo dos isolados clínicos de *M. tuberculosis*

Todos os isolados clínicos foram cultivados em meio Lowenstein-Jensen (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) e mantidos em estufa (Fanem® São Paulo, Brasil) a 37°C durante 30 dias aproximadamente. Após esse período, as micobactérias foram preparadas dispensando-se uma alçada, da amostra em crescimento, em tubos de 16X15 mm com tampa de rosca contendo pérolas de vidro estéreis em 2 mL de meio de cultivo Middlebrook 7H9 acrescido de 0,05% *Tween* 80 e suplementado com OADC (BBL™ - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA).

A cultura em suspensão foi agitada em vórtex (BIOMATIC) e sonicada em banho de ultrassom (ULtrasonic Max cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto para dispersão dos grumos (Fattorini et al., 2002). Estas culturas foram incubadas à 37°C sob agitação durante 7 dias. Após os 7 dias, as culturas foram aliquotadas em criotubos (Axygen, Union City, CA, EUA), num volume de 1 mL, e congeladas a -80°C (Forma Scientific, Ohio, EUA).

3.3. Cultura de células

Para o nosso estudo, foi utilizada a linhagem humana de promonócito (THP-1) 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.

De acordo com Auwerx (1991), a linhagem THP-1 foi primeiramente isolada de uma criança de 1 ano de idade que sofria de leucemia monocítica aguda, e hoje é amplamente utilizada em estudos *in vitro* em todo o mundo. É bem conhecido na literatura que células desta linhagem comportam-se como macrófagos humanos derivados de monócitos após sofrerem diferenciação por ésteres de forbol, tal como Acetato de Forbol Miristato (PMA) (Dhiman, R., *et al.*, 2007).

3.3.1 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 temperatura ambiente.

Em seguida o conteúdo do criotubo foi transferido para um tubo Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) e completado para 8 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 5 min a 200g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 5 mL do mesmo meio e transferido para a garrafa de cultura de células (Corning, Acton, MA, EUA). Esta garrafa foi estocada em incubadora de CO₂ (Sanyo, Osaka, Japão) a 37°C com 5% de CO₂.

3.3.2. Cultivo das células THP-1

In vitro, as células THP-1 se desenvolvem em suspensão e foram cultivadas em garrafas estéreis (Corning, Acton, MA, EUA) com 30 mL de meio de cultura RPMI (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 10 mM de L-glutamina e 10mM 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, sendo retirado 15 mL da cultura e acrescentado 15 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), afim de manter a concentração de $4\text{-}5 \times 10^5$ células viáveis/mL, de acordo com protocolo de cultivo da ATCC.

3.3.3. Congelamento de células

Após duas semanas de cultivo, foi realizada a contagem celular em câmara de Neubauer, em seguida a cultura foi centrifugada a 200g durante 5 minutos em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspenso em volume suficiente para ser estocadas 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) com 10% dimetilsulfóxido (DMSO), afim de se ter a concentração de 10^6 células/mL. Em seguida, as alíquotas foram armazenadas no freezer -20°C por 2 horas e, posteriormente, no freezer -80°C por 24 horas. Após as 24 horas, as alíquotas foram transferidas para nitrogênio líquido onde ficam armazenadas.

3.3.4. Diferenciação das células THP-1

Após 20 dias de cultivo, foi feita a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, utilizando o reagente *Trypan Blue* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Em seguida, a cultura foi centrifugada a 200g, durante 5 minutos em temperatura ambiente, e o pellet foi ressuspenso em volume suficiente para obter a concentração 10^6 células/mL. Para a diferenciação celular, foi acrescentado 6 nM de PMA (Sigma-Aldrich St. Louis, USA) à cultura que foi repicada em placas com 6 poços e mantidas em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) sob atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C por 24 horas.

Após este período, o meio RPMI contendo o PMA foi retirado, as células já diferenciadas foram lavadas com meio RPMI novo e, posteriormente, foi adicionado 2 mL de meio RPMI em cada poço. As placas foram mantidas em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) sob atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C por mais 24 horas para garantir a estabilização das células após o estresse gerado pela diferenciação química, e só então foram usadas para o experimento, como descrito no item 3.4. Foram realizados 3 experimentos independentes em triplicata.

3.4. Infecção dos macrófagos com *M. tuberculosis*

A infecção dos macrófagos foi feita como descrito por Stokes, R.W., *et al.*, 2004. As culturas dos isolados clínicos de *M.tuberculosis* que foram preparadas, conforme descrito no item 3.2, foram então descongeladas e cultivadas em meio de cultivo *Middlebrook* 7H9 acrescido de 0,05% *Tween* 80 e suplementado com OADC (BBL™ - *Becton Dickinson Microbiology Systems*, Sparks, MD, EUA), sendo mantidas a 37°C sob agitação por 7 dias.

Após o período de incubação, as culturas foram transferidas para tubos Falcon (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo pérolas de vidro estéreis, agitadas

em vórtex (BIOMATIC) e sonicadas em banho de ultrassom (ULtrasonic Max cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto a fim de promover a dispersão dos grumos (Fattorini et al., 2002) e facilitar a fagocitose pelos macrófagos.

Foi utilizado 1mL da cultura micobacteriana para quantificação da relação UFC *versus* DO, sendo pré-estabelecida como DO 0,066 equivalente à $2,8 \times 10^7$ bacilos/mL. A infecção com *M. tuberculosis* foi feita em proporção de MOI (*multiplicity of infection*) 10:1 (bactéria:macrófago). Após a infecção os macrófagos foram incubados à 37°C e 5% CO₂.

Os perfis de sensibilidade a antibióticos dos isolados de *M. tuberculosis* utilizados e da cepa referência H37Rv (ATCC) são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade aos fármacos dos isolados clínicos utilizados.

Isolado Clínico	Isoniazida	Rifampicina	Estreptomicina	Etambutol	Pirazinamida
1911	+	+	-	+	-
2781	+	+	-	+	-
3042	-	-	-	-	-
H37Rv (ATCC)	-	-	-	-	-

Legenda: + Resistente, - Sensível.

Após os tempos determinados os macrófagos foram lavados 3x com 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, posteriormente, foram tratados com solução de tripsina 0,04% tanto para extração de RNA, como para análise de fragmentação de DNA que serão descritos nos próximos itens.

Os tempos determinados para o nosso estudo foram escolhidos a partir do tempo de fagocitose. Este foi avaliado e para isso utilizou-se a técnica de coloração de *Ziehl-Neelsen* (ZIMMER et al., 1999).

3.5. Extração, avaliação da integridade e quantificação do RNA

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

A integridade do RNA total extraído foi avaliada em sistema de eletroforese em *chip* do *Bioanalyser modelo 2100* (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA) de acordo com protocolo do *kit RNA 6000 Nano series II* (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA). As amostras que apresentaram RIN > 7 (Number of Integrated of RNA) foram consideradas adequadas para uso. As concentrações foram determinadas utilizando o espectrofômetro UV-Vis *Nano Drop ND-1000* (NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA).

A **figura 3** mostra o resultado obtido da integridade do RNA avaliada pelo sistema de eletroforese em *chip* do *Bioanalyser modelo 2100* (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA).

Figura 3: Perfil eletroforético de amostra de RNA total concentrado analisado em *Bioanalyser modelo 2100* (Agilent Technologies Inc., Miami, EUA). Os picos correspondem, respectivamente, à porção 18S e 28S das subunidades do RNA ribossômico.

Após a avaliação da integridade e quantificação do RNA total extraído, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA, utilizando-se 200 ng de Random Primers (Invitrogen, California, EUA) e quantidade suficiente de água DEPEC, seguindo uma etapa de incubação a 70°C por 10 minutos e, posteriormente, 4°C por 10 minutos. Após este procedimento, foi adicionado 10 mmoles/L de ditioneitol (DTT) (Invitrogen, California, EUA), 200 µmoles/L de DNTP (GE, Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200 U de enzima SuperScript™ II RT RNase H- e 1 x tampão de RT (Invitrogen, Califórnia, EUA). O ensaio foi realizado em termociclador (PTC 200, MJ Research Inc., MA, EUA), com apenas um ciclo, onde 25°C por 10 minutos para a hibridização; 42°C por 50 minutos para a ação enzimática e 70°C por 15 minutos para inativação da enzima. O produto obtido foi armazenado a -20°C.

3.6. PCR em Tempo Real

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada pela PCR em Tempo Real utilizando o sistema de amplificação *TaqMan® PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para isso, foi utilizado o equipamento automatizado ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram realizados controles sem adição de amostra (controle negativo) para avaliar possíveis contaminações dos reagentes com produtos da PCR.

Os controles endógenos, *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (GAPDH), *Ubiquitin* (UBC) e *Homo sapiens succinate dehydrogenase complex* (SDHA) foram avaliados para serem utilizados como referências para a quantificação relativa do gene alvo deste estudo. De acordo com os resultados obtidos e análise feita no programa geNorm o gene *UBC* foi escolhido como referência endógena por apresentar maior estabilidade no nosso modelo experimental ($M < 1,5$).

As seqüências dos iniciadores e sondas utilizados para amplificação dos genes de referência e interesse foram selecionadas utilizando-se o programa software Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A fim de evitar amplificação de eventual DNA extraído concomitantemente com o RNA total, os iniciadores e sondas foram selecionados de modo a localizar-se nas junções éxon-éxon do RNAm e foram sintetizados pela Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA).

As sondas foram ligadas com minor groove binding (MGB) e marcadas com 6-carboxyfluoresceína (FAM) ou *vaccine-type-specific* (VIC) na extremidade 5' e com nonfluorescent quencher (MGB-NFQ) na extremidade 3'. As seqüências de iniciadores e sondas utilizados para amplificação dos genes de referência e interesse estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2: Sequência de oligonucleotídeos iniciadores e das sondas utilizados na PCR em tempo real

Gene	Seqüência	Tamanho
GAPD	Sense 5'GGAAGGTGAAGGTCGGAGTCA 3'	230 pb
	Anti-sense 5'CTGGAAGATGGTGATGGGATTTC 3'	
	Sonda VIC-5' TCAGCCTTGACGGTGC MGB NFQ 3'	
UBC	Sense 5'ATTTGGGTCGCGGTTCTTG3'	133 pb
	Anti-sense 5' TGCCTTGACATTCTCGATGGT 3'	
	Sonda VIC-5' TCGTCACTTGACAATGC MGB NFQ 3'	
SDHA	Sense 5'TGGGAACAAGAGGGCATCTG 3'	86 pb
	Anti-sense 5'CCACCACTGCATCAAATTCATG 3'	
	Sonda VIC-5' TCCATTTCTGCTCAGTATC MGB NFQ 3'	
BCL-2	Sense 5' GGCTGGGATGCCTTTGTG 3'	66 pb
	Anti-sense 5' CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA 3'	
	Sonda FAM-5' ACTGTACGGCCCCAGC MGB NFQ 3'	
BCL-X	Sense 5' AGAGCCTTGGATCCAGGAGAA 3'	22 pb
	Anti-sense 5'GCTGCATTGTTCCCATAGAGTTC 3'	
	Sonda FAM-5' CGGCTGGGATACTT MGB NFQ 3'	
MCL-1	Sense 5' GCCAAGGACACAAAGCCAAT 3'	248 pb
	Anti-sense 5' TCTTCGTTTTTGATGTCCAGTTTC 3'	
	Sonda FAM-5' CCTTCCAAGGCATGC MGB NFQ 3'	
BID	Sense 5' CACTCCCCTTGGGAAGAA 3'	69 pb
	Anti-sense 5' CCTGGCAATATTCCGGATGA 3'	
	Sonda FAM-5' AGAGGCAGATTCTG-MGB NFQ 3'	
BAK	Sense 5' GCCACCAGCCTGTTTGAGA 3'	66 pb
	Anti-sense 5' GGTGCCGAAGCCCAGAAG 3'	
	Sonda FAM-5' TGGCATCAATTGGG MGB NFQ 3'	
BAX	Sense 5' GCTCTGAGCAGATCATGAAGACA 3'	
	Anti-sense 5' TCGCCCTGCTCGATCCT 3'	
	Sonda FAM-5' TTTGCTTCAGGGTTTCAT MGB NFQ 3'	

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 a PCR em Tempo Real ter eficiência de 100%, a inclinação (*slope*) da curva-padrão deve ser próxima de -3,3. 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).

Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de C_T (Livak e Schmittgen, 2001). Para expressão dos genes alvos a fórmula utilizada foi basicamente $2^{-\Delta\Delta C_T}$, onde $\Delta C_T = \Delta C_T \text{ amostras infectadas} - \Delta C_T \text{ médio da amostra controle}$ (utilizado como calibrador).

As reações de amplificação foram realizadas com 5 μM de sonda, 10 μM de cada iniciador (*sense* e *antisense*), 2X TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e 1 μg de cDNA, num volume total de 10 μL .

O programa da 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.

3.7. Análise da Fragmentação Nuclear por Citometria de Fluxo

Baseando-se no princípio de que células apoptóticas, dentre outras características típicas apresentam fragmentação de DNA e, conseqüentemente, perda de material nuclear (WYLLIE *et al.*, 1980), a quantificação de DNA fragmentado foi realizada em citometria de fluxo de acordo com o método descrito por Riccardi & Nicoletti, 2006.

A porcentagem de fragmentação de DNA foi avaliada após as infecções com *Mycobacterium tuberculosis* selecionados para o nosso estudo (**Tabela 1**), a partir de uma suspensão de 10^6 células/ mL utilizando uma solução de iodeto de

propídeo (PI) contendo 200 µg de PI em 10 mL de tampão PBS 1x. O PI é um corante fluorescente que possui a capacidade de se intercalar entre as duplas fitas do DNA. Portanto, existe uma relação proporcional entre o aumento da fluorescência emitida pelos núcleos vermelhos e a quantidade de DNA presente nas células estudadas.

Resumidamente, as células foram ressuspensas em tampão PBS 1x, fixadas com etanol 70% gelado, sendo, posteriormente, adicionado 0,1% de azida sódica a fim de matar as micobactérias fagocitadas através do bloqueio da cadeia respiratória. Em seguida, foi utilizado o tampão de extração de DNA (192 mL de NaHPO₄ 0.2M com 8 mL de 0,1 Triton 100X, pH da solução ajustado para 7,8), finalizando com a solução de PI e 200 µg de RNase.

As células foram avaliadas em um citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando o software *Cell Quest* (Becton Dickinson). Como o PI emite fluorescência na faixa da cor laranja, a fluorescência foi determinada através do filtro FL2 (620 nm).

3.8. Análise Estatística

Os resultados foram analisados através do Graph Pad Prism (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) versão 4.0. Diferenças entre as médias para as infecções com os diferentes isolados clínicos do estudo foram analisadas por *one-way* ANOVA e o teste de comparação múltipla de Turkey. O teste *two-way* ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni foram utilizados quando apropriados.

Figura 4: Esquema representativo dos experimentos realizados no nosso estudo.

4. RESULTADOS

4. 1. THP-1 diferenciada para Macrófagos

Células da linhagem celular THP-1 crescem na suspensão antes da diferenciação celular com acetato de forbol miristato (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Após 20 dias de cultivo, foi feita a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, utilizando o reagente Trypan Blue (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Posteriormente, as células foram plaqueadas na concentração inicial de 10^6 células/mL. A **Figura 5** abaixo exemplifica a diferenciação das células THP-1 para macrófagos em 24 horas (B) após o acréscimo de 6 nM de PMA.

Figura 5: Microfotografia de THP-1: A: células sem diferenciação celular. B: células diferenciadas em macrófagos após 24 horas, com o acréscimo de 6 nM de forbol miristato acetato (PMA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Aumento de 400x. (Nikon, Melville, EUA).

4.2. Avaliação do tempo de fagocitose de *M. tuberculosis* pelos macrófagos

Os tempos do nosso estudo foram determinados a partir da avaliação do tempo de fagocitose das micobactérias pelos macrófagos seguindo a metodologia descrita no item 3.4. De acordo com os resultados demonstrados na Figura 7, observa-se que a fagocitose das micobactérias pelos macrófagos inicia após 2

horas de infecção, porém após 3 horas de infecção observa-se uma cultura de células infectadas mais homogênea, visto que a maioria dos macrófagos apresenta bacilos na região citoplasmática.

Figura 6: Microfotografia das células THP-1, após os respectivos tempos de infecção com H37Rv (ATCC) e coloração por *Ziehl-Neelsen*. As setas vermelhas indicam as micobacterias fagocitadas pelos macrófagos. Aumento de 1000x (Leica DM4000B, *North Central Instruments*, Maryland Heights, MO, EUA).

4.3. Teste de Eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real

Para a realização dos testes através das curvas de eficiência (*slope*) dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o estudo dos genes alvos, as concentrações de RNA foram normalizadas e a partir da mesma concentração de

RNA realizou-se a reação de transcriptase reversa para produção de cDNAs. A partir dos cDNAs os testes através da curva de eficiência foram realizados. Os resultados das curvas de eficiências estão descritos na **Tabela 3**, e a partir destas curvas foram feitas as análises da expressão dos genes envolvidos no estudo, mostrando que as sondas e iniciadores foram adequadamente escolhidos.

Tabela 3: Valores de inclinação da curva de eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na PCR em tempo real.

Gene	Inclinação da curva (slope)	Eficiência
<i>ubc</i>	- 3,40	96%
<i>bcl-2</i>	-3,24	94%
<i>bcl-x</i>	-3,38	97%
<i>mcl-1</i>	-3,38	97%
<i>bak</i>	-3,39	97%
<i>bax</i>	-3,21	104%
<i>bid</i>	-3,56	90%

4.4. Expressão gênica relativa em macrófagos infectados com *M. tuberculosis*

As células THP-1 diferenciadas para macrófagos foram infectadas com isolados clínicos de *M. Tuberculosis*, com perfis de resistência a fármacos diferentes, por 3 a 24 horas. A expressão dos genes anti-apoptóticos Bcl-2, Bcl-x e Mcl-1, bem como a expressão dos genes pro-apoptóticos Bak, Bax e Bid foi avaliada nessas células.

A expressão relativa de RNAm de cada gene em relação à da *UBC* (controle endógeno) foi analisada a partir dos Cts obtidos nos ensaios, sendo denominado de Delta Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Os resultados da expressão desses genes estão representados na **figura 7**.

Figura 7. Gráficos da Expressão Relativa dos genes anti-apoptóticos *Bcl-2*, *Bcl-x* e *Mcl-1* e dos genes pro-apoptóticos *Bak*, *Bax* e *Bid*. No eixo Y estão representados os valores obtidos a partir do $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta CT = \Delta CT$ amostras infectadas - ΔCT médio da amostra controle (utilizado como calibrador), sendo o n experimental igual a 6. No eixo X estão representados os tempos de

infecções para as 4 cepas. * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) representam as respectivas significâncias estatísticas em relação aos isolados clínicos, a cepa padrão H37Rv e ao controle (macrófagos não infectados). Os dados apresentados na figura são resultantes de três experimentos independentes realizados em triplicata.

Os macrófagos infectados com os isolados clínicos e com a cepa padrão H37Rv (ATCC) apresentaram expressão gênica relativa aumentada para os genes anti-apoptóticos *bcl-x* e *mcl-1* nas primeiras horas após a infecção.

A análise dos resultados mostra valores estatisticamente significantes 3 horas após a infecção na expressão gênica relativa de *bcl-x*. Nesse tempo os macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC) apresentaram significância estatística, mostrando um aumento na expressão gênica relativa de *bcl-x* em relação ao controle (macrófagos não infectados), $p < 0,001$ (***). Os macrófagos infectados com o isolado clínico 1911 (resistente a três dos fármacos testados) apresentaram um aumento na expressão desse gene em relação ao controle, $p < 0,01$ (**), e em relação aos infectados com o isolado clínico 2781 (resistente a três dos fármacos testados), $p < 0,001$ (***). Com relação aos infectados com o isolado clínico 2781 ocorre um aumento na expressão quando comparado ao isolado clínico 3042 (sensível a todos os fármacos testados), sendo o valor de $p < 0,01$ (**) e quando comparado ao controle, $p < 0,001$ (***). Os macrófagos infectados com o isolado clínico 3042 só apresentaram valor estatisticamente significativo para expressão gênica relativa de *bcl-x* em relação ao controle, sendo o valor de $p < 0,001$ (***).

Com relação à expressão gênica relativa de *mcl-1* observa-se um aumento, 3 horas após a infecção, com valor estatisticamente significativo nos macrófagos infectados com o isolado clínico 2781 quando comparado ao controle, $p < 0,01$ (**). Ao longo do tempo, porém, observa-se uma diminuição da expressão gênica relativa dos genes anti-apoptóticos *bcl-x* e *mcl-1*.

O gene anti-apoptótico *bcl-2* apresenta a expressão gênica relativa diferente dos demais genes anti-apoptóticos, pois apesar de também apresentar valores estatisticamente significantes 3 horas após a infecção, esses valores são inferiores aos apresentados nos gráficos de *bcl-x* e *mcl-1*. Além disso, observa-se uma oscilação na expressão gênica relativa desse gene ao longo do tempo, pois se tem uma pequena diminuição 6 horas após a infecção, um novo aumento 12 horas após a infecção e uma nova diminuição 24 horas após a infecção. Três horas após a infecção, a expressão gênica relativa de *bcl-2* tem um aumento nos macrófagos infectados com o isolado clínico 3042 em relação ao isolado clínico 1911, $p < 0,05$ (*), e no controle em relação ao isolado clínico 1911, $p < 0,01$ (**).

Ainda com relação ao gene anti-apoptótico *bcl-2*, observa-se um aumento na expressão nos macrófagos infectados com o isolado clínico 3042 em relação ao isolado clínico 2781 seis horas após a infecção, sendo o valor de $p < 0,05$ (*). Doze horas após a infecção observa-se um novo aumento com valores estatisticamente significantes na expressão dos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC) em relação ao controle, $p < 0,05$ (*), e em relação aos isolados clínicos 2781 e 3042, $p < 0,001$ (***). Ainda nesse tempo, se têm valores estatisticamente significantes na expressão dos macrófagos infectados com o isolado clínico 1911 em relação aos isolados 2781 e 3042, sendo o valor de $p < 0,001$ (***), e em relação ao controle, $p < 0,01$ (**). Com relação ao controle, observa-se significância estatística deste comparado ao isolado clínico 2781, sendo $p < 0,01$ (**). Vinte quatro horas após a infecção, apesar de se observar uma diminuição na expressão gênica relativa de *bcl-2* em relação ao tempo de 12 horas, tem-se valor estatisticamente significativo na expressão do controle em relação às infecções com o isolado clínico H37Rv (ATCC), $p < 0,01$ (**).

O gene pro-apoptótico *bak* apresenta uma maior expressão gênica relativa nos macrófagos infectados com o isolado clínico 3042 seis horas após a infecção, apresentando valores estatisticamente significantes em relação à expressão nos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC), com o isolado clínico

1911 e 2781, sendo o valor de $p < 0,001$ (***). O controle também apresentou aumento na expressão com significância estatística, $p < 0,05$ (*), em relação a cepa H37Rv e $p < 0,01$ (**) em relação aos demais isolados clínicos. Doze horas após a infecção observa-se um aumento na expressão de *bak* nos macrófagos infectados com a cepa padrão, apresentando valor de $p < 0,001$ (***), em relação às infecções com os isolados 2781, 3042 e o controle, e valor de $p < 0,05$ (*) em relação ao isolado clínico 1911. Nesse tempo, tem-se ainda um aumento na expressão de *bak* nos macrófagos infectados com o isolado clínico 1911, apresentando significância estatística e valor de $p < 0,001$ (***), em relação aos isolados clínicos 2781, 3042 e ao controle.

Vinte e quatro horas após a infecção observa-se uma diminuição na expressão de *bak* nos macrófagos infectados com a cepa H37Rv e o isolado clínico 1911 em relação a 12 horas após a infecção, porém tem-se, ainda, valores estatisticamente significantes. Os macrófagos infectados com a cepa H37Rv apresentam aumento na expressão de *bak* com significância estatística em relação aos infectados com o isolado clínico 3042, sendo o $p < 0,01$ (**), e em relação ao controle sendo o valor de $p < 0,05$ (*). Em adição, os infectados com o isolado clínico 1911, apresentam significância estatística em relação aos infectados com o isolado clínico 3042, sendo o valor $p < 0,05$ (*).

O gene pro-apoptótico *bax* apresenta uma maior expressão relativa nas primeira 3 horas após a infecção, ocorrendo uma diminuição ao longo do tempo. Três horas após a infecção tem-se significância estatística na expressão de *bax* apenas nos macrófagos infectados com o isolado clínico 2781, sendo o valor de $p < 0,01$ (**).

Com relação ao gene pro-apoptótico *bid*, observa-se um aumento na expressão seis horas após a infecção nos macrófagos infectados com o isolados clínico 3042 comparado com isolado clínico 2781, sendo o valor de $p < 0,01$ (**). Doze horas após a infecção observam-se valores estatisticamente significantes na

expressão de *bid* que apresentou um aumento nos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv em relação aos infectados com o isolado clínico 3042, $p < 0,01$ (**). Os macrófagos infectados com o isolado clínico 1911 também apresentaram aumento na expressão de *bid* com valores estatisticamente significantes, sendo $p < 0,05$ (*) em relação aos infectados com o isolado clínico 2781 e em relação ao controle, e $p < 0,001$ (***) em relação aos infectados com o isolado clínico 3042.

4.5. Análise da Fragmentação Nuclear por Citometria de Fluxo

Além da análise da expressão gênica relativa dos genes anti-apoptóticos (*bcl-2*, *bcl-x* e *mcl-1*) e pro-apoptóticos (*bak*, *bax* e *bid*), avaliou-se também a porcentagem de fragmentação de DNA, visto que a fragmentação de DNA é uma das características típicas de células apoptóticas (WYLLIE *et al.*, 1980).

Figura 8: Gráficos da porcentagem de fragmentação de DNA dos controles positivo e negativo. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando o software *Cell Quest* (Becton Dickinson).

Os gráficos esquematizados na **Figura 8** mostram o controle negativo (macrófagos não infectados) e o controle positivo (macrófagos não infectados com adição actinomicina, um indutor de apoptose). À esquerda dos picos, marcada com a reta, representa a porcentagem de hipoploidia, ou seja, fragmentação de DNA, em que o controle negativo e o controle positivo apresentam uma porcentagem de 1,57% e 37,44%, respectivamente.

Figura 9: Gráficos da porcentagem de fragmentação de DNA dos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv e os demais isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 1). A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, CA, EUA) utilizando o software *Cell Quest* (Becton Dickinson). * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) representam as respectivas significâncias estatísticas em relação aos isolados clínicos, a cepa padrão H37Rv e ao controle (macrófagos não infectados). Os dados apresentados na figura são resultantes de três experimentos independentes realizados em triplicata.

A análise do gráfico nos mostra que houve pouca fragmentação de DNA nos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC) e com os isolados clínicos até 12 horas após a infecção. Nesses tempos não houve valores estatisticamente significantes. Observa-se que somente 24 horas após a infecção, ocorre um aumento na porcentagem de DNA fragmentado havendo um destaque para as infecções com a cepa padrão H73Rv (ATCC) e para os isolados clínicos 1911 (resistente a três dos fármacos testados) e 2781 (resistente a três dos fármacos testados).

Essas infecções apresentaram valores estatisticamente significantes, sendo o valor de $p < 0,05$ (*) para as infecções com a cepa H37Rv em relação ao controle negativo (macrófagos não infectados). As infecções com o isolado clínico 2781 apresentaram valor de $p < 0,01$ (**) em relação ao controle e $p < 0,05$ (*) em relação ao isolado clínico 3042 (*). É importante mencionar que o controle positivo (macrófagos tratados com indutor de apoptose, actinomicina) não foi considerado na análise estatística, pois ele é apenas um controle da técnica.

5. DISCUSSÃO

A Tuberculose continua sendo um grave problema de saúde pública e o tratamento com quimioterápicos específicos está sendo dificultado devido à presença das cepas resistentes a vários fármacos (WHO, 2011).

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; WHO, 2011).

A implantação de novas estratégias no controle da tuberculose requer uma melhor compreensão da complexa interação entre macrófagos e micobactérias. Durante a fagocitose, *M. tuberculosis* inicia um conjunto de ações para sobreviver e replicar dentro do ambiente intracelular do hospedeiro (RUSSELL, 2001). Dentre essas ações, a habilidade de interferir no mecanismo de morte celular que se tornou um desafio a ser estudado devido às implicações que isso deve ter na patogênese da doença (SANCHEZ *et al.*, 2008).

No presente estudo foi utilizada cultura de células THP-1, linhagem de leucemia humana de pro-monócitos, que se tornam aderentes após estimulação com PMA. Estas células possuem características morfológicas similares aos macrófagos humanos. Segundo 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 (LIU, G. *et al.*, 2006).

Com a finalidade de se analisar a expressão relativa dos genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *bcl-x* e *mcl-1* e dos genes pro-apoptóticos *bak*, *bax* e *bid* em macrófagos humanos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* com perfil de suscetibilidade a fármacos diferentes foram feitas infecções nos tempos 3 horas, 6

horas, 12 horas e 24 horas. Esses tempos foram definidos a partir da análise do tempo de fagocitose das micobactérias pelo macrófago. De acordo com os resultados apresentados, após 3 horas de infecção foi possível observar uma boa taxa de fagocitose pelos macrófagos (**Figura 6**), sendo esse, o tempo inicial escolhido para o nosso estudo. Esses resultados corroboram com dados já publicados na literatura, pois Lasunskaja *et al.*, 2010, realizam seus estudos a partir do tempo de 3 horas após a infecção, pois consideram que nesse tempo as micobactérias já foram fagocitadas pelos macrófagos.

De acordo com os resultados apresentados nos gráficos (**Figura 7**) observa-se que os genes anti-apoptóticos *bcl-x* e *mcl-1* apresentam a expressão aumentada nas primeiras 3 horas após a infecção e ao longo do tempo ocorre uma diminuição. A proteína gerada a partir do gene *bcl-x* induz a resistência da célula à morte apoptótica quando os fatores de crescimento se tornam restritos. Além disso, o produto do gene *bcl-x* regula a morte apoptótica por uma ou mais vias dependentes ou independentes de *bcl-2* (BOISE *et al.*, 1993). Cheng *et al.* relatam que a proteína BCL-X pode ser um protetor mais potente contra apoptose do que a proteína BCL-2 (CHENG *et al.*, 1996). Em contra-partida, Klinger *et al.* relatam que BCL-2 é a proteína anti-apoptótica mais importante (KLINGER *et al.*, 1997).

Com relação à expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* (**Figura 7**), a expressão tende a aumentar somente 12 horas após a infecção nos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC) e com o isolado clínico 1911 (resistente a três dos fármacos testados). Após 24 horas de infecção ocorre uma nova diminuição na expressão de *bcl-2*. Isso pode ser devido a algum mecanismo de *feedback* negativo ou, ainda, ser induzido pela micobactéria, pois os macrófagos infectados com a cepa H37Rv (ATCC) e com o isolado clínico 1911 também apresentaram expressão aumentada do gene pro-apoptótico *bak* e *bid* 12 horas após a infecção.

Rios-Barrera *et al.*, 2006, infectaram camundongos com a cepa Beijing, que é multi-resistente e altamente virulenta, e com a cepa padrão H37Rv, sensível e pouco virulenta. Nesse estudo, foi possível detectar, após 24 horas de infecção, a porcentagem de BCL-2, por imunohistoquímica, de 36,7% e de 12,5%, para as cepas Beijing e H37Rv, respectivamente. Esse percentual da proteína anti-apoptótica BCL-2 está relacionado não só com o grau de virulência da bactéria, mas também com a carga bacteriana utilizada na infecção (RIOS-BARRERA *et al.*, 2006).

É conhecido na literatura que a proteína pró-apoptótica BID é responsável por liberar as proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK do domínio da proteína anti-apoptótica BCL-2. Uma vez liberadas desse domínio, as proteínas BAX e BAK iniciam uma oligomerização e formação de um canal na membrana da mitocôndria que permite a liberação do citocromo C. O citocromo C liberado se liga a uma proteína adaptadora Apaf-1 e forma um sinal denominado de apoptossomo que culmina na ativação das CASPASES e na morte apoptótica (DUPREZ *et al.*, 2009).

Os resultados do nosso estudo mostram que o gene pro-apoptótico *bax* apresentou uma maior expressão relativa 3 horas após a infecção, havendo um destaque para a cepa padrão H37Rv (ATCC) e para o isolado clínico 2781 (resistente a três dos fármacos testados) que apresentou significância estatística em relação ao controle, $p < 0,01$ (**). A expressão do gene pro-apoptótico *bak* teve um aumento, 6 horas após a infecção, nos macrófagos infectados com o isolado clínico 3042, que é sensível, em relação aos demais isolados, e também do controle em relação aos demais isolados clínicos e a cepa H37Rv. Além disso, é possível observar significância estatística para o aumento na expressão desse gene, tanto em 12 horas como em 24 horas após a infecção. Nesses tempos, ocorre um destaque para os macrófagos infectados com a cepa padrão e com o isolado clínico 1911. Porém, a expressão de *bak* nesses esses macrófagos é maior em 12 horas. Estudos realizados em camundongos *knockout* para *bak* e

bax, mostraram uma superexpressão de *bid*, sugerindo que essas proteínas são muito importantes na regulação da apoptose pela via mitocondrial ou intrínseca (WEI *et al.*, 2001; DEGENHARDT *et al.*, 2002).

A análise dos resultados de expressão relativa dos genes anti-apoptóticos e pro-apoptóticos podem sugerir a indução de apoptose 12 horas ou mais após a infecção. Isso pode ser observado principalmente nos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv (ATCC) e com o isolado clínico 1911 (resistente a três fármacos). Resumidamente, ocorre um destaque para a expressão dos genes *bcl-2*, *bak* e *bid* nesses macrófagos após 12 horas de infecção. O aumento de *bcl-2* pode ter sido gerado como um mecanismo de compensação em virtude do aumento da expressão dos genes pro-apoptóticos *bak* e *bid*. Todavia, o gene pro-apoptótico *bak* apresenta expressão 2 vezes maior que o gene anti-apoptótico *bcl-2* nos macrófagos infectados com as mesmas micobactérias. Dessa forma, o destino da célula é determinado pelo equilíbrio na expressão desses genes que variou entre os tempos de infecção e entre os isolados clínicos utilizados.

Por outro lado, a análise da expressão gênica não é o bastante para um resultado conclusivo, por isso foi importante avaliar a ocorrência de morte celular nos macrófagos infectados com as micobactérias do estudo. Para isso, foi feita a análise da porcentagem de fragmentação internucleossômica do DNA, que é uma das características das células apoptóticas (WYLLIE *et al.*, 1980).

A análise dos gráficos de porcentagem de fragmentação de DNA (**Figura 8**) mostra coerência com os resultados de expressão gênica relativa, pois somente 24 horas após as infecções observam-se valores estatisticamente significantes, sendo esses nos macrófagos infectados com as mesmas cepas (H37RV, 1911 e 2781) que se destacam na expressão de genes pro-apoptóticos. Esses genes foram mais expressos 12 horas após a infecção e 24 horas após a infecção ocorre um aumento na porcentagem de fragmentação de DNA.

O nosso estudo abre um leque de possibilidades para que outros estudos possam ser feitos a fim de ampliar e enriquecer a literatura com o conhecimento sobre *M. tuberculosis* sensíveis e multi-resistentes. Nesse contexto, seria importante a análise da expressão das proteínas pro-apoptóticas e anti-apoptóticas; análise por transcriptoma dos macrófagos infectados por isolados clínicos multi-resistentes e sensíveis, a realização do estudo *in vivo* que permitem a análise de estágios mais avançados da doença, bem como o estudo dos fatores de virulência dessas micobactérias, pois a regulação da expressão dos genes estudados e a indução ou inibição de morte pode está relacionada com os fatores de virulência dessas micobactérias.

A presença ou ausência de fatores de virulência pode ocasionar o aumento ou diminuição da expressão relativa dos genes anti-apoptóticos e pro-apoptóticos. Todavia, isso requer um estudo mais minucioso de cada isolado clínico com relação à virulência dos mesmos e sua possível relação com a indução ou inibição da apoptose. Esse estudo seria de extrema importância, pois os resultados de muitos estudos que relatam sobre a infecção de macrófagos com *M. tuberculosis* apresentam conclusões contraditórias. Alguns relatam que *M. tuberculosis* virulentas induzem a morte apoptótica da célula hospedeira, outros relatam que esse patógeno inibe esse processo (BRIKEN & MILLER, 2008).

Segundo KEANE *et al.*, 2000; DANELISHVILI *et al.*, 2003 micobactérias virulentas estimulam menos a apoptose do que micobactérias não virulentas. MOGGA *et al.*, 2002; SLY *et al.*, 2003 e ZHANG *et al.*, 2005 relatam que o bloqueio da apoptose parece ser um mecanismo virulento que está associado com a super-expressão de genes anti-apoptóticos e com a redução de genes pro-apoptóticos. Velmurugan *et al.*, 2007, identificaram um gene de virulência que é capaz de inibir a apoptose de células infectadas.

Com relação a *M. tuberculosis* multi-resistentes, a literatura não apresenta muitos estudos que relacione o perfil de suscetibilidade a fármacos com a indução

ou inibição de morte das células infectadas. Estudos que relacionem a virulência com a resistência da micobactéria também são escassos. De acordo com Ingen *et al.*, 2011, a maioria das espécies de *Mycobacterium* virulentas são suscetíveis a fármacos. Todavia, existem cepas como a Beijing que são muito virulentas e muito resistentes (RIOS-BARRERA *et al.*, 2006).

Os resultados do nosso estudo sugerem que os isolados clínicos resistentes a INH, RIF e EMB utilizados, juntamente com a cepa padrão H37Rv (ATCC), tendem a induzir a morte dos macrófagos infectados após 24 horas de infecção. Isso é observado tanto no perfil de expressão dos genes estudados, uma vez que ocorre um predomínio na expressão dos genes pro-apoptóticos 12 horas após a infecção, como na porcentagem de DNA fragmentado, que tende a aumentar 24 horas após a infecção.

A fragmentação internucleossômica do DNA é uma das características de morte celular por apoptose (SARASTE & PULKKI, 2000) ou, ainda, por pyroptose (KEPP *et al.*, 2010). Assim, a porcentagem de DNA fragmentado, que tende a aumentar após 24 horas de infecção, pode ser indicativa de morte celular por apoptose ou por pyroptose. A indução de apoptose é uma desvantagem para micobactéria, pois de acordo com Greenhalgh (1998) a apoptose é um mecanismo imunológico necessário para eliminar patógenos invasores. Portanto, a inibição da apoptose pode ser um mecanismo evolutivo que confere as micobactérias, a permanência dentro do macrófago, permitindo assim que elas se multipliquem e, posteriormente, se disseminem (MUKHOPADHYAY, NAIR & GHOSH, 2011). Todavia, as micobactérias do nosso estudo parecem não apresentar esse mecanismo evolutivo que permite evasão da resposta imune.

6. CONCLUSÃO

Os resultados mostram que os isolados clínicos resistentes a INH, RIF e EMB utilizados no nosso estudo, bem como a cepa padrão H37Rv (ATCC), apresentam um destaque para expressão do gene anti-apoptótico *bcl-2* e do gene pro-apoptótico *bid* 12 horas após a infecção. Em adição, observa-se uma expressão ainda maior do gene pro-apoptótico *bak* nesse mesmo tempo. Além disso, a ocorrência de fragmentação de DNA nos macrófagos infectados com essas micobactérias é um indicativo de morte por apoptose ou pyroptose. Esses resultados sugerem que essas micobactérias tendem a induzir a morte da célula após 24 horas de infecção.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, J. M. & S. CORY. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v.26, n.9, Feb 26, p.1324-37. 2007.

AUWERX J. 1991. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*. 47(1): 22-31

BOISE, L. H., M. GONZALEZ-GARCIA, *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell**, v.74, n.4, Aug 27, p.597-608. 1993.

BORNER, C. Diminished cell proliferation associated with the death-protective activity of Bcl-2. **J Biol Chem**, v.271, n.22, May 31, p.12695-8. 1996.

BORNER, C., I. MARTINOU, *et al.* The protein bcl-2 alpha does not require membrane attachment, but two conserved domains to suppress apoptosis. **J Cell Biol**, v.126, n.4, Aug, p.1059-68. 1994.

CHAUTAN, M., G. CHAZAL, *et al.* Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. **Curr Biol**, v.9, n.17, Sep 9, p.967-70. 1999.

CHEN, L., S. N. WILLIS, *et al.* Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. **Mol Cell**, v.17, n.3, Feb 4, p.393-403. 2005.

CHEN, M. & J. WANG. Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. **Apoptosis**, v.7, n.4, Aug, p.313-9. 2002.

CHENG, A. F., W. W. YEW, *et al.* Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.2, Feb, p.596-601. 2004.

CHENG, E. H., B. Levine, *et al.* Bax-independent inhibition of apoptosis by Bcl-XL. **Nature**, v.379, n.6565, Feb 8, p.554-6. 1996.

CHITTENDEN, T., C. Flemington, *et al.* A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. **EMBO J**, v.14, n.22, Nov 15, p.5589-96. 1995.

CLEARY, M. L., S. D. SMITH, *et al.* Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. **Cell**, v.47, n.1, Oct 10, p.19-28. 1986.

CLEM, R. J., M. FECHHEIMER, *et al.* Prevention of apoptosis by a baculovirus gene during infection of insect cells. **Science**, v.254, n.5036, Nov 29, p.1388-90. 1991.

CLOUSTON, W. M. E J. F. KERR. Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections. **Med Hypotheses**, v.18, n.4, Dec, p.399-404. 1985.

DANELISHVILI, L., J. MCGARVEY, *et al.* Mycobacterium tuberculosis infection causes different levels of apoptosis and necrosis in human macrophages and alveolar epithelial cells. **Cell Microbiol**, v.5, n.9, Sep, p.649-60. 2003.

DEGENHARDT, K., R. SUNDARARAJAN, *et al.* Bax and Bak independently promote cytochrome C release from mitochondria. **J Biol Chem**, v.277, n.16, Apr 19, p.14127-34. 2002.

DERRICK, S. C. E S. L. MORRIS. The ESAT6 protein of Mycobacterium tuberculosis induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. **Cell Microbiol**, v.9, n.6, Jun, p.1547-55. 2007.

DHIMAN, R., M. RAJE, *et al.* Differential expression of NF-kappaB in mycobacteria infected THP-1 affects apoptosis. **Biochim Biophys Acta**, v.1770, n.4, Apr, p.649-58. 2007.

DOOLEY, S.W. & SIMONE, P.M. The extent and management of drug-resistant tuberculosis: the American experience. **Clinical tuberculosis**. London: Chapman & Hall 171-189, 1994.

DOMEN, J., S. H. CHESHER, *et al.* The role of apoptosis in the regulation of hematopoietic stem cells: Overexpression of Bcl-2 increases both their number and repopulation potential. **J Exp Med**, v.191, n.2, Jan 17, p.253-64. 2000.

DU, C., M. FANG, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v.102, n.1, Jul 7, p.33-42. 2000.

DUPREZ, L., E. WIRAWAN, *et al.* Major cell death pathways at a glance. **Microbes Infect**, v.11, n.13, Nov, p.1050-62. 2009.

EPAND, R. F., J. C. MARTINOU, *et al.* The apoptotic protein tBid promotes leakage by altering membrane curvature. **J Biol Chem**, v.277, n.36, Sep 6, p.32632-9. 2002.

FATTORINI, L., R. NISINI, *et al.* Exposure of BALB/c mice to low doses of Mycobacterium avium increases resistance to a subsequent high-dose infection. **Microbiology**, v.148, n.Pt 10, Oct, p.3173-81. 2002.

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 referencia na cidade de São Paulo: evolução por quatro décadas. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.26, supl.2, p.S130, 2000.

FLYNN, J. L. E J. CHAN. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol**, v.19, p.93-129. 2001.

FUJISE, K., D. ZHANG, *et al.* Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. **J Biol Chem**, v.275, n.50, Dec 15, p.39458-65. 2000.

GOTTLIEB, R. A., J. NORDBERG, *et al.* Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intracellular acidification. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.2, Jan 23, p.654-8. 1996.

GREENHALGH, D. G. The role of apoptosis in wound healing. **Int J Biochem Cell Biol**, v.30, n.9, Sep, p.1019-30. 1998.

GUO, B., A. GODZIK, *et al.* Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. **J Biol Chem**, v.276, n.4, Jan 26, p.2780-5. 2001.

GUTIERREZ, M. G., S. S. MASTER, *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. **Cell**, v.119, n.6, Dec 17, p.753-66. 2004.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, Oct 12, p.770-6. 2000.

HUNG, R. W. E A. W. Chow. Dissecting the "end game": clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis. **Clin Invest Med**, v.27, n.6, Dec, p.324-44. 2004.

KAMER, I., R. SARIG, *et al.* Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. **Cell**, v.122, n.4, Aug 26, p.593-603. 2005.

KANE, D. J., T. A. SARAFIAN, *et al.* Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. **Science**, v.262, n.5137, Nov 19, p.1274-7. 1993.

KAYAGAKI, N., A. KAWASAKI, *et al.* Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. **J Exp Med**, v.182, n.6, Dec 1, p.1777-83. 1995.

KEANE, J., M. K. BALCEWICZ-SABLINSKA, *et al.* Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect Immun**, v.65, n.1, Jan, p.298-304. 1997.

KEANE, J., H. G. REMOLD, *et al.* Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages. **J Immunol**, v.164, n.4, Feb 15, p.2016-20. 2000.

KELEKAR, A. E C. B. THOMPSON. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. **Trends Cell Biol**, v.8, n.8, Aug, p.324-30. 1998.

KEPP, O., L. GALLUZZI, *et al.* Pyroptosis - a cell death modality of its kind? **Eur J Immunol**, v.40, n.3, Mar, p.627-30.

KIENER, P. A., P. M. DAVIS, *et al.* Human monocytic cells contain high levels of intracellular Fas ligand: rapid release following cellular activation. **J Immunol**, v.159, n.4, Aug 15, p.1594-8. 1997.

KLINGER, K.; TCHOU WONG, K.M.; BRANDLL, O.; ASTON, C.; KIM, R.; CHI, C. & ROM, W.N. Effects of *Mycobacteria* on regulation of apoptosis in mononuclear phagocytes. **Infect. Immun.** 1997. 179: 945-953.

KORSMEYER, S. J., M. C. WEI, *et al.* Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell Death Differ**, v.7, n.12, Dec, p.1166-73. 2000.

KREMER, L., J. ESTAQUIER, *et al.* *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection prevents apoptosis of resting human monocytes. **Eur J Immunol**, v.27, n.9, Sep, p.2450-6. 1997.

KUWANA, T., M. R. MACKEY, *et al.* Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. **Cell**, v.111, n.3, Nov 1, p.331-42. 2002.

LASUNSKAIA, E., S. C. RIBEIRO, *et al.* Emerging multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype circulating in Russia express a pattern of biological properties associated with enhanced virulence. **Microbes Infect**, v.12, n.6, Jun, p.467-75.

LEE, J., M. HARTMAN, *et al.* Macrophage apoptosis in tuberculosis. **Yonsei Med J**, v.50, n.1, Feb 28, p.1-11. 2009.

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

LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J. **Molecular Cell Biology**. 4ed. New York, Media Connected, 2000.

MCCORMICK, A. L. Control of apoptosis by human cytomegalovirus. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.325, p.281-95. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA, PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA TUBERCULOSE. BRASIL. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil** – Versão 2. 2009.

MOGGA, S. J., T. MUSTAFA, *et al.* Increased Bcl-2 and reduced Bax expression in infected macrophages in slowly progressive primary murine Mycobacterium tuberculosis infection. **Scand J Immunol**, v.56, n.4, Oct, p.383-91. 2002.

MOLLOY, A., P. LAOCHUMROONVORAPONG, *et al.* Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin. **J Exp Med**, v.180, n.4, Oct 1, p.1499-509. 1994.

MUKHOPADHYAY, S., S. NAIR, *et al.* Pathogenesis in tuberculosis: transcriptomic approaches to unraveling virulence mechanisms and finding new drug targets. **FEMS Microbiol Rev**, Aug 24.

MUSTAFA, T., T. G. BJUNE, *et al.* Increased expression of fas ligand in human tuberculosis and leprosy lesions: a potential novel mechanism of immune evasion in mycobacterial infection. **Scand J Immunol**, v.54, n.6, Dec, p.630-9. 2001.

MUSTAFA, T., S. PHYU, *et al.* Increased expression of Fas ligand on Mycobacterium tuberculosis infected macrophages: a potential novel mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis? **Inflammation**, v.23, n.6, Dec, p.507-21. 1999.

NGUYEN, M., P. E. BRANTON, *et al.* Role of membrane anchor domain of Bcl-2 in suppression of apoptosis caused by E1B-defective adenovirus. **J Biol Chem**, v.269, n.24, Jun 17, p.16521-4. 1994.

NICOTERA, P., M. LEIST, *et al.* Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. **Biochem Soc Symp**, v.66, p.69-73. 1999.

ODDO, M., T. RENNO, *et al.* Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol**, v.160, n.11, Jun 1, p.5448-54. 1998.

OLTVAI, Z. N., C. L. MILLIMAN, *et al.* Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v.74, n.4, Aug 27, p.609-19. 1993.

POLSTER, B. M., K. W. KINNALLY, *et al.* BH3 death domain peptide induces cell type-selective mitochondrial outer membrane permeability. **J Biol Chem**, v.276, n.41, Oct 12, p.37887-94. 2001.

PONTING, C. P. E R. R. RUSSELL. The natural history of protein domains. **Annu Rev Biophys Biomol Struct**, v.31, p.45-71. 2002.

RAMASWAMY, S. E. J. M. MUSSER. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tuber Lung Dis**, v.79, n.1, p.3-29. 1998.

RAY, C. A., R. A. BLACK, *et al.* Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 beta converting enzyme. **Cell**, v.69, n.4, May 15, p.597-604. 1992.

RIEDL, S. J. E. G. S. SALVESEN. The apoptosome: signalling platform of cell death. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.5, May, p.405-13. 2007.

RODRIGUES, L.; BARRETO, M.; KRAMER, M.; BARATA, R.C.B. In: **Revista de Saúde Pública: Resposta brasileira à tuberculose: contexto, desafios e perspectivas**. v.41, n.1, p.1-2, 2007.

ROJAS, M., L. F. BARRERA, *et al.* Differential induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in resistant and susceptible murine macrophages: role of nitric oxide and mycobacterial products. **J Immunol**, v.159, n.3, Aug 1, p.1352-61. 1997.

ROSSETTI, M.L.R.; VALIM, A.R.M.; NUNES, M.S.; RODRIGUES, V.S. Resistant tuberculosis: a molecular review. **Rev. Saúde Pública**., v.36, n.4, p.525-532, 2002.

ROULSTON, A., R. C. MARCELLUS, *et al.* Viruses and apoptosis. **Annu Rev Microbiol**, v.53, p.577-628. 1999.

RUSSELL, D. G. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.2, n.8, Aug, p.569-77. 2001.

SANCHEZ, A., ESPINOSA, P., *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa Lipoprotein is Apoptogenic for Human Monocyte-derived Macrophages. **Scandinavian Journal of Immunology**. 69: 20-28. 2008.

SARASTE, A. E. K. PULKKI. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovasc Res**, v.45, n.3, Feb, p.528-37. 2000.

SCHAIBLE, U. E., F. WINAU, *et al.* Apoptosis facilitates antigen presentation to T lymphocytes through MHC-I and CD1 in tuberculosis. **Nat Med**, v.9, n.8, Aug, p.1039-46. 2003.

SCHMITT, E., C. PAQUET, *et al.* DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. **J Zhejiang Univ Sci B**, v.8, n.6, Jun, p.377-97. 2007.

SEDLAK, T. W., Z. N. OLTVAI, *et al.* Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.17, Aug 15, p.7834-8. 1995.

SLAYDEN, R. A. E. C. E. BARRY, 3rd. The genetics and biochemistry of isoniazid resistance in mycobacterium tuberculosis. **Microbes Infect**, v.2, n.6, May, p.659-69. 2000.

SLY, L. M., S. M. HINGLEY-WILSON, *et al.* Survival of Mycobacterium tuberculosis in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. **J Immunol**, v.170, n.1, Jan 1, p.430-7. 2003.

STOKES, R. W., R. NORRIS-JONES, *et al.* 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, Oct, p.5676-86. 2004.

SUSIN, S. A., N. ZAMZAMI, *et al.* Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. **J Exp Med**, v.184, n.4, Oct 1, p.1331-41. 1996.

TAYLOR, R. C., S. P. CULLEN, *et al.* Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.9, n.3, Mar, p.231-41. 2008.

VAIL, M. E., M. L. CHAISSON, *et al.* Bcl-2 expression delays hepatocyte cell cycle progression during liver regeneration. **Oncogene**, v.21, n.10, Feb 28, p.1548-55. 2002.

VAN INGEN, J., M. J. BOEREE, *et al.* Are phylogenetic position, virulence, drug susceptibility and in vivo response to treatment in mycobacteria interrelated? **Infect Genet Evol**, Oct 20.

VANDER HEIDEN, M. G., N. S. CHANDEL, *et al.* Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. **Cell**, v.91, n.5, Nov 28, p.627-37. 1997.

VELMURUGAN, K., B. CHEN, *et al.* Mycobacterium tuberculosis nuoG is a virulence gene that inhibits apoptosis of infected host cells. **PLoS Pathog**, v.3, n.7, Jul, p.e110. 2007.

VERNET, G., C. JAY, *et al.* Species differentiation and antibiotic susceptibility testing with DNA microarrays. **J Appl Microbiol**, v.96, n.1, p.59-68. 2004.

WEI, M. C., W. X. ZONG, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v.292, n.5517, Apr 27, p.727-30. 2001.

WILLIS, S. N., L. CHEN, *et al.* Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. **Genes Dev**, v.19, n.11, Jun 1, p.1294-305. 2005.

WILLIS, S. N., J. I. FLETCHER, *et al.* Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. **Science**, v.315, n.5813, Feb 9, p.856-9. 2007.

WINAU, F., S. H. KAUFMANN, *et al.* Apoptosis paves the detour path for CD8 T cell activation against intracellular bacteria. **Cell Microbiol**, v.6, n.7, Jul, p.599-607. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Control**. (WHO/HTM/TB/2011.16). Report 2011.

WYLLIE, A. H., J. F. KERR, *et al.* Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**, v.68, p.251-306. 1980.

YANG, J., X. LIU, *et al.* Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. **Science**, v.275, n.5303, Feb 21, p.1129-32. 1997.

YIN, X. M., Z. N. OLTVAI, *et al.* BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. **Nature**, v.369, n.6478, May 26, p.321-3. 1994.

YU, S. P. E D. W. CHOI. Ions, cell volume, and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.97, n.17, Aug 15, p.9360-2. 2000.

ZAMZAMI, N., S. A. SUSIN, *et al.* Mitochondrial control of nuclear apoptosis. **J Exp Med**, v.183, n.4, Apr 1, p.1533-44. 1996.

ZHANG, J., R. JIANG, *et al.* Survival of virulent *Mycobacterium tuberculosis* involves preventing apoptosis induced by Bcl-2 upregulation and release resulting from necrosis in J774 macrophages. **Microbiol Immunol**, v.49, n.9, p.845-52. 2005.

ZHANG, Y., B. HEYM, *et al.* The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v.358, n.6387, Aug 13, p.591-3. 1992.

ZHANG, Y. E W. W. YEW. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**, v.13, n.11, Nov, p.1320-30. 2009.

ZIEGLER, U. E P. GROSCURTH. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci**, v.19, Jun, p.124-8. 2004.

ZIMMER, K.; DRÄGER, K.G.; KLAWONN, W. Contribution to the diagnosis of Johne's disease in cattle. Comparative studies on the validity of Ziehl-Neelsen staining, faecal culture and a commercially available DNA-Probe® test in detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in faeces from cattle. **J. Vet. Med. B**, v.46, p.137-140, 1999.

ZINKEL, S. S., K. E. HUROV, *et al.* A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. **Cell**, v.122, n.4, Aug 26, p.579-91. 2005.

ZYCHLINSKY, A. Programmed cell death in infectious diseases. **Trends Microbiol**, v.1, n.3, Jun, p.114-7. 1993.

ANEXOS

ANEXO A - Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de 30 minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de 30 minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de 30 minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até 60 minutos por examinador.
 - 2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
 - 4.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 26 de maio de 2011.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B – Currículo Lattes

Dados Pessoais

Nome	Walkiria de Araújo Souza
Nome em citações bibliográficas	SOUZA, Walkiria de Araújo
Sexo	feminino
Filiação	Vanderlei Monteiro de Souza e Josilda Maria de Araújo Souza
Nascimento	03/06/1981 - Natal/RN - Brasil
Carteira de Identidade	2385717 SSP - RN - 30/07/2002
CPF	00988368463
Endereço residencial	Av. Nossa Senhora da Assunção 675, 52C Butantã - Sao Paulo 05359-001, SP - Brasil Telefone: 11 79772214 URL da home page: http://
Endereço profissional	- - Brasil
Endereço eletrônico	e-mail para contato : walkiria-souza@usp.br e-mail alternativo : walkiria_souza@yahoo.com.br

Formação Acadêmica/Titulação

	Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil Título: Análise da expressão de genes apoptóticos e anti-apoptóticos em macrófagos infectados por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> uni e mullti-drogas resistentes
2009	Orientador: Mario Hiroyuki Hirata Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico <i>Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis, Apoptose</i> <i>Áreas do conhecimento : Microbiologia,Biologia Molecular</i>
2008 - 2009	Especialização em Análises Clínicas. Instituto de Pesquisa e Educação em Saúde de São Paulo, IPESSP, Brasil Título: Diagnóstico Laboratorial da Tuberculose Orientador: Sarah Rodrigues Marsicano
2003 - 2007	Graduação em Biomedicina.

Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
 Título: Detecção de infecção por HPV e Chlamydia trachomatis em
 mulheres do município de São José de Mipibu - RN
 Orientador: José Veríssimo Fernandes

Formação complementar

2008 - 2009	Extensão universitária em Técnicas Moleculares e Marcadores Genéticos. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Estágio Supervisionado em Imagenologia. Hospital Universitário Onofre Lopes, HUOL, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Estágios Supervisionados em Análises Clínicas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em PCR em Tempo Real. Associação Brasileira de Biomedicina, ABBM, Sao Paulo, Brasil
2005 - 2005	Extensão universitária em Citogenética Humana. Universidade Potiguar, UNP, Natal, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Enterobactérias. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas - RN, SBAC-RN, Brasil
2005 - 2005	Curso de curta duração em Critérios Morfológicos e Laudo na Citologia Cerv... Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, SBAC, Brasil
2004 - 2004	Curso de curta duração em Interpretação de Exames Imunológicos de Rotina. Centro de Estudos Superiores de Maceió - AL, CESMAC, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2009 - Atual	Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Bolsista , Carga horária: 40, Regime: Dedicção Exclusiva
--------------	---

Atividades

2009 - Atual Projetos de pesquisa, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Participação em projetos:
Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por Mycobacterium tuberculosis uni e multi-drogas resistentes

2. Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Vínculo institucional

2004 - 2007 Vínculo: Graduação , Enquadramento funcional: Iniciação Científica ,
 Carga horária: 30, Regime: Dedicção Exclusiva

Atividades

2004 - 2007 Projetos de pesquisa, Centro de Biociências
Participação em projetos:
Detecção de HPV e Chlamydia trachomatis em mulheres com ou sem lesão da cérvix uterina do Município de São José de Mipibu-RN

Projetos

2009 - Atual Análise da expressão de genes da família Bcl-2 em macrófagos infectados por Mycobacterium tuberculosis uni e multi-drogas resistentes

Descrição: A tuberculose é uma das doenças infecciosas mais antiga e bem descrita. Entretanto, ainda permanece como um dos principais problemas de saúde pública a ser enfrentado em âmbito global. A implantação de novas estratégias no controle da tuberculose requer uma melhor compreensão dos mecanismos que sucedem a fagocitose das micobactérias por macrófagos. Após a fagocitose, as micobactérias dão início a um conjunto de ações para sobreviverem e se replicarem no ambiente intracelular, entre as quais a provável interferência no processo de morte celular. O presente estudo tem como objetivo esclarecer os mecanismos pelos quais M. tuberculosis uni e multi-drogas resistentes evadem da resposta imune inata do hospedeiro e estabelecem uma infecção persistente. Para isso, será avaliada a expressão de genes anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-x e Mcl-1) e pro-apoptóticos (Bak, Bax e Bid) da família Bcl-2, e dos genes Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9 cuja regulação está relacionada ao processo de eliminação de patógenos. O modelo in vitro a ser utilizado será a cultura de macrófagos humanos derivados de monócitos (THP-1) que serão infectados com isolados clínicos de diversos perfis de resistência ao tratamento quimioterápico.

Os isolados clínicos utilizados pertencem a micobacterioteca do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP que está sob a nossa coordenação. A metodologia de avaliação da expressão gênica será a PCR em tempo real, sistema TaqMan®. Os resultados serão analisados pela diferença de expressão entre os isolados clínicos sensíveis, resistentes a uma, duas, três ou quatro quimioterápicos. Com estes dados, espera-se avaliar a provável regulação dos genes de controle da morte celular como mecanismo de evasão da resposta imune inata do hospedeiro por *M. Tuberculosis*.

Situação: Em Andamento Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);

Integrantes: Walkiria de Araújo Souza; Joás Lucas da Silva; Gisele Medeiros Bastos; Mario Hiroyuki Hirata (Responsável)

Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2004 - 2007

Detecção de HPV e *Chlamydia trachomatis* em mulheres com ou sem lesão da cérvix uterina do Município de São José de Mipibu-RN

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2);

Integrantes: Walkiria de Araújo Souza; RENATO; VERÍSSIMO (Responsável)

Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq

Áreas de atuação

1. Virologia Aplicada à Saúde Pública
2. Biologia Molecular
3. Análises Clínicas

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Apresentação de Trabalho

Joás Lucas da Silva, Gisele Medeiros Bastos, SOUZA, Walkiria de Araújo, Mario Hiroyuki Hirata

Mutations C531T And C526T in the RPOB Gene of *Mycobacterium tuberculosis* are readily detectable by QPCR-HIGH resolution melting using plasmid-based controls, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

1. *Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Águas de Lindóia - SP; Evento: 57 Congresso Brasileiro de Genética;

Inst.promotora/financiadora: SBG

Daniel Keniti Shinohara, Joás Lucas da Silva, Marcelo Miyata, Beatriz Cacciaccaro Lucas, Aécio Assunção Braga, Gisele Medeiros Bastos, SOUZA, Walkiria de Araújo, Rosário Dominguez Crespo Hirata, Mario Hiroyuki Hirata

Detection of Rifampicin-Resistance Mutation in Mycobacterium Tuberculosis Isolates Using Quantitative PCR High-Resolution Melting, 2010.

2. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis

Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Impresso; Local:

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; Cidade: São Paulo-SP; Evento: XV

Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora:

Universidade de São Paulo

SOUZA, Walkiria de Araújo, Gisele Medeiros Bastos, Joás Lucas da Silva, Rosário Dominguez Crespo Hirata, Mario Hiroyuki Hirata

Expressão de Caspase 3, Caspase 8 e Caspase 9 em Células THP-1 diferenciadas e infectadas com isolados de Mycobacterium tuberculosis, 2010.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

3. *Palavras-chave: Apoptose, Mycobacterium tuberculosis*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Saúde humana e serviços sociais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Rio

de Janeiro; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: IV Encontro Nacional de Tuberculose;

Inst.promotora/financiadora: REDE-TB

Joás Lucas da Silva, Gisele Medeiros Bastos, André D. Luchessi, SOUZA, Walkiria de Araújo, Mario Hiroyuki Hirata, Rosário Dominguez Crespo Hirata

Quantificações de Micobacteriófagos pela Quantitativa em Tempo Real, 2010.

(Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. *Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis*

Áreas do conhecimento : Microbiologia, Biologia Molecular

Setores de atividade : Saúde humana e serviços sociais

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Casa

Grande Hotel Resort; Cidade: Guarujá-SP; Evento: 56º Congresso Brasileiro de

Genética; Inst.promotora/financiadora: SBG

Joás Lucas da Silva, SOUZA, Walkiria de Araújo, Gisele Medeiros Bastos, Cristina Farjado, Rosário Dominguez Crespo Hirata, Mario Hiroyuki Hirata

Implantação e Manutenção de Um Laboratório de Biossegurança Nível 3 para Manuseio de Mycobacterium tuberculosis, 2008. (Congresso, Apresentação de

5. Trabalho)

Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis, Laboratório de Biossegurança Nível 3

Áreas do conhecimento : Análises Clínicas, Biologia Molecular

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: São

Paulo; Evento: Encontro Nacional das Comissões Internas de Biossegurança

★ SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, Ítalo José Menezes Maia, JOSÉ VERÍSSIMO

6. FERNANDES

Associação entre HPV e Chlamydia trachomatis em mulheres com ou sem lesão da cérvix uterina, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Palavras-chave: HPV, Chlamydia trachomatis, PCR

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: UFRN; Cidade: Natal; Evento: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN; Inst.promotora/financiadora: Propesq

MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, Ermeton Duarte Nascimento, SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, ROSELY DE VASCONCELLOS MEISSNER

Chlamydia trachomatis Cervical Infection Prevalence and Its Relationship with Cytological Alterations of the Cervical Epithelium, 2007. (Congresso, Apresentação

7. de Trabalho)

Palavras-chave: HPV, Chlamydia trachomatis, PCR

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Bahia; Cidade: Salvador; Evento: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference; Inst.promotora/financiadora: SBBq

CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES

Determinação da prevalência da infecção por HPV em mulheres com citologia normal, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

8. *Palavras-chave: Infecção cervical, HPV, PCR.*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: UFRN; Cidade: Natal; Evento: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN; Inst.promotora/financiadora: Propesq

MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES

Determinação da prevalência de infecção por HPV em mulheres com lesões de baixo grau da cérvix uterina, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

9. *Palavras-chave: HPV, infecção da cérvix uterina, exame citológico*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: UFRN; Cidade: Natal; Evento: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN; Inst.promotora/financiadora: Propesq

CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, Ermeton Duarte Nascimento, SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, ROSELY DE VASCONCELLOS MEISSNER

10. **Human Papillomavirus infection prevalence and Its Relation with Cytological**

Alterations of the Cervical Epithelium, 2007. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Bahia; Cidade: Salvador; Evento: International Union of Biochemistry and Molecular Biology Conference; Inst.promotora/financiadora: SBBq

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, SOUZA, Walkiria de Araújo, Ítalo José Menezes Maia, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES

Prevalência da infecção pelo HPV e fatores de risco associados, 2007.
 (Congresso, Apresentação de Trabalho)

11. *Palavras-chave: HPV, PCR, Lesões Cervicais, Fatores de Risco*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: UFRN; Cidade: Natal; Evento: XVIII Congresso de Iniciação Científica da UFRN; Inst.promotora/financiadora: Propesq

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, SOUZA, Walkiria de Araújo, Ítalo José Menezes Maia, MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES

Prevalência da infecção pelo Papilomavirus humano e por Chlamydia trachomatis e sua correlação com alterações citológicas, 2007. (Congresso, Apresentação de

12. Trabalho)

Palavras-chave: HPV, Chlamydia trachomatis, PCR

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Bahia; Cidade: Salvador; Evento: congresso Brasileiro de Patologia Clínica; Inst.promotora/financiadora: SBPC

RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, SOUZA, Walkiria de Araújo, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES

Avaliação da Eficiência de dois Métodos de Extração de DNA a partir da Hemolinfa de Camarões, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

13. *Palavras-chave: DNA, Hemolinfa de Camarões*

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: UFRN; Cidade: Natal; Evento: XVII Congresso de Iniciação Científica da UFRN;

Inst.promotora/financiadora: Propesq

SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, Cimária Porfírio R. Oliveira, Fabiana L. Bezerra, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, Lígia G. Reis, Regina de Fátima dos Santos Fernandes

Avaliação de Parâmetros Hematoimunológicos Correlacionados com a Presença de IHHNV em Camarões Litopenaeus Vannamei, 2006. (Simpósio, Apresentação de

14. Trabalho)

Palavras-chave: DNA, Hemolinfa de Camarões

Áreas do conhecimento : Microbiologia

Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Centro de Convenções de Natal;

Cidade: Natal; Evento: III Simpósio Internacional sobre Indústria do Camarão Cultivado; Inst.promotora/financiadora: FENACAM

- SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, Cimária Porfírio R. Oliveira, Lígia G. Reis, Regina de Fátima dos Santos Fernandes, Fabiana L. Bezerra
Comparação de dois Métodos de Extração de DNA a partir de Hemolinfa de Camarões, 2006. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
15. *Palavras-chave: DNA, Hemolinfa de Camarões*
Áreas do conhecimento : Microbiologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Conveções de Natal; Cidade: Natal; Evento: III Simpósio sobre a Indústria do Camarão Cultivado; Inst.promotora/financiadora: FENACAM
 ★ SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, MENDELL FERNANDES DE MEDEIROS, CINTHIA BEATRICE DA SILVA TELLES, ROSELY DE VASCONCELLOS MEISSNER, MARIA HELENA MARQUES FONSECA DE BRITO, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES
Detecção de Infecção da Cérvix Uterina por HPV pelo Método de Captura Híbrida, 2006. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
16. *Palavras-chave: HPV, CAPTURA HÍBRIDA*
Áreas do conhecimento : Microbiologia
Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Convenções de Goiânia; Cidade: Goiânia; Evento: X Congresso Brasileiro de Biomedicina; Inst.promotora/financiadora: ABBM
 SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, Cimária Porfírio R. Oliveira, Lígia G. Reis, Fabiana L. Bezerra, Regina de Fátima dos Santos Fernandes
Extração de DNA a partir de Hemolinfa e Pleopodos de Camarões, 2006. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
17. *Palavras-chave: DNA, Hemolinfa de Camarões*
Áreas do conhecimento : Microbiologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Centro de Convenções de Natal; Cidade: Natal; Evento: III Simpósio Internacional sobre a Indústria do Camarão Cultivado; Inst.promotora/financiadora: FENACAM
 Regina de Fátima dos Santos Fernandes, JOSÉ VERÍSSIMO FERNANDES, SOUZA, Walkiria de Araújo, RENATO CÉSAR VIEIRA DE SOUZA, Fabiana L. Bezerra, Cimária Porfírio R. Oliveira, Lígia G. Reis
Limitações dos Métodos de Extração de DNA a partir da Hemolinfa de Camarões, 2006. (Outra, Apresentação de Trabalho)
18. *Palavras-chave: DNA, Hemolinfa de Camarões*
Áreas do conhecimento : Microbiologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local: Alagoas; Cidade: Maceió; Evento: Biodiversidade Aquática Sadia: Exigência do Séc. XXI; Inst.promotora/financiadora: ENBRAPOA
 SOUZA, Walkiria de Araújo, RODRIGUES, Silvia Helena L, GURGEL, Nirley
19. Yoniki P F
Aspectos Bioquímicos e Sociais do Envelhecimento, 2005. (Simpósio, Apresentação

de Trabalho)

Palavras-chave: Bioquímica, envelhecimento

Áreas do conhecimento : Bioquímica

Setores de atividade : Cuidado À Saúde das Populações Humanas

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Local:

UFRN; Cidade: Natal; Evento: IV Simpósio e VII Mostra Científica do Centro de

Biociências; Inst.promotora/financiadora: Centro de Biociências

Eventos

Participação em eventos

1. **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)
2. **IV Encontro Nacional de Tuberculose e I Fórum da Parceria Brasileira Contra a Tuberculose**, 2010. (Encontro)
3. **II Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2010. (Simpósio)
4. **VIII Simpósio de Biosseguração e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa**, 2009. (Simpósio)
5. **I Simpósio de Pós-Graduação em Farmácia Área de Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)
6. **Intercâmbio de Conhecimento - Uso de Indicadores em Laboratórios Clínicos**, 2007. (Outra)
7. **Intercâmbio de Conhecimento - Gasometria**, 2007. (Outra)
8. **X Congresso Brasileiro de Biomedicina**, 2006. (Congresso)
9. **I Encontro Nacional de Estudantes de Biomedicina**, 2006. (Encontro)
10. **I Jornada de Biomedicina**, 2006. (Outra)
11. **International Symposium on Circadian Rhythms, Sleep and Memory**, 2005. (Simpósio)
12. **IV Congresso Regional de Análises Clínicas do Nordeste**, 2005. (Congresso)
13. **XXXII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas e V Congresso Brasileiro de Citologia Clínica**, 2005. (Congresso)

14. **IV Congresso Regional de Análises Clínicas do Nordeste**, 2005. (Congresso)
15. **IV Simpósio e VII Mostra Científica do Centro de Biociências**, 2005. (Simpósio)
16. **I Congresso Alagoano de Biomedicina**, 2004. (Congresso)
17. **X Semana de Biomedicina**, 2003. (Congresso)

Totais de produção

Produção bibliográfica

Apresentações de Trabalhos (Congresso)	13
Apresentações de Trabalhos (Simpósio)	5
Apresentações de Trabalhos (Outra)	1

Eventos

Participações em eventos (congresso)	6
Participações em eventos (simpósio)	6
Participações em eventos (encontro)	2
Participações em eventos (outra)	3

ANEXO C – Ficha do Aluno

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

9136 - 6146081/1 - Walkíria de Araújo Souza

Email: walkiria-souza@usp.br

Data de Nascimento: 03/06/1981

Cédula de Identidade: RG - 2385717 - RN

Local de Nascimento: Estado do Rio Grande do Norte

Nacionalidade: Brasileira

Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade Federal do Rio Grande do Norte -
Rio Grande do Norte - Brasil - 2008

Curso: Mestrado

Programa: Farmácia (Análises Clínicas)

Área: Análises Clínicas

Data de Matrícula: 13/07/2009

Início da Contagem de Prazo: 13/07/2009

Data Limite: 13/01/2012

Orientador Acadêmico: Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 13/07/2009 a 03/12/2009

E.Mail: borelli@usp.br

Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 04/12/2009 até o presente.

E.Mail: mhhirata@usp.br

Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/07/2009

Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 20/08/2010

Data do Depósito do Trabalho:

Título do Trabalho:

Data Máxima para Aprovação da Banca:

Data de Aprovação da Banca:

Data Máxima para Defesa:

Data da Defesa:

Resultado da Defesa:

Ingressou no Mestrado em 13/07/2009

Histórico de Ocorrências: Mudança de Regulamento em 06/08/2009

Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Aluno matriculado nas normas vigentes a partir de 01/07/2009

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 19/07/2011

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-2/1	Tópicos em Análises Clínicas II	17/08/2009	29/11/2009	30	2	100	A	N	Concluída
BTC5737-2/2	Cultura de Células de Mamífero Aplicada à Obtenção de Produtos Farmacêuticos e à Terapia Gênica (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	15/09/2009	26/10/2009	90	6	75	B	N	Concluída
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMF5862-3/1	Ciclo Celular e Apoptose	20/10/2009	04/12/2009	90	6	100	A	N	Concluída
HEP5800-1/1	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	02/03/2010	11/05/2010	90	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
FBC5793-9/2	Tópicos em Análises Clínicas I	08/03/2010	21/06/2010	30	2	90	A	N	Concluída
EDM5791-5/4	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação -	17/03/2010	30/06/2010	120	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Universidade de São Paulo)								
FBA5728-2/11	Aprimoramento Didático	20/04/2010	17/05/2010	60	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMP5752-5/2	Biocomputação	06/08/2010	14/10/2010	90	0	0	-	N	Pré-matrícula indeferida
EDM5791-5/5	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	18/08/2010	30/11/2010	120	8	75	A	N	Concluída
BMM5746-4/3	Controle Microbiológico. Esterilização e Desinfecção	27/09/2010	27/10/2010	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
QBQ5768-4/1	Introdução ao Uso da Estatística para Análise Experimental em Bioquímica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	18/10/2010	31/10/2010	30	2	100	B	N	Concluída

Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
Para exame de qualificação Para depósito da dissertação		
Disciplinas:	0	25
Estágios:		
Total:	0	25

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997: A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência. Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.