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

Papel da proteína HspX do *Mycobacterium tuberculosis* na regulação de genes relacionados à adaptação morfológica de micobactérias ao período de dormência, utilizando M*ycobacterium smegmatis* como organismo modelo.

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 6018. O original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP.

Gisele Medeiros Bastos

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Titular Mario H. Hirata

São Paulo 2013 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

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

Bastos, Gisele Medeiros

B327p Papel da proteína HspX do Mycobacterium tuberculosis na regulação de genes relacionados à adaptação morfológica de micobactérias ao período de dormência, utilizando Mycobacterium smegmatis como organismo modelo / Gisele Medeiros Bastos. --São Paulo, 2013.

143p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

Diagnóstico molecular : Medicina 2. Genética : Microorganismo
T. II. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.0756 CDD

Gisele Medeiros Bastos

Papel da proteína HspX do *Mycobacterium tuberculosis* na regulação de genes relacionados à adaptação morfológica de micobactérias ao período de dormência, utilizando M*ycobacterium smegmatis* como organismo modelo.

> Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

> > Prof. Titular Mario H. Hirata orientador/presidente

Profa. Dra. Cristiane Rodrigues Guzzo Carvalho 1º. examinador

Profa. Dra. Rosilene Fressatti Cardoso 2º. examinador

Dra. Elisabete Aparecida de Almeida 3º. examinador

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio 4º. examinador

São Paulo, 22 de março de 2013.

"Se os bons combates eu não combater Mínha coroa não conquistarei. Se mínha carreira eu não completar De que vale a mínha fé tanto guardar." (Anderson Freire)

Dedico esse trabalho,

Aos meus pais, Maria Claudenir e José Baltazar (*In memorian*), por me darem a vida, pelo amor com o qual me criaram, pela educação e incentivo nos estudos. Nos momentos de desânimo e de dificuldades, é em vocês que encontro forças para superar os osbtáculos da vida. Cada pequena e grande vitória conquistada em minha vida é por vocês e pra vocês!

> "Mãe, perdoa mínha ausência. Às vezes tenho trabalhado muito. Mãe, mas como você mesma díz, trabalho com amor gera bons frutos." (Fábío Jr.)

Aos meus irmãos, Daniele, Daniel e Aninha, ao meu sobrinho Caio e à minha cunhada Lorena, meus fiéis torcedores e incentivadores. A bateria que me mantém firme e forte nas lutas dessa vida. Amo muito vocês!

"Percebe e entende, que os melhores amigos São aqueles que estão em casa esperando por tí. Acredita! Nos momentos mais difíceis da vida, eles sempre estarão por perto, pois só sabem te amar." (Anjos de Resgate)

Às minhas amigas e irmãs de coração, Aline, Flávia e Meiri, por ser minha família aqui em São Paulo. Pelo companheirismo e pelo ombro amigo sempre que precisei. Pelos momentos de alegria e risadas. Enfim, por todos esses anos de amizade, que nem o tempo e nem a distância apagará.

Amígos, pra sempre! Bons amígos que nasceram pela Fé. Amígos, pra sempre! Para sempre amígos sím, se Deus quíser!" (Anjos de Resgate)

Aos familiares e amigos de Fortaleza, que mesmo separados fisicamente, estão sempre torcendo pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Mário Hiroyuki Hirata, pela disponibilidade em orientar essa tese. Jamais esquecerei suas palavras (inclusive os puxões de orelha). Como especialista e educador, ao longo desses 5 anos me ensinou que para ser um profissional experiente e evoluído, a aprendizagem continuada se faz necessária. Assim como, superar as dificuldades do aprender, as dificuldades em mudar, e enfrentar as contradições do cotidiano. Se sentir estimulado por novos desafios, pela vontade de continuar aprendendo, realizando-se e frustrando-se, mas mantendo o impulso de avançar e não se tornar um profissional acomodado.

À professora Rosário Dominguez Crespo Hirata, pela oportunidade oferecida ao abrir as portas do LBMAD, e por todos os conhecimentos transmitidos.

À nossa técnica Cristina Fajardo (nossa GPS do laboratório), pela paciência e colaboração durante esse período. Seu sorriso amigo e suas palavras foram sempre confortantes nos momentos adequados.

À equipe da Tuberculose, Joás, Gabriela, Eduardo, Juliana Santos, Walkiria, Artermir, pela amizade, dentro e fora do laboratório. Com vocês vivi momentos que ficarão marcados pelo resto da minha vida, desde o acadêmico até o mais descontraído. Vocês são muito especiais pra mim!

Aos colegas de laboratório, em especial, Vivian Bonezi, Aécio, Adriana e Álvaro Cerda, pela valiosa colaboração nos trabalhos experimentais e em diversas etapas do trabalho.

Aos professores Elza Mamizuka e Jorge Sampaio e a todos integrantes do Laboratório de Microbiologia, em especial, Artemir, Juliana, Fabiana e Mônica, pela colaboração sempre espontânea e afável.

Às secretárias Edna Batista e Ana Dantas, a minha gratidão e reconhecimento pela disponibilidade e dedicação.

À minha eterna IC e amiga Marcela Frota Cavalcante, por todo o apoio nos assuntos profissionais e pessoais, e pelas palavras de incentivo, proporcionados ao longo desta jornada.

À minha sempre orientadora professora Nádia Accioly, que durante a iniciação científica, mestrado e especialização, transcendeu seu papel de orientadora e se tornou uma amiga. Obrigada por sempre estar por perto, me apoiando em momentos decisivos da vida e por acreditar em mim!

A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na execução deste trabalho.

RESUMO

BASTOS, G.M. Papel da proteína HspX do *Mycobacterium tuberculosis* na regulação de genes relacionados à adaptação morfológica de micobactérias ao período de dormência, utilizando *Mycobacterium smegmatis* como organismo modelo. 2013.

A manutenção da infecção latente pelo M. tuberculosis (TBIL) pode ser atribuída à sua capacidade de sobreviver durante anos no organismo humano em um estado não replicativo (dormente). A proteína HspX do M. tuberculosis, induzida sob condições de hipóxia, está fortemente associada com a manutenção da viabilidade do bacilo na TBIL. O presente estudo tem como objetivo, verificar se a superexpressão da proteína HspX altera a expressão de genes envolvidos com a síntese de componentes da parede celular, replicação do DNA e divisão celular de bacilos, assim como, na expressão de genes envolvidos com a resposta imune inata em macrófagos infectados com esses bacilos. O gene hspX foi amplificado pela PCR a partir do DNA do M. tuberculosis H37Rv, clonado no vetor de expressão pFPCA1GFP, e a proteína HspX expressa em *M. smegmatis* mc²155. As bactérias, nas guais, a presença da proteína recombinante foi confirmada por Western Blot, foram utilizadas, para a análise de expressão gênica tanto em bactérias guanto em macrófagos infectados. O estudo de expressão gênica foi realizado utilizando a RT-qPCR. Quando comparado aos controles, as bactérias que expressavam a proteína HspX apresentaram uma redução na expressão de genes de replicação do DNA e divisão celular, que foi acompanhado por uma tendência a filamentação das células e uma redução no tamanho das colônias. Além disso, nos macrófagos infectados com a bactéria expressando a proteína HspX, houve um aumento tanto da expressão do mRNA guanto da secreção de IL-1b, citocina importante para estabilização do granuloma, e uma redução na expressão de IRGM, gene relacionado com o processo autofágico, importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra bactérias intracelulares. Portanto, em conjunto, essas alterações de expressão gênica, em conseguência da presença da proteína HspX sugerem uma contribuição, direta ou indireta, dessa proteína para a adaptação morfológica e metabólica da bactéria dormente durante a TBIL, e consequentemente, para a resposta imune inata dos macrófagos infectados favorecendo a viabilidade intracelular dessas bactérias.

Palavras-chave: Mycobacterium tuberculosis; Infecção latente; Expressão gênica.

ABSTRACT

BASTOS, G. M. The role of HspX protein from *Mycobacterium tuberculosis* in regulation of genes involved with morphological adaptation to mycobacterial dormancy, with *Mycobacterium smegmatis* as model organism. 2013.

The maintenance of *Mycobacterium tuberculosis* infection latent (TBIL) may be attributed to its ability to persist for years in the host in a non-replicative state (dormant). The HspX protein from *M. tuberculosis*, induced under hypoxic, is strongly associated with maintaining the bacillus viability in TBIL. This study aims to determine if HspX overexpression chances the expression of genes involved in the synthesis of cell wall components, DNA replication and cell division of bacilli, as well as, the expression of genes involved in innate immune response of macrophages infected. The gene *hspX* was amplified by PCR from DNA of *M. tuberculosis* H37Rv, and cloned into the expression vector pFPCA1GFP. The HspX was expressed in *M. smegmatis* mc²155 and the recombinant protein was confirmed by Western blot. The bacterias expressing HspX were used for gene expression analysis both in bacteria and in infected macrophages by RT-PCRq. In bacterias expressing HspX, it was observed a reduction in expression of genes involved in DNA replication and cell division. and with cells more filamentous and smaller colonies, compared with controls. In addition, in macrophages infected with bacillus expressing HspX, there was an increase in both mRNA expression and secretion of IL-1b, an important cytokine for granuloma stability, and a reduction in expression of IRGM, an autophagic gene, important for host defense mechanism against intracellular bacteria. Together, these results suggest a direct or indirect contribution of HspX protein for metabolic and morphological adaptation of dormant bacteria in TBIL, and for the innate immune response in infected macrophages, improving the bacteria intracellular viability.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis, latent infection, gene expression.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC - Complexo enriquecedor Albumina/ Dextrose/ Catalase

ATP - Trifosfato de adenosina

BK - Bacilo de Koch

BSA – Albumina de soro bovino

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

cDNA - fita de DNA complementar

CMTB - Complexo M. tuberculosis

Ct - Ciclo Threshold

dATP – Trifosfato de deoxiadenosina

DC-SIGN -Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule Grabbing Nonintegrin

DMT - Dimicolato de Trealose

DNA – Ácido Desoxiribonucléico

dNTP - desoxirribonuleotídeo trifosfato

DO – Densidade ótica

DPEC - Dietilpirocarbonato

DTT - Ditiotreitol

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

GFP - Proteína Verde Fluorescente

HIV - Vírus da imunodeficiência humana

HspX – Protein de choque térmico

 $IFN\gamma$ – Interferon gamma

IL-12 - Interleucina 12

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

iNOS – Óxido Nítrico sintase indutível

LB - Meio de cultura Luria Bertani

LJ – Meio de cultura Lowenstein-Jensen

LM- Lipomanana

log - fase logarítima do crescimento bacteriano

ManLAM - Manose-Lipoarabinomanana

MCP-1 (Monocyte chemotactic protein-1) – Proteína quimiotática de monócitos.

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

MHC-I - Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe I

MHC-II - Complexo de Histocompatibilidade Principal de classe II

MR - Receptores de Mannose

mRNA – RNA mensageiro

MyD88 (Myeloid Differentiation primary response protein 88) - proteína de diferenciação de resposta mielóide primária.

NaCI - Cloreto de sódio

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NLRs – Receptores NOD

OMS - Organização Mundial da Saúde

PBS - Tampão fosfato-salino

PCR – Reação em cadeia pela Polimerase

PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil

PVDF - Polivinil dieno fluorado

RANTES (Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted) - proteína quimiotática secretada e regulada pela ativação de linfócitos T.

RNA – Ácido Ribonucléico

RNI - Intermediários Reativos de Nitrogênio

ROI - Intermediários Reativos de Oxigênio

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE - gel de poliacrilamida contendo SDS

Sp-A - proteina A surfactante

TACO (Tryptophan Aspartate Rich Coat) - Proteína de superfície rica em triptofano e aspartato.

TB - Tuberculose

TBE – Tampão Tris Borato EDTA

TBST- Tampão Tris Salino + Tween 20

TLRs – Receptores Toll-like

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

UV – Ultravioleta

WB - Western Blotting

WHO - World Health Organization

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Iniciadores utilizados para a amplificação do gene <i>hspX</i> pela	44
	PCR.	
Tabela 2.	Iniciadores utilizados na amplificação do gene hspX pela PCR	50
	para subclonagem no vetor pFPCA1 $\Delta g f p$.	
Tabela 3.	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação pela	61
	PCR em tempo real.	
Tabela 4.	Valores de inclinação da curva de eficiência das PCR em	62
	tempo real.	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Taxa de incidência de TB nos 22 países responsáveis por	20
	80% dos casos de TB no mundo, 1990–2010.	
Figura 2.	Comparação da sobrevivência de micobactérias patogênicas e	25
	não patogênicas dentro de fagossomas.	
Figura 3.	Ativação da resposta inata pró-inflamatória via receptores	26
	TLRs.	
Figura 4.	Inibição do processamento e apresentação via MHC-II após	27
	estimulação prolongada dos receptores TLRs.	
Figura 5.	Inibição das vias apoptóticas do hospedeiro por micobactérias	28
	patogênicas.	
Figura 6.	Indução de morte celular por necrose de macrófagos	29
	infectados com <i>M. tuberculosis</i> virulento.	
Figura 7.	Desenho esquemático do pGEM-T® easy vector.	45
Figura 8.	Desenho esquemático do vetor de expressão pFPCA1GFP.	49
Figura 9.	Avaliação da integridade do RNA extraído utilizando a	59
	plataforma Bioanalyzer.	
Figura 10.	Análise do produto da PCR do gene <i>hspX</i> .	71
Figura 11.	Análise dos plasmídeos recombinantes pGEMT::hspX por	72
C	restrição enzimática com a enzima EcoRI.	
Figura 12.	Desenho esquemático do gene <i>hspX</i> .	72
Figure 10	Alinhamenta das sesüencias de um des slance nCEMTubanV	70
Figura 13.	Alimamento das sequencias de um dos ciones poetini	73
	(NCPI)	
Eiguro 14	(NCDI). Análico do produto do PCP do gono hanY	74
Figura 14.	Análise do produto da FCR do gene hspx.	74
Figura 15.	com a onzima RamHI o Clal	75
Figura 16	Soloção do olongo recombinantes pEPCA1::hepY por restrição	76
i iyula 10.	com as enzimas $BamHI = Clal$	70
Figure 17	Alinhamento das següencias de um dos clonos nEDCA1hcnV	77
i iguia i /.	π initiation of a sequencias de unitios ciones prinort. Insp Λ	11

com a sequência do gene *hsp*X disponível no banco de dados (NCBI).

- Figura 18. Microfotografia de culturas de *M. smegmatis* mc²155 78 transformadas com o plasmídeo pFPCA1*GFP* e pFPCA1::*hspX* visualizadas no microscópio de fluorescência sob luz UV.
- Figura 19. Curva de crescimento celular de *M. smegmatis* mc²155 79 contendo o plasmídeo recombinante pFPCA1::hspX.
- Figura 20. Análise da expressão da proteína HspX em gel SDS-PAGE 4- 80 20% corado com Coomassie blue.
- Figura 21. Confirmação da expressão da proteína HspX por *Western* 81 *blotting.*
- Figura 22. Microfotografia de culturas de *M. smegmatis,* após *2*4hs de 82 indução com acetamida, coradas pela técnica de Ziehl Neelsen.
- Figura 23. Cultura de *M. smegmatis* em Meio Middlebrook 7H10. 82
- Figura 24. Expressão relativa dos genes *dnaA*, *dnaG*, *ftsZ e whmD* em 84 *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX.
- Figura 25. Expressão relativa dos genes *kasA e kasB* em *M. smegmatis* 85 mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX
- Figura 26. Expressão relativa do gene *pbpA* em *M. smegmatis* mc²155 86 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX
- Figura 27 Expressão relativa dos genes *murB murC, murE, murF e* 87 *murG* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX
- Figura 28 Expressão relativa dos genes *embA, embB e embC* em *M.* 88 smegmatis mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX
- Figura 29 Expressão relativa dos genes *pimB, sigF* e *fbpA* em *M.* 89 *smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante

pFPCA1::hspX

- Figura 30 Curva de crescimento intracelular *do M. smegmatis* mc²155, 90 contendo e não contendo o plasmídeo recombinante pFPCA1::hspX, dentro de macrófagos
- Figura 31 Expressão relativa dos genes IL1B, IL8, IL10 e TNF em 91 macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 32 Expressão relativa dos genes MCL-1, BCL2L1, BCL2, BAX, 92 CASP3 em macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 33 Expressão relativa dos genes TLR1, TLR2 e TLR6 em 93 macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 34 Expressão relativa dos genes NOS2 e IRGM em macrófagos 94 infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 35 Concentração da citocina IL1b no sobrenadante de culturas de 95 macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 36 Concentração da citocina IL8 no sobrenadante de culturas de 96 macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X
- Figura 37 Esquema representativo da influência da proteína HspX na 124 regulação da resposta imune inata na infecção com *M. tuberculosis.*

SUMÁRIO

	Pág.
1. Introdução	19
1.1. Tuberculose – Epidemiologia	19
1.2. Tuberculose – Mycobacterium tuberculosis	21
1.3. Tuberculose – Resposta imunológica	22
1.3.1. Formação do Granuloma	30
1.4. Tuberculose - Infecção Latente	32
1.4.1. Hipóxia	34
1.4.2. Heat shock protein (HspX)	35
2. Objetivos	41
2.1. Objetivo geral	41
2.2. Objetivos específicos	41
3. Materiais e métodos	43
3.1. Cultivo da cepa Mycobacterium tuberculosis H37Rv	43
3.2. Extração do DNA	43
3.3. Amplificação do gene <i>hspX</i> pela PCR	44
3.4. Clonagem no vetor pGEM [®] -T Easy Vector	45
3.4.1. Reação de adenilação	
3.4.2. Reação de ligação	46
3.4.3. Preparo das células de E. coli quimiocompetentes	47
3.4.4. Transformação das células de E. coli quimiocompetentes	47
3.4.5. Sequenciamento de DNA	48
3.5. Subclonagem do gene <i>hspX</i> no plasmídeo pFPCA1 <i>GFP</i>	

3.5.1. Restrição enzimática do produto de PCR e vetor FPCA1GFP	51
3.5.2. Transformação das células de E. coli quimiocompetentes	52
3.6. Expressão da proteína HspX em <i>M. smegmatis</i> mc²155	53
3.6.1. Preparo de células de M. smegmatis mc²155	53
eletrocompetentes	
3.6.2. Eletroporação de células de M. smegmatis mc²155	53
3.6.3. Indução do promotor da acetamidase	54
3.6.4. Extração de proteínas	54
3.6.5. Análise da expressão de HspX por Western Blotting	55
3.7. Análise macro e microscópica das bactérias	57
3.8. Extração de RNA	58
3.9. Tratamento do RNA com DNAse	59
3.10. Transcrição reversa com PCR (RT-PCR)	59
3.11. PCR em Tempo Real (RT-qPCR)	60
3.12. Infecção de macrófagos	63
3.12.1. Cultivo das células THP-1	63
3.12.2. Diferenciação das células THP-1 em macrófagos	63
3.12.3. Cultivo do Mycobacterium smegmatis	64
3.12.4. Infecção dos macrófagos com Mycobacterium smegmatis	64
3.12.5. Contagem de UFC	65
3.12.6. Extração do RNA	65
3.12.6.1 PCR em tempo Real (RT-qPCR)	66
3.12.7. Dosagem de citocinas	68
3.13. Análise estatítica	68

4. Resultados	71
4.1. Amplificação do gene <i>hsp</i> X	71
4.2. Clonagem do gene <i>hsp</i> X no vetor pGEM-T [®] easy vector	71
4.3. Subclonagem do gene <i>hsp</i> X no vetor de expressão	74
pFPCA1 <i>GFP</i>	
4.4. Expressão da proteína HspX	78
4.5. Análise macro e microscópica das bactérias	81
4.6. Resultados de expressão gênica pela RT-qPCR	83
4.6.1 Genes de replicação do DNA e divisão celular	83
4.6.2. Genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular	85
4.7. Sobrevivência <i>in vivo</i>	90
4.8. Expressão gênica em macrófagos	91
4.8.1. Citocinas	91
4.8.2. Genes anti e pró- apoptóticos	92
4.8.3. Receptores Toll like	93
4.8.3. Outros genes	94
4.9. Dosagem de citocinas por multiplex	95
5. Discussão dos resultados	98
6. Conclusões	126
7. Referências bibliográficas	128
8. Anexos	145

#INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Tuberculose - Epidemiologia

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis*). De acordo com dados do último relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2011 houve uma queda nos números relacionados à TB, sendo estimados em 12 milhões os casos prevalentes, em 8,7 milhões os casos novos, e em aproximadamente 1,4 milhões o número de mortes em virtude da doença. Embora tenha apresentado taxas de prevalência (46/100.000) e incidência (42/100.000), menores em relação ao ano anterior, em 2011, o Brasil ainda permanecia entre os 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo, como mostra a figura 1 (WHO, 2012).

Apesar dos avanços dos últimos anos, a TB continua sendo uma das principais causas de doença e morte no mundo, especialmente nos países da Ásia e da África, e no Brasil representa a quarta causa de mortes por doenças infecciosas e a primeira entre pacientes infectadas com o vírus HIV (WHO, 2012; BRASIL, 2012).

A OMS estima que um terço da população mundial esteja infectada com o bacilo *M. tuberculosis.* No entanto, a TB é um exemplo de infecção não obrigatoriamente seguida de doença, existindo muitos indivíduos que, embora estejam infectados, não adoecem. A probabilidade de uma infecção tuberculosa evoluir para doença é regida não apenas por características estruturais e metabólicas do agente etiológico, mas também por fatores imunes do organismo infectado (KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005; CAMPOS, 2006; CAWS et al, 2008).



Figura 1 – Taxa de incidência de TB nos 22 países responsáveis por 80% dos casos de TB no mundo, 1990–2010. Linha verde: Incidência total de TB; Linha vermelha: inicidência estimada em pacientes co-infectados com HIV. Fonte: Adaptado de WHO, 2012.

1.2. Tuberculose – Mycobacterium tuberculosis

Pertencente à família Mycobacteriaceae, a bactéria *M. tuberculosis* foi descrita como causa da TB em 1882 por Robert Koch, sendo por isso, também denominada bacilo de Koch (BK). O BK é membro do complexo *M. tuberculosis*

(CMTB) que inclui outras seis espécies geneticamente relacionadas: *M. bovis, M. africanum, M. microti, M. bovis - BCG, M. pinnipedii e M. caprae.* Embora todos os membros do CMTB sejam obrigatoriamente patogênicos e causem TB, eles exibem propriedades fenotípicas, e hospedeiros distintos (KRITSKI;, CONDE; SOUZA, 2005; BRASIL, 2008).

O *M. tuberculosis* é um bacilo reto ou ligeiramente curvo, imóvel, não formador de esporos, que mede de 1 a 4µm de comprimento, sendo sua principal característica a álcool-ácido resistência, ou seja, a capacidade de reter o corante fucsina após a lavagem com uma mistura de álcool e ácido clorídrico (coloração de Ziehl-Neelsen). Essa propriedade de resistir à descoloração reflete a composição incomum da parede celular rica em lipídeos, formando uma barreira hidrofóbica que resulta não apenas em resistência à descoloração, mas também a estresses ambientais (ressecamento, por exemplo) e a diversos agentes químicos e antibióticos. O alto conteúdo lipídico da parede celular desse organismo contribui para importantes efeitos biológicos, como a formação do granuloma ou tubérculo (característica que dá nome à doença) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

O bacilo da TB é um patógeno intracelular aeróbico estrito que necessita de oxigênio para crescer e se multiplicar. Por ser capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias, é considerado um parasita intracelular facultativo, de virulência variável. Seu tempo de geração é longo, podendo variar de 16 a 20 horas, dependendo da oferta de oxigênio, nutrientes e pH do meio empregado para seu crescimento. É, de modo geral, resistente à

ação de agentes químicos, e sensível à ação de agentes físicos, como o calor e a radiação ultravioleta (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

1.3. Tuberculose – Resposta imunológica

A TB é uma doença contagiosa, cuja transmissão se dá através do ar, por inalação de gotículas contaminadas originadas durante a tosse, espirro ou fala do portador da doença, ainda não tratado ou em tratamento a menos de duas semanas. No período de um ano, cada pessoa infectada não tratada pode contaminar, em média, de 10 a 15 pessoas (FUCHS; WANNMACHER; FERREIRA, 2004; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

Um terço dos indivíduos HIV negativos expostos ao bacilo tornam-se infectados. Desses, apenas 10% desenvolvem a doença no primeiro ano de infecção, e outros 5 a 10% dos infectados desenvolverão a TB posteriormente em outro momento de suas vidas. Acredita-se que a doença ativa na maioria dos adultos HIV negativos, ocorre por reativação de uma infecção preexistente (LILLEBAEK et al, 2002; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005). Por outro lado, as pessoas imunossuprimidas, como as infectadas com HIV, quando entram em contato com o *M. tuberculosis* tendem a apresentar uma rápida progressão para doença ativa, e 5 a 10X mais chances de reativar uma infecção preexistente do que um HIV negativo (PICON et al, 2007). Por tanto, a probabilidade de uma infecção tuberculosa evoluir para doença é regida não apenas por características do bacilo, mas também por fatores imunes do organismo infectado (CAMPOS, 2006; CAWS et al, 2008).

A infecção por *M. tuberculosis* inicia com a inalação do BK contido em aerossóis (gotículas de Flugge) através da via respiratória. Parte dos bacilos inalados é retida por mecanismos físicos de defesa do aparelho respiratório – cílios nasais, reflexo da tosse e depuração mucociliar. Somente o núcleo seco dessas gotículas, chamado de núcleo de Wells, contendo de 1 a 3 bacilos, consegue ultrapassar esses mecanismos de defesa e atingir os alvéolos. Nos alvéolos, o primeiro contato do bacilo é com células fagocíticas (macrófagos e células dendríticas) e células locais como pneumócitos do tipo I e II (AHMAD, 2011).

Para se instalar no organismo humano, o BK, por meio de diferentes moléculas em sua superfície, se liga a uma grande variedade de receptores celulares presentes nos macrófagos e nas células dendríticas. A parede celular do *M. tuberculosis* é recoberta por uma mistura rica em lipídeos, proteínas e sacarídeos, e entre os ligantes mais importantes da superfície do BK estão as lipoproteínas de 19 e 27kDa, a glicoproteína de 38kDa, a lipomanana (LM) e a manose-lipoarabinomanana (ManLAM) (CREVEL et al, 2002; SCHLESINGER et al, 2008; DIETRICH ; DOHERTY, 2009).

Os receptores *Toll-like* (TLRs), NOD like (NLRs), e lectinas tipo-C (proteínas dependentes de Ca²⁺, capazes de reconhecer açúcares específicos da superfície de células) que incluem os receptores de mannose (MR) e <u>D</u>endritic <u>C</u>ell-Specific Intercellular adhesion molecule <u>G</u>rabbing <u>N</u>onintegrin (DC-SIGN) são exemplo de receptores em macrófagos e células dendríticas responsáveis por reconhecer e fagocitar o *M. tuberculosis.* Outros receptores importantes são: receptores do sistema complemento, receptores Scavenger,

23

receptores da proteina A surfactante (Sp-A) e receptores de colesterol. Esse grande número de receptores sugere que não há uma via preferencial, mas várias opções que podem ser usadas pela micobactéria, para maximizar sua entrada no tecido humano (ERNST, 1998; COLLINS ; KAUFMANN, 2001; CREVEL et al, 2002; SCHLESINGER et al, 2008).

Após a fagocitose, o bacilo *M. tuberculosis* reside inicialmente em um vacúolo chamado fagossoma. No ciclo normal de maturação, o fagossoma contendo o patógeno, sofre uma série de fusões com vesículas endocíticas que culmina na fusão fagossoma-lisossoma. Os eventos de fusão remodelam a membrana fagossomal, recrutando ATPase transportadores de próton (vH+-ATPase) que reduzem o pH interno e permitem que as hidrolases ácidas derivadas do lisossoma exerçam seu efeito microbicida. Logo, o ambiente hostil do fagolisossoma (pH ácido, intermediários reativos de oxigênio (ROI) e de nitrogênio (RNI), enzimas lisossomais, e peptídeos tóxicos) resulta na morte da maioria dos bacilos (DERETIC; FRATTI, 1999; KAUFMANN, 2001; KOUL et al, 2004). Entretanto, micobactérias patogênicas como o *M. tuberculosis* conseguem evitar a destruição pelas enzimas lisossomais interrompendo a maturação normal do fagossoma para fagolisossoma (figura 2). Como exemplo de estratégias utilizadas pelo BK, podemos citar:

- a. Exclusão da bomba vH+-ATPase durante a maturação do fagossoma, impedindo sua acidificação e prevenindo sua fusão com o lisossoma (KOUL et al, 2004).
- b. Interferência com a maquinaria de fusão vesicular, seja inibindo a expressão das proteínas da família GTPases, Rab5 e Rab7, na membrana das vesículas endocíticas, seja retendo a proteína TACO

24

(*tryptophan aspartate rich coat*) na membrana do fagossoma (KOUL et al, 2004).



Figura 2 – Esquema representativo comparando a sobrevivência de micobactérias patogênicas e não patogênicas dentro de fagossomas. Fonte: Adaptado de Koul et al, 2004.

A fagocitose resultante da interação do MR com o ManLAM na superfície do bacilo, está associada com uma resposta anti-inflamatória, uma vez que o ManLAM é um dos componentes que afeta a fusão e maturação do fagolisossoma, e consequentemente, promove a sobrevivência intracelular do BK (KOUL et al, 2004; KANG et al, 2005).

Por outro lado, sinais gerados pela interação dos TLRs (particularmente TLR2 e TLR4) com ligantes da *M. tuberculosis* induz a ativação de uma

resposta inata pró-inflamatória. Essa interação resulta na ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B e produção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas 6 (IL-6) e 12 (IL-12), quimiocinas e óxido nítrico, de maneira dependente ou independente de MyD88 (myeloid differentiation primary response protein 88) (Figura 3) (DOHERTY; ARDITI, 2004).



Figura 3 - Esquema representativo da ativação da resposta inata próinflamatória via TLRs. Fonte: Adaptado de Doherty; Arditi, 2004.

Alguns trabalhos demonstram que a sinalização prolongada dos TLRs por componentes do BK, particularmente aqueles associados com a parede celular (ManLAM e 6, 6 *a*-dimicolato de trealose, também conhecido como fator corda, e a lipoproteina de 19kDa), inibem a expressão de genes envolvidos no processamento e apresentação de antígenos através do complexo de

histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II) (Figura 4). Essa inibição é vantajosa para a bactéria, pois a apresentação inadequada de antígenos leva a uma evasão da bactéria à vigilância imune, criando um ambiente propício para sua sobrevivência e persistência dentro dos macrófagos (PAI et al, 2004; HARDING; BOOM, 2010).



Figura 4 – Esquema respresentativo da inibição do processamento e apresentação via MHC-II após estimulação prolongada dos TLRs. Fonte: Adaptado de Harding; Boom, 2010.

Um importante mecanismo de defesa do hospedeiro contra o *M. tuberculosis* é a apoptose de macrófagos infectados. Vesículas apoptóticas, contendo antígenos micobacteriano, são capturadas por outros macrófagos e células dendriticas não infectados na tentativa de eliminar a bactéria de modo mais eficiente (LEE, HARTMAN; KORNFELD, 2009). No entanto, alguns componentes da parede celular do *M. tuberculosis* são capazes de modular a apoptose de macrófagos infectados através da expressão diferencial de genes pró- e antiapoptóticos, como os envolvidos na cascata das caspases (Figura 5, KOUL et al, 2004). Inibindo a apoptose dos macrófagos, o *M. tuberculosis* consegue escapar da célula hospedeira induzindo a morte celular por necrose (Figura 6). Após a necrose, os bacilos liberados multiplicam extracelularmente e são fagocitados por outros macrófagos não infectados, porém estes também falham no controle do *M. tuberculosis* e do mesmo modo são destruídos (LEE, HARTMAN; KORNFELD, 2009; BEHAR, DIVANGAHI; REMOLD, 2010).



Figura 5 – Representação esquemática da inibição das vias apoptóticas do hospedeiro por micobactérias patogênicas. Fonte: Adaptado de Koul et al, 2004.

Além dos macrófagos e células dendríticas, outras células do sistema imune estão envolvidas com a resposta efetiva contra o *M. tuberculosis* (KAUFMANN, 2002), entre elas:

 Células Tαβ (CD8+ e CD4+): respondem a antígenos protéicos, exibidos como peptídeos associados a moléculas de MHC I e II, respectivamente. As células T CD4+ e CD8+ são ativadas nos linfonodos e migram para o foco de infecção guiadas pelas quimiocinas produzidas pelas células infectadas.

- Células Τγδ: reage a antígenos micobacterianos homólogos de proteínas de choque térmico.
- Células T citotóxicas: respondem a antígenos lipídicos bacterianos exibidos pela molécula CD1 (semelhante ao MHC de classe I).



Figura 6 – Ilustração representativa da indução de morte celular por necrose de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* virulento. Fonte: Adaptado de Behar, Divangahi; Remold, 2010.

As células TCD4+ são consideradas as mais importantes para a resposta contra o *M. tuberculosis*, desempenhando funções que são críticas para a ativação dos macrófagos (AHMAD, 2011), como:

- 1. Produção das citocinas IFNγ, TNFα e IL-2;
- Ativação direta de macrófagos através expressão de CD40 ligante em sua superfície;
- Indução da apoptose de macrófagos infectados através da interação Fas/ Fas ligante.

O IFN γ , produzida abudantemente por célula TCD4+ sob influência da interleucina 12, é uma citocina chave na resposta imune protetora contra o *M. tuberculosis.* Induz a transcrição de mais de 200 genes no macrófago, incluindo genes relacionados com a expressão de moléculas do MHC-II e apresentação de antígenos. Em associação com TNF α , aumenta a expressão de iNOS, e consequentemente, a produção de óxido nítrico e outros intermediário reativos de oxigênio (ROI) no macrófago, responsável pela atividade microbicida (AHMAD, 2011).

O TNF- α é outra citocina que também tem um papel protetor importante contra a infecção por *M. tuberculosis*, embora, também contribua para a imunopatologia da TB. O TNF- α induz a expressão de quimiocinas, como IL8, MCP-1, e RANTES que promovem a migração celular para o sítio de infecção, contribuindo para a formação do granuloma (AHMAD, 2011).

1.3.1. Formação do Granuloma

Após fagocitar o *M. tuberculosis*, os macrófagos alveolares produzem citocinas inflamatórias e quimiocinas, que servem de sinalizadores, atraindo outras células do sistema imune para o foco da infecção, porém, assim como os macrófagos infectados essas células também são incapazes de matar a bactéria. O acúmulo de macrófagos, células T, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais no foco da infecção leva a formação de uma estrutura conhecida como granuloma. Essa estrutura é geralmente um meio efetivo de conter a disseminação da bactéria e prover um microambiente que permita a interação dos macrófagos infectados com as outras células do sistema imune e com as citocinas por elas produzidas (PIETERS, 2008).

O granuloma não é o apenas uma estrutura de contenção do *M. tuberculosis*, mas também é a causa de dano tecitual na doença. Assim, o granuloma é responsável tanto pela proteção quanto pela patogênese na TB (AHMAD, 2011; GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Estudos histopatológicos demonstram que o granuloma é um tecido altamente estruturado composto de macrófagos, neutrófilos e outras células do sistema imune, cercada de fibroblastos. A parede fibrótica separa o granuloma do restante do tecido pulmonar. A região central nesse tipo de granuloma consiste de macrófagos e outras células mortas resultante de necrose, tornando o meio caseoso (com consistência de queijo) e hipóxico (concentração baixa de oxigênio). É possível encontrar *M. tuberculosis* residindo nesse centro hipóxico, tanto dentro de macrófagos quanto no meio extracelular (AHMAD, 2011; GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

Em alguns imunocompetentes, a infecção pode ser encerrada nesse momento, ou seja, o granuloma resulta em lesões fibrosas e calcificadas. Entretanto, em imunocomprometidos o centro do granuloma, por um processo ainda desconhecido, torna-se altamente necrótico e posteriormente liquefeito, levando à formação de cavidades. Nas lesões cavitárias, a quantidade de oxigênio é reestabelecida, transformando-se em um meio rico em nutrientes e oxigênio, no qual a bactéria reativada multiplica. O *M. tuberculosis* viável pode *então* escapar do granuloma e se espalhar para ouras partes do pulmão e/ou para outros órgãos via sistema linfático e circulatório (TB miliar ou extrapulmonar) (AHMAD, 2011; GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012). Em indivíduos imunocompetentes, com a formação do granuloma, a progressão da infecção é interrompida, e essa infecção contida, referida como TB latente, pode persistir por décadas na forma assintomática e não transmissível (ZHANG, 2004; AHMAD, 2011; GENGENBACHER; KAUFMANN, 2012).

1.4. Tuberculose - Infecção Latente

Em aproximadamente 90% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo da TB, o sistema imune consegue impedir a sua multiplicação. Contudo, o patógeno só é erradicado completamente em 10% dos casos, enquanto nos outros 90% a infecção é apenas contida, mas não eliminada (LILLEBAEK et al, 2002; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005). Isso ocorre porque o *M. tuberculosis* utiliza um mecanismo de evasão do sistema imunológico, resultando em sobrevivência e persistência de alguns bacilos em um estado não replicativo no hospedeiro por anos, caracterizando a TB latente (BAENA; PORCELLI, 2009, EHRT; SCHNAPPINGER, 2009).

A TB latente consiste no período entre a entrada do *M. tuberculosis* no organismo e o aparecimento da doença. O período de latência da TB pode ser extremamente longo, e as pessoas podem permanecer infectadas com o *M. tuberculosis* de poucas semanas até a vida inteira sem nenhum sintoma clínico da doença (LILLEBAEK et al, 2002; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

Em 5 a 10% dos indivíduos com infecção latente, em algum momento de suas vidas, o bacilo sofrerá um processo de reativação e a infecção progredirá com manifestações clínicas da doença. Esses indivíduos, nos quais a infecção é reativada tornam-se novos transmissores do bacilo, contribuindo de forma negativa para a epidemiologia da doença. Portanto, a infecção latente representa um obstáculo importante no controle da TB (LILLEBAEK et al, 2002; KRITSKI; CONDE; SOUZA, 2005).

O *M. tuberculosis* é um patógeno preocupante por causa de sua extraordinária capacidade de se adaptar às mudanças ambientais ao longo da infecção. Na TB latente as condições desfavoráveis encontradas no microambiente do granuloma (hipóxia, pH baixo, limitação de nutriente e presença de óxido nítrico) aumentam a expressão de vários genes da bactéria envolvidos com a indução da dormência metabólica (BRETL, DEMETRIADOU; ZAHRT, 2011).

A dormência metabólica pode ser definida como um estado reversível de "desligamento" metabólico da bactéria. O termo "bactéria dormente" refere-se à bactéria que permanence viável, porém com atividade metabólica muito reduzida, e não forma colônias imediatamente quando cultivadas em meio sólido, sendo necessário para isso, um processo de "ressucitação" sob condições apropriadas (ZHANG, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado mudanças morfológicas (tamanho e forma) adaptativas do bacilo em resposta a condições de estresse. As mudanças morfológicas, observadas incluem: espessamento da parede celular, formação de células ovóides, redução de tamanho, e divisão celular por brotamento, resultando em produção de células parecidas com esporos (SHLEEVA et al, 2011; VELAYATI et al, 2011).

Achados recentes da formação de estruturas semelhantes a esporo em *M. bovis* BCG, *M. marinum*, e *M. smegmatis* em resposta à fase estacionária prolongada ou privação de nutrientes sugere que a esporulação pode ser um mecanismo geral na dormência micobacteriana (GHOSH et al, 2009). Porém, não existe um consenso em relação a isso, e as opniões sobre esse tema são bastante controversas na literatura (TRAAG et al, 2009).

Entre as mudanças morfológicas observadas durante a infecção latente está a perda da característica álcool-ácido resistência, e essa perda reflete alterações na composição da parede celular que podem ocorrer nessas lesões *in vivo*. Bactérias com alterações na estrutura da parede celular, podem se tornar consideravelmente menos imunogênicas e assim conseguem escapar da ação do sistema imune e persistir por longos períodos no organismo humano (VELAYATI et al, 2011).

O tema "dormência bacteriana" tem recebido atenção especial nos últimos anos devido a sua importância na área médica e de saúde pública, visto que, bactérias dormentes possuem a característica de resistir a vários tipos de agentes antimicrobianos (FILIPPINI et al 2010; TUDÓ et al, 2010; PATEL et al, 2012). No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos com a indução e manutenção da dormência não estão completamente esclarecidos.

Entre as condições ambientais do granuloma que podem induzir ou facilitar a formação de células dormentes está a depleção de oxigênio (hipóxia) (VELAYATI et al, 2011).

1.4.1. Hipóxia

Na TB latente, o centro necrótico do granuloma ocorre uma baixa tensão de oxigênio. A privação de oxigênio altera a expressão de mais de 100 genes

34

do *M. tuberculosis*, dos quais, aproximadamente 50 estão sob controle direto do regulador DosR (SHERMAN et al, 2001; PARK et al, 2003).

O regulador DosR pertence ao sistema de transdução de sinal de dois componentes, DosS/DosR. Esse sistema é, em geral, composto por uma molécula sensora quinase, DosS (Rv3132c), localizada na membrana, e um regulador de transcrição, DosR (Rv3133c), presente no citoplasma da bactéria (SAINI et al, 2004).

Ao reconhecer o estímulo ambiental (hipóxia) a molécula sensora sofre um processo de dimerização e se autofosforila *in trans* em um resíduo de histidina conservado e presente dentro de cada monômero. As moléculas fosforiladas transferem este grupo fosfato para um resíduo de ácido aspártico conservado no domínio receptor na molécula reguladora cognata. Esta, por sua vez, sofre uma alteração de conformação, o que promove a sua ligação ao DNA, permitindo o controle da transcrição de vários genes necessários para modular funções da bactéria na hipóxia (BAGCHI et al, 2005; BRETL, DEMETRIADOU,; ZAHRT, 2011).

Os 50 genes ativados pelo DosR são coletivamente denominados "regulon" de dormência. Contudo, as funções, *in vitro* e *in vivo,* da maioria desses genes permanecem desconhecidos (SHERMAN et al, 2001; FLORCZYK et al, 2003; PARK et al, 2003; CHAUHAN; TYAGI, 2008). Dos genes que estão sob controle direto do regulador DosR, a ativação mais significativa é a do gene *hspX* (Rv2031c).

1.4.2. Heat shock protein (HspX)

A proteína HspX (16kDa), também conhecida como proteína homóloga da α-cristalina, é codificada pelo gene *hspX* (435pb). Induzida sob condições de hipóxica, a proteína HspX foi originalmente descrita como um antígeno dominante do *M. tuberculosis* frequentemente reconhecido pelo soro de uma alta proporção de pacientes com infecção assintomática. Por esta razão, é considerado um elemento fortemente associado com a TB latente (YUAN et al, 1996; WILKINSON et al, 1998; HU; COATES, 1999; SHERMAN et al, 2001; BECK et al, 2005; DAVIDOW et al, 2005; DEMIESSIE et al, 2006; GORDILLO et al, 2006; RABAHI, et al, 2007).

Devido a sua alta imunogenicidade e ao fato de que, a vacinação com a BCG sozinha não é capaz de induzir uma resposta imune contra esse antígeno, a proteína HspX vem sendo utilizada no desenvolvimento de novos testes diagnósticos e /ou na construção de novas vacinas (GELUK et al, 2007; SENOL et al, 2007; SHIN et al, 2010; SPRATT, BRITTON; TRICCAS, 2010; WU et al, 2010).

Alguns estudos sugerem um papel da proteína HspX na patogênese da TB, uma vez que a proteina HspX é necessária para o crescimento de *M. tuberculosis* em cultura de macrófagos humanos THP-1, e que mutantes com o gene *hspX* inativado são severamente atenuados (FONTÁN et al, 2008).

A transcrição do gene *hspX* inicia quando o bacilo em ambiente aeróbico é submetido a uma depleção gradual de oxigênio disponível no meio, condição que ocorre tanto na fase estacionária de crescimento bacteriano *in vitro*, quanto após a fagocitose pelos macrófagos e dentro do granuloma (YUAN et al, 1998;
DESJARDIN et al, 2001; MONAHAN et al, 2001; SHERMAN et al, 2001; SCHNAPPINGER et al, 2003; BACON et al, 2004).

In vitro, a proteína HspX é sintetizada em baixas quantidades durante a fase logarítima (*log*) do crescimento bacteriano. Entretanto, um aumento expressivo dessa síntese ocorre na transição da fase *log* para a estacionária, tornado-se uma das proteínas mais abundantes nessa fase, respondendo por 25% da expressão protéica total (SMITH, 2003; VOLPE et al, 2006).

A proteína HspX é considerada um regulador negativo de crescimento, visto que, a superexpressão do gene *hspX* desacelera o crescimento do *M. tuberculosis in vitro*, enquanto a sua deleção resulta no aumento do crescimento bacteriano *in vivo* (YUAN et al, 1996; HU et al, 2006).

Devido a sua homologia com a proteína α-cristalina, uma chaperona envolvida com o enovelamento de proteínas, tem sido proposto um papel para a proteína HspX na manutenção da viabilidade da bactéria durante a TB latente através da estabilização de estruturas celulares (VERBON et al, 1992; YANG et al, 1999; VALDEZ et al, 2002).

Muitas evidências relacionam TB latente, hipóxia e dormência metabólica com mudanças na morfologia e no metabolismo do *M. tuberculosis*. Acredita-se que na TB latente, as células bacterianas tornam-se mais heterogêneo, em morfologia e estado metabólico, como uma forma do bacilo manipular o sistema imune e garantir sua sobrevivência e persistência por longos períodos no hospedeiro (CUNNINGHAM ; SPREADBURY, 1998; FONTÁN et al, 2008; DEB et al 2009). Porém, não há evidências se essa

37

adaptação, morfológica e metabólica, está relacionada com a resposta genética pelo qual *M. tuberculosis* se adapta às condições de hipóxia no hospedeiro.

Baseado na forte regulação do gene *hsp*X durante a hipóxia, que torna a proteína HspX uma das mais abundantes na TB latente, em combinação com trabalhos que evideciam sua localização tanto na parede celular e em frações da membrana celular do *M. tuberculosis* (MAWUENYEGA et al, 2005), levantou-se a seguinte hipótese: A expressão da proteína HspX do *M. tuberculosis* em resposta à hipoxia pode desencadear uma resposta transcricional envolvida com a adaptação morfológica e /ou metabólica da bactéria para o estado de dormência?

Atualmente, entre as frustações no controle da TB está o fato de que os antimicrobianos disponíveis são incapazes de matar bacilos dormentes, e o tratamento anti-TB ser longo. O prologamento da terapia, por sua vez, contribui para a falta de adesão (abandono do tratamento), e consequentemente para surgimento de cepas cada vez mais resistente às drogas anti-TB (CARDOSO et al, 2004; BARCO et al, 2006; CARDOSO et al 2007; WHO, 2012).

Portanto, apesar da existência de recursos terapêuticos capazes de promover o controle da TB, ainda não há perspectiva de obter-se, em futuro próximo, sua eliminação como problema de saúde pública. Segundo a OMS, entre os obstáculos à eliminação da TB está principalmente, a emergência de cepas resistentes ao tratamento, a coinfecção com o vírus HIV e a TB latente (WHO, 2012).

Por esta razão, a erradicação completa da TB exige também a erradicação da infecção latente. O diagnóstico e tratamento eficaz da TB latente reduz, significativamente, o risco de desenvolvimento e de transmissão

da doença. Atualmente, o esquema de terapia preventiva preconizada é o uso de Isoniazida por 6 a 9 meses. Entretanto, assim como os outros fármacos utilizando no tratamento da TB, a Isoniazida é uma droga que tem ação contra bactéria em multiplicação e nenhuma atividade contra bactéria dormente. O seu uso é indicado apenas para indivíduos diagnosticados com infecção latente recente e/ou que possuem risco elevado de apresentar uma rápida progressão para a doença (BRASIL, 2011).

O desenvolvimento de novos fármacos que atuem em fases diferentes da infecção, ou seja, sobre os bacilos em estado metabólicos distintos contribuirá para reduzir o tempo de tratamento da doença. Essa redução será de extrema importância para a clínica, visto que a terapia prolongada tende a comprometer a adesão ao tratamento por parte dos pacientes, e consequentemente, favorece a seleção de cepas resistentes às drogas anti-TB. Entretanto, para o desenvolvimento de fármacos que atuem na infecção latente, faz-se necessário conhecer e entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na indução e na manutenção da dormência metabólica da bactéria.

Portanto, os resultados desse estudo poderão contribuir para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na indução da dormência bacteriana. A melhor compreensão desses mecanismos envolvidos tanto no estabelecimento como na manutenção da infecção latente é considerada uma importante estratégia na busca de novos alvos moleculares que auxiliem no desenvolvimento de drogas capazes de matar o *M. tuberculosis*, em estados metabólicos distintos.

#OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a relação entre a expressão da proteína de latência HspX do *M. tuberculosis* e a expressão de genes evolvidos com a síntese de componentes da parede celular, de replicação do DNA e divisão celular, utilizando *Mycobacterium smegmatis* como organismo modelo.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Clonar o gene *hsp*X da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv no vetor de expressão pFPCA1*GFP*;

2.2.2. Expressar a proteína HspX em *M. smegmatis* mc²155;

2.2.3. Confirmar a expressão da proteína HspX por meio de *Western blotting*;

2.2.4. Analisar pela RT-qPCR, a expressão do mRNA dos genes envolvidos com a síntese de componentes da parede celular e com o processo de divisão celular em *M. smegmatis* mc²155 expressando a proteína HspX;

2.2.5. Analisar pela RT-qPCR, a expressão do mRNA de genes relacionados com a resposta imune inata em macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 expressando a proteína HspX.

#MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e métodos

3.1. Cultivo da cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

No laboratório de Biossegurança nível 3 (anexo ao Laboratório de Biologia Molecular Aplicado ao Diagnóstico), utilizando cabine de segurança classe II B2, a cepa referência de *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) mantida em glicerol a -20°C, foi repicada em meio líquido *Middlebrook 7H9* (BBL[™] - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% do complexo de enriquecimento albumin-dextrose-catalase (ADC) e 0,2% de glicerol, e incubadas a 37°C com agitação a 200rpm por 10 dias. Após esse período, a cepa foi semeada em meio *Lowenstein-Jensen* (LJ) e incubada a 37°C por um tempo superior a 20 dias. As colônias crescidas nesse meio foram utilizadas para a extração de DNA genômico.

3.2. Extração do DNA

A extração do DNA do *M. tuberculosis* H37Rv foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Ribeiro (2006). Com o auxílio de uma alça descartável, uma pequena porção de colônias crescidas no meio LJ foi depositada em um tubo de microcentrifuga contendo 1mL de água deionizada estéril e, em seguida, homogeneizadas em vortex por 10 segundos. Os tubos foram aquecidos a aproximadamente a 95°C em bloco aquecedor (TECHNE, DRI-BLOCK®, Cambridge, Inglaterra), por 20 minutos, e imediatamente submetidos a uma temperatura de -20°C por um período mínimo de 20 minutos ou até o momento de sua utilização.

3.3. Amplificação do gene *hspX* pela PCR

O gene *hsp*X foi amplificado pela PCR empregando o DNA do *M. tuberculosis* H37Rv como molde, e oligonucleotídeos iniciadores selecionados com base nas seqüências disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Utilizou-se o programa *Primer Premier 5.0* (PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, EUA) para a análise das melhores seqüências (tabela 1).

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a amplificação do gene *hspX* pela PCR.

Gene	№ de acesso (NCBI)	Oligonucleotideos (5'→ 3')	Tamanho do produto (pb)
hspX	887579	(S) TCAGTTGGTGGACCGGAT	435

Legenda: S – iniciador senso; AS – iniciador anti-senso.

A amplificação do gene *hsp*X foi realizada utilizando DNA genômico de *M. tuberculosis* H37Rv como molde, 1U da enzima *Pfu* DNA Polimerase (Biotools, Madrid, Spain), 1X do tampão de PCR (Biotools, Madrid, Spain), 200µM de cada dNTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), e 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador (Prodimol, Minas Gerais, Brasil), em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA). A programação utilizada foi a seguinte: Uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1min, hibridização a 61°C por 1min, polimerização a 72°C por 1min, e ao término dos ciclos uma polimerização final a 72°C por 10 min.

Os produtos da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose "Low melting" 1% utilizando TBE 0,5X nas seguintes condições: 100V, 60mA por 40 minutos. Os fragmentos de tamanho esperado foram recuperados do gel e purificados utilizando o kit Illustra GFX[™] PCR DNA and Gel Band (GE Helthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

3.4. Clonagem no vetor pGEM[®]-T Easy Vector

3.4.1. Reação de adenilação

Foi feita uma reação de adenilação dos produtos da PCR antes da ligação com o vetor pGEM[®]-T Easy Vector (figura 7), pois este é fornecido pelo fabricante na forma linear com um resíduo de timina nas extremidades 3' para aumentar a eficiência da ligação com o produto da PCR prevenindo a recircularização do vetor. No entanto, diferentemente da *Taq* DNA polimerase, que tende a acrescentar o nucleotídeo adenosina na extremidade 3' de cada fita que ela sintetiza, a *Pfu* DNA Polimerase não apresenta essa propriedade, requerendo essa ação adicional (TEODORO, 2009).



Figura 7: Desenho esquemático do pGEM-T® easy vector. Fonte: Manual do Fabricante Promega Inc. (Madison, USA).

Para cada reação de adenilação foi utilizado o produto da PCR purificado do gel de agarose, 1U de *Taq* DNA Polimerase (Biotools, Madrid, Spain), 1X do tampão da PCR (Biotools, Madrid, Spain) e 125μM de dATP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA) a 72°C por 30 minutos.

Os produtos da adenilação foram purificados por precipitação com Etanol. Ao tubo contendo o produto de adenilação foram adicionados 2 volumes de Etanol absoluto gelado e 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH=5,2), e o tubo foi deixado em gelo seco por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 13.000rpm por 30min, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressupendido com 1 volume de Etanol 70% e novamente centrifugado a 13.000rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o tubo deixado sobre a bancada até que o etanol evaporasse completamente. O *pellet* foi então ressuspendido em água deionizada estéril e o DNA quantificado utilizando o equipamento Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, EUA).

3.4.2. Reação de ligação

Na reação de ligação foi utilizado o produto da adenilação purificado (inserto) e o plasmideo pGEM-T (vetor), na proporção molar de 3:1, tampão da ligase contendo ATP (1X), 1U da enzima Ligase (Promega, Madison, USA) e água deionizada estéril em um volume final de 10µL. A reação foi incubada *overnight* à temperatura ambiente.

3.4.3. Preparo das células de E. coli quimiocompetentes

Uma colônia de *Escherichia coli* (*E. coli*) TOP10F (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) foi repicada para 50mL de meio líquido Luria Bertani (LB) e incubada por 3hs a 37°C com agitação. Após o período de incubação a cultura foi resfriada em gelo por 10 minutos e em seguida, centrifugadas a 5000rpm (4°C por 10 minutos) para a remoção do meio de cultura. O sedimento de células bacterianas foi ressuspendido em 30mL da solução MgCl₂(80mM)-CaCl₂(20mM) gelada, novamente centrifugada a 5000rpm (4°C por 10 minutos) e o sobrenadante descartado. As células foram então ressuspendidas em 2mL da solução de CaCl₂ 0,1M gelada.

3.4.4. Transformação das células de E. coli quimiocompetentes

As células de *E. coli* quimiocompetentes tratadas com cloreto de cálcio foram transformadas com os plasmídeos pGEM-T recombinantes (pGEM[®]-T::*hsp*X) por choque térmico, segundo protocolo descrito em Sambrook e Russel (2001).

Para cada 100µL de bactéria quimiocompetente foram adicionados 10µL do produto de ligação dos genes *hsp*X com o vetor pGEM[®]-T. A mistura foi resfriada em gelo por 30 minutos e em seguida incubada a 42°C por 90 segundos e novamente resfriada por 2 minutos em gelo. Ao tubo contendo a mistura foram adicionados 900µL de meio SOC gelado (meio LB líquido contendo glicerol e MgCl₂). Após homogeneização a cultura foi transferida para um tubo de ensaio e incubada a 37°C por 90 minutos com agitação constante. Após esse período, 300µL da cultura foram semeados em placas de LB ágar

contendo o antibiótico ampicilina na concentração de 100µg/mL (gene de resistência no vetor - figura 7). As placas foram incubadas a 37ºC por 16-18hs.

As colônias isoladas obtidas foram repicadas para um tubo contendo 5mL de meio LB líquido contendo ampicilina (100µg/ml). Após incubação a 37ºC por 18h, foi realizada a purificação dos plasmídeos utilizando o *Plasmid Mini Kit* (Qiagen Strasse, Hilden, Germany) conforme instruções do fabricante.

Os plasmídeos purificados foram digeridos com a enzima de restrição *Eco*RI (Fermentas, Ontário, Canadá) para uma seleção prévia de clones contendo os insertos de interesse. Na restrição enzimática, para cada 1µg de plasmídeo foram utilizados: 1U da enzima *Eco*RI em tampão 1X contendo BSA (Fermentas, Ontário, Canadá), em um volume final de 10µL. Os tubos contendo a reação foram incubados em termobloco a 37 ℃ durante 4 horas. Após o período de incubação, os produtos da digestão foram analisados pela eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X nas seguintes condições: 100V, 60mA por 40 minutos.

3.4.5. Sequenciamento de DNA

Os plasmídeos previamente selecionados pela restrição enzimática foram submetidos ao sequenciamento de DNA para a confirmação da presença do gene inserido para confirmação da sequencia de interesse. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano (Instituto de Biociências, USP, São Paulo, Brasil) utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. Os oligonucletideos iniciadores utilizados hibridizam em regiões que frangueam as regiões PUC /M13 junto do

sitio de múltipla clonagem no vetor pGEM-T. São eles: foward (F) : 5'- GTT TTC CCA GTC ACG AC -3' e reverse: (R) 5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC -3'. Os resultados dos sequenciamentos foram analisados inicialmente no Instituto de Biociências utilizando o software *Sequencing Analysis* 5.3.1, e posteriormente, analisadas no nosso laboratório utilizando o programa *BioEdit Sequence Alignment Editor.*

3.5. Subclonagem do gene hspX no plasmídeo pFPCA1GFP

O gene *hsp*X foi subclonado no vetor de expressão pFPCA1*GFP*, gentilmente cedido pelo Dr. Scott Franzblau da Universidade de Illinois, Chicago, EUA (Figura 8).



Figura 8: Desenho esquemático do vetor de expressão pFPCA1*GFP.* Fonte: Luckner, 2009.

Esse vetor possui além das origens de replicação em *Escherichia coli* (*E. coli*) (*ori*C) e em micobactérias (*ori*M), o gene *aph* que codifica para uma enzima que confere resistência ao antibiótico kanamicina, e o gene *gfp* que codifica para a proteína verde fluorescente (GFP) sob controle do promotor da

acetamidase (Pace). O gene hspX foi inserido no vetor acima substituindo o gene gfp.

Para isso, o gene *hsp*X foi amplificado pela PCR utilizando o clone $pGEM^{\textcircled{m}}$ -T::*hspX* (item 3.4) como DNA molde. Oligonucleotídeos iniciadores (tabela 2) contendo na extremidade 5' os sítios de reconhecimento das endonucleases de restrição que flanqueiam o gene *gfp* (*Bam*HI e *Cla*I) foram utilizados para clonagem direcional no plasmídeo pFPCA1 Δgfp .

Tabela 2- Iniciadores utilizados na amplificação do gene *hsp*X pela PCR para subclonagem no vetor pFPCA1Δ*gfp*

Gene	Oligonucleotideos (5' \rightarrow 3')	Tamanho do produto (pb)	
hspX	(S) gttg <u>atcgat</u> TCAGTTGGTGGACCGGAT <i>Cla</i> I	454	
	(AS) ccg <u>ggatcc</u> ATGGCCACCACCCTT <i>Bam</i> HI	(435+19)	

Legenda: S – iniciador senso; AS – iniciador anti-senso.

A amplificação do gene *hsp*X foi realizada utilizando além do DNA molde, 1U da enzima *Platinum®* Pfx *DNA Polymerase* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), tampão de amplificação Pfx 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 2mM de MgSO₄, 200µM de cada dNTP (GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), e 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador, em termociclador PTC-200 (MJ Research Inc., MA, EUA). A programação da reação de amplificação no termociclador foi: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1min, hibridização a 61°C por 1min, polimerização a 72°C por 1min, e ao término dos ciclos uma polimerização final a 72ºC por 10 min. Os produtos da PCR foram analisados pela eletroforese em gel de agarose 1% utilizando TBE 0,5X nas seguintes condições: 100V, 60mA por 40 minutos.

3.5.1. Restrição enzimática do produto da PCR e vetor pFPCA1GFP

Aproximadamente 5µg do plasmídeo pFPCA1*GFP* e 5µg do produto da amplificação do gene *hsp*X foram submetidas a uma digestão dupla com as enzimas *Bam*HI-HF e *Cla*I (5U de cada para o produto da PCR e 15U de cada para o plasmídeo) (New England BioLabs Inc., Bervely, MA, EUA), tampão *NEBuffer 4* 1X, BSA 1X e água deionizada estéril em um volume final de 50µL. Os tubos foram incubados em termobloco a 37 °C por 4 horas. Em seguida, os fragmentos de digestão foram separados pela eletroforese em gel de agarose "Low melting" 1% utilizando TBE 0,5X nas seguintes condições: 100V, 60mA por 40 mintos. Os fragmentos de interesse (produto da PCR do gene *hsp*X e plasmídeo sem o gene *gfp*) foram removidos do gel e purificados empregando o kit Illustra GFXTM PCR DNA and Gel Band (GE Helthcare, Buckinghamshire, Inglaterra).

Após a purificação, os fragmentos foram quantificados e ligados, utilizando inserto (*hsp*X) e vetor (pFPCA1 Δgfp) na taxa molar de 3:1, tampão contendo ATP 1X, 1U da enzima Ligase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), e água deionizada estéril em um volume final de 20µL para cada reação. A reação de ligação foi incubada à temperatura ambiente *overnight*. Os produtos dessa ligação foram usados para transformar células de *E. coli* TOP10F (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA).

3.5.2. Transformação das células de E. coli quimiocompetentes

Células de *E. coli* quimiocompetentes tratadas com cloreto de cálcio 0,1M (item 3.4.3) foram transformadas com o produto de ligação pFPCA1::hspX por choque térmico, conforme protocolo descrito no item 3.4.4. Porém, nesse momento o antibiótico utilizado para seleção de células transformadas foi canamicina na concentração de 30µg/mL.

As colônias isoladas foram recuperadas das placas contendo kanamicina e repicadas em 5mL de caldo LB com canamicina (30µg/ml), e após 18hs de incubação a 37ºC a 100rpm realizou-se a extração dos plasmídeos utilizando o kit *Plasmid Mini Kit* (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany).

Os clones contendo o gene de interesse foram previamente selecionados através da digestão enzimática dos plasmídeos recombinantes com as enzimas *Cla*l-HF e *Bam*HI-HF. Para cada 1µg de plasmídeo foram utilizados 3U de cada enzima, tampão *NEBuffer 4* 1X, BSA 1X e água deionizada estéril em um volume final de 10µL. Os tubos foram incubados em termobloco a 37 °C por 4 horas. Após o período de incubação, os produtos da digestão foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5X nas seguintes condições: 100V, 60mA por 40 minutos. Aqueles clones que após a restrição liberaram um fragmento com tamanho de aproximadamente 454pb foram submetidos ao sequenciamento de DNA para confirmação da presença do inserto, conforme descrito no item 3.4.5. Os clones nos quais o gene *hsp*X foi inserido corretamente foram utilizados para transformar células de *Mycobacterium smegmatis* (*M. smegmatis*) mc²155.

3.6. Expressão da proteína HspX em *M. smegmatis* mc²155

*3.6.1. Preparo de células de M. smegmatis mc*²155 eletrocompetentes

Uma colônia de *M. smegmatis* foi repicada em 100mL de meio líquido Middlebrook 7H9 (BBL[™] - Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks, MD, EUA) suplementado com 10% do complexo de enriquecimento albumindextrose-catalase (ADC), 0,2% de glicerol e 0,05% tween 80, e incubadas a 37 °C a 200rpm até atingir DO₆₀₀=0,6. Nesse momento, a cultura foi mantida em gelo por 30 minutos, e em seguida, centrifugada a 5000rpm por 15 minutos a 4°C para a remoção do meio de cultura. As células foram lavadas 3 vezes com 10mL de glicerol 10% gelado e ao final das lavagens as células foram ressuspendidas em 2mL de glicerol 10% gelado. As células foram mantidas em gelo durante todo o experimento.

3.6.2. Eletroporação de células de M. smegmatis mc²155

Para cada 110µL de células de *M. smegmatis* eletrocompetentes foi adicionado 1µg do plasmídeo pPFCA1::*hsp*X purificado. A mistura foi mantida no gelo durante 30 minutos e em seguida transferida para uma cubeta de 0,2cm (BioRad, Hercules, CA, USA) gelada. A transformação foi realizada utilizando o equipamento Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nas seguintes condições: 2,5kV, 1000 Ω e 25µF. Em seguida, 900µL de meio Middlebrook 7H9 gelado (10% ADC + 0,2% de glicerol + 0,05% tween 80) foi adicionado às células e estas transferidas para tubos de ensaio e incubadas a 37°C por 3 horas a 250rpm. Após esse período, 300µL da cultura foram semeados em placas de meio Middlebrook 7H10 (10% ADC + 0,2% de glicerol)

contendo canamicina (30µg/mL), e incubadas em estufa a 37ºC por 72hs. As colônias isoladas recuperadas do meio com antibiótico foram selecionadas para a expressão da proteína HspX.

3.6.3. Indução do promotor da acetamidase

As colônias selecionadas foram transferidas para um tubo contendo 5mL de meio Middlebrook 7H9 (10% ADC + 0,2% de glicerol + 0,05% tween 80) com canamicina ($30\mu g/mL$), e incubadas a $37^{\circ}C$ a 200rpm por 72horas. Após esse período de incubação, as culturas foram diluídas (1:100) em meio Middlebrook 7H9 (10% ADC + 0,2% de glicerol e 0,05% tween 80) e novamente incubado a $37^{\circ}C$ a 200rpm até a saturação.

As culturas saturadas foram novamente diluídas para uma DO₆₀₀=0,02 em meio Middlebrook 7H9 (0,2% succinato de sódio, 0,05% tween 80 e 30µg/mL de canamicina). As culturas diluídas foram incubadas a 37ºC a 200rpm até a DO₆₀₀ atingir 0,4. Nesse instante, cada cultura foi divida em duas partes. Em uma das partes, foi adicionando acetamida (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em uma concentração final de 0,2%. As duas partes, induzida e não induzida, foram incubadas 37°C a 200rpm por 24hs. Após esse período foi realizada a extração de proteínas.

3.6.4. Extração de proteínas

As culturas, induzida e não induzida, foram centrifugadas a 5000xg por 10min a 4°C para remoção do meio de cultura. O precipitado de células foi lavado 2 vezes com PBS 1X gelado (pH=7,4). Após a lavagem com PBS, foi adicionado ao precipitado de bactérias o mesmo volume (visualmente) de pérolas de vidro (0,5mm), aproximadamente 1mL do tampão de extração NP-40 (NaCl 150mM, Triton X-100 1%, Tris 50mM pH=8,0) e o inibidor de proteases PMSF (1mM). O sedimento foi ressuspendido e as amostras foram agitadas em agitador tipo vortex por 1 minuto, seguido de resfriamento no gelo por 1minuto. Repetiu-se 5 vezes esse procedimento. Para remover as pérolas, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10min a 4 $^{\circ}$ C.

O sobrenadante foi transferido para um microtubo (1,5mL). Para a remoção do restante de detritos celulares as amostras foram novamente centrifugadas a 13000 rpm por 5-10min a 4°C. E o sobrenadante transferido para um novo tubo, ao qual, foram adicionados 4vol de acetona gelada (-20°C). As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 1 hora a -80°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Para a acetona restante evaporar, os tubos foram deixados sobre a bancada com a tampa aberta à temperatura ambiente por 30 minutos. O precipitado de proteínas foi então ressuspendido em tampão NP-40 com inibidor de protease PMSF (1mM). As proteínas foram quantificadas utilizando o Kit BCA Protein Assay Kit (Pierce) e a expressão da proteína HspX foi analisado por *Western Blotting* (WB).

3.6.5. Análise da expressão de HspX por Western Blotting

A separação das proteínas foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Aproximadamente 50µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra (azul de bromofenol 0,1%, glicerol 10%, Tris-Cl 50mM pH=6,8, DTT 100mM e SDS 2%), a mistura foi

aquecida a 100°C por 5 minutos e em seguida aplicada no gel Mini-PROTEAN[®] Precast Gels 4-20% (BioRad Laboratórios Brasil, SP, Brasil). A corrida eletroforética foi realizada utilizando o tampão Tris-glicina 1X (pH=8,3), nas seguintes condições: 70V, 400mA, 400W por 15 minutos e 100V, 400mA, 400W por 1hora e 40 minutos.

Foram utilizados dois géis contendo as mesmas amostras. Após a eletroforese, um dos géis foi corado com Coomassie Blue. Inicialmente, o gel foi incubado *overnight* em uma solução de coloração contendo metanol 50%, ácido acético 10% e corante Coomassie Blue 0,25% (BioRad Laboratórios Brasil, SP, Brasil). No dia seguinte, o gel foi descorado em uma solução contendo 67,5% de H₂0, 7,5% ácido acético e 25% metanol. A solução de descoloração era trocada a cada 1-2 horas. O gel foi descorado sob agitação até que as proteínas se tornassem visíveis. O outro gel foi utilizado para o *Western Blotting*.

As proteínas separadas no gel foram transferidas para uma membrana de PVDF 0,22µm (BioRad Laboratórios Brasil, SP, Brasil) utilizando o sistema de transferência semi-seco Trans-Blot® SD (BioRad Laboratórios Brasil, SP, Brasil). A membrana de PVDF foi recortada do tamanho proporcional ao gel e previamente ativada com metanol por 1-2 minutos. Em seguida, o gel, a membrana e o papel filtro foram equilibrados no tampão de transferência 1X gelado (48mM Tris, 39mM glicina e 20% metanol) por 5min. Após esse período, transferência foi montado 0 sanduíche de composto de: papel filtro/membrana/gel/papel filtro. As condições da transferência foram: 25V, 70mA por 1hora.

Para minimizar as ligações inespecíficas, após a transferência, a membrana foi bloqueada por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação com uma solução de 2% de ECL Advance Blocking Agent (GE Healthcare do Brasil Ltda, SP, Brasil) em TBST (Tris-HCl 20 mM, pH= 7,5, NaCl 0,9% e 0,1% de Tween 20). Em seguida, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST.

Após o bloqueio e lavagem, a membrana foi transferida para o sistema de detecção de proteína SNAP I.D (Millipore, Billerica, MA, USA). Nesse sistema, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-HspX (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), diluído 1:100 em solução de bloqueio 0,5% com TBST por 10 minutos a temperatura ambiente. Após 3 lavagens com TBST, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário goat anti-mouse IgG-HRP conjugado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), diluído 1:5.000 em solução de bloqueio 0,5% com TBST, por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBST. As proteínas foram visualizadas utilizando o sistema de detecção *"ECL Advance Western Blotting detection Kit"* (GE Healthcare do Brasil Ltda, SP, Brasil) e o sistema de fotodocumentação ImageQuant[™] 400 (GE Healthcare do Brasil).

3.7. Análise macro e microscópica das bactérias

Para cada bactéria, induzida e não induzida, foram preparados esfregaços das culturas e estas coradas pela técnica de *Ziehl Neelsen* utilizando o kit de coloração da LaborClin (Pinhais, PR, Brasil). Também foram feitas semeaduras em estria em meio *Middlebrook 7H10* (10% ADC + 0,2% de

glicerol + 0,05% tween 80) contendo 30μ g/mL de canamicina, quando necessário. As placas de 7H10 foram incubadas em estufa a 37° C por 72hs.

3.8. Extração de RNA

O RNA das culturas bacterianas, expressando a proteína HspX, foi extraído segundo o protocolo descrito por Cecon (2009) utilizando o kit *Qiagen Rneasy Mini Kit* (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany), com algumas modificações. Uma etapa prévia de lise da parede bacteriana foi necessária antes de utilizar o kit. Para isso, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm a 4° C por 10 minutos para a remoção do meio de cultura. O precipitado de células foi lavado 2 vezes com PBS 1X gelado (pH=7,4). Ao sedimento foram adicionadas microesferas de vidro (0,5 mm) e 600µL do tampão de lise RLT (fornecido no kit) que contém isotiocianato de guanidina adicionado de β -mercaptanol.

O sedimento foi ressuspendido e as amostras bacterianas foram submetidas à ruptura da parede celular utilizando o equipamento Tissuelyser II (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany) com uma frequência de 30Hz/seg por 7min a -20°C. Para remover as pérolas, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C, e todo o sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrifuga (1,5mL). As demais etapas da extração foram conduzidas conforme recomendações do fabricante do kit. A quantificação e a análise da integridade do RNA extraído foram realizadas utilizando o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e a plataforma Bioanalyzer 2100 (RNA 6000 Nano Chip) (Figura 9) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), respectivamente.



Figura 9: Avaliação da integridade do RNA extraído utilizando a plataforma Bioanalyzer.

3.9. Tratamento do RNA com DNAse

A fim de evitar amplificação de eventual DNA extraído concomitantemente com o RNA total, as amostras foram previamente tratadas com a enzima DNAse I (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Para cada 1µg de RNA foi utilizado 1U de DNAse I Amplification Grade e Tampão de reação 1X e a amostra foi incubada por 15min a temperatura ambiente. Em seguida, a enzima foi inativada adicionando-se EDTA 2,5mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) e aquecendo a amostra a 65°C por 10min.

3.10. Transcrição reversa com PCR (RT-PCR)

A fita de DNA complementar (cDNA) foi sintetizada utilizando 200ng de RNA, 200ng de iniciadores randômicos (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 10mM de ditiotreitol (DTT) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), 500 μ M de cada dNTP (GE, Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), 200U da enzima *SuperScriptTM II Reverse Transcriptase RNase H* e tampão da enzima 1X (Invitrogen,

Carlsbad, CA, EUA). A RT-PCR foi realizada em termociclador (PTC 200, MJ Research Inc., MA, EUA), com as seguintes etapas: 25 ℃ por 10 minutos; 42 ℃ por 50 minutos e 70 ℃ por 15 minutos. O produto obtido foi armazenado a -20 ℃.

3.11. PCR em Tempo Real (RT-qPCR)

A medida quantitativa da expressão do RNAm dos genes listados da tabela 3 foi realizada pela PCR em Tempo Real (RT-qPCR) utilizando o sistema de detecção *Sybr*® *Green PCR* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para isso, foi utilizado o sistema semi automatizado 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise da expressão gênica foi realizada por método de quantificação relativa utilizando o gene *rrs*, que codifica para a subunidade 16S de bactérias, como referência endógena.

Na reação de amplificação além do cDNA e dos reagentes fornecidos no *Fast Sybr*® *Green PCR* Master Mix 2X (Sybr® Green I Dye, AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, ROX[™] dye Passive Reference, dNTPs e tampão otimizado), foram adicionados 200nM de cada oligonucleotídeo iniciador e água DPEC estéril em um volume final de 10µL. Todas as reações foram realizadas em duplicata e controles negativos (sem adição de cDNA) foram adicionados afim de verificar possíveis contaminações dos reagentes.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação pela PCR em tempo real (tabela 3) foram selecionados com base nas sequências disponíveis no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Gene	Nº de acesso (NCBI)	Sequencia (5' $ ightarrow$ 3')	Tamanho do produto (pb)	
<i>rrs</i> (16S)	AF059846	S: CGAGTGGCGAACGGGTGAGT AS: GGCCCATCCCACACCGCAAA	140	
hspX	887579	S: GCGGTCCCTCTTCCCCGAGT AS: CTCCGCGCGTACCTCGTAGC	136	
<i>sig</i> F	4537166	S: GGTTCGCCGAGCTACGTCCG AS: TCACCGCGTTCACCAAGCCC	148	
fbpA	13427561	S: CAAGGACGGCGGCTGCAAGA AS: ACCGGCCATCGACAGACCGA	127	
whmD	AF164439	S: CCGGAGGCCGAGGAAGACCA AS: TCCAGGCACGCGTCACGAAC	143	
kasA	13430743	S: CCGACGCTGAACTACGAGAC AS: TTGTATTCGCCGTACCGAGG	80	
<i>kas</i> B	13428985	S: TCAACGTGAAGAACCCCCGAC AS: AGGCCGAACGAATTGCTCA	100	
ftsZ	4534205	S: TCAAGGTGGTTGGTATCGGC AS: ATGAACTCGACGCCCTTCAG	82	
dnaA	4531721	S: TATGCGCAACGTCTCTTCCC AS: CACGCAGCGAGTTGATGAAG	85	
<i>dna</i> G	4535737	S: ATCGAGCACGTCAGTTTCGT AS: GACGAACCCGTGTAGGTGAC	80	
embA	13427550	S: TCAACGGCTGGTTCTACGTC AS: ATCGTGGTGACCGGGTAATG	85	
embB	13427551	S: GTACCCGACGTACTCCAACG AS: CGAATCCGGTTCCACCAGAA	91	
embC	13427549	S: GACGACGGCTACATCCTGAC AS: GTACCGAACCAGCGGTAGTAG	80	
pimB	13428250	S: CTCGGCGATGGAAAACCTTG AS: CACGAAACCGGTGATGTCCA	82	
pbpA	13426556	S: TCGCGGCTACACTAACTGAC AS: ACCGGTTTTCGAAGCGATCT	95	
murB	4531160	S: AAGAGCTGCGCTTCGGATAC AS: GGCGTCCAGACCGAACTC	86	
murC	4537247	S: GATTCGAGGGTGTGCGTAGG AS: GTGGGATGGTGCGCATAGT	85	
murE	4532765	S: AGATCGTCGAGATCGGTGAC AS: CTCTCATGGCCTTTACCCGC	100	
murF	13430647	S: CTCTCGATTACTCGTCGTGGG AS: GACCATGGTGGACTCCGAAC	97	
murG	4536010	S: GAAGAACACCCTCGACCTGC AS: CGGCATACGCCAGATCCAT	92	

Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação pela PCRem tempo real.

Legenda: S – iniciador senso; AS – iniciador anti-senso.

A quantidade de cDNA utilizada nas reações 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; 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 de cada reação foi considerada adequada para valores entre 90 e 110%. Os resultados das curvas de eficiências estão descritos na tabela 4.

Gene	Inclinação da curva (slope)	Eficiência %
<i>rrs</i> (16S)	- 3,28	101
hspX	-3,26	102
sigF	-3,3	100
fbpA	-3,2	102
whmD	-3,12	109
kasA	-3,15	107
<i>kas</i> B	-3,33	99
ftsZ	-3,57	91
dnaA	-3,21	105
<i>dna</i> G	-3,11	109
embA	-3,13	108
embB	-3,25	103
embC	-3,18	106
pimB	-3,41	96
pbpA	-3,28	101
murB	-3,12	109
murC	-3,28	102
murE	-3,41	96
<i>mur</i> F	-3,23	104
<i>mur</i> G	-3,34	99

Tabela 4: Valores de inclinação da curva de eficiência das PCR em tempo real.

A PCR em Tempo Real ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 10 min a 95°C (ativação da AmpliTaq Gold® DNA Polymerase); 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão). Os dados foram analisados utilizando o programa 7500 Software v 2.0.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de Ct (ciclo em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limite de detecção (*Threshold*) do equipamento). Assim, as análises de expressão do RNAm dos genes *whm*D, *sig*F e *fbpA* foram realizadas com base na fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ amostras - ΔCt do controle (utilizado como calibrador). E $\Delta Ct = Ct$ do gene alvo – Ct do gene endógeno.

3.12. Infecção de macrófagos

3.12.1 Cultivo das células THP-1

Para o nosso estudo foi utilizada a linhagem de monócitos humano THP-1 (ATCC TIB-202TM). As células THP-1, inicialmente estocadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas em garrafas (Cornning Life Sciences, MA, EUA) contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (10mM), piruvato de sódio (10mM), e os antibióticos gentamicina (50µg/mL) e ampicilina (100U/mL). As culturas foram mantidas em estufa (Sanyo, Osaka, Japão) a 37ºC em uma atmosfera contendo 5% de CO₂. A adição de meio foi realizado a cada 2-3 dias, dependendo da densidade celular, a fim de manter a concentração de 4-5x10⁵ células viáveis/mL, de acordo com protocolo de cultivo da ATCC.

3.12.2. Diferenciação das células THP-1 em macrófagos

Após duas semanas de cultivo, foi realizada a contagem de células

viáveis em câmera de *Neubauer* utilizando o reagente Azul de *Trypan* 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

A diferenciação celular foi realizada utilizando acetato miristato de forbol (PMA, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Para isso, a cultura foi centrifugada a 125 x g durante 5 minutos em temperatura ambiente, e o *pellet* ressuspendido em volume suficiente para obter uma concentração 10⁶ células/mL. Em seguida, em placas de seis poços foi adicionado 1mL dessa suspensão celular e 2mL de meio *RPMI* contendo acetato miristato de forbol (PMA) na concentração de 20ng/mI. A cultura foi mantida em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após este período, o sobrenadante contendo o PMA foi removido e 2mL de meio novo foi adicionado e as placas novamente incubadas a 37°C com 5% CO₂ (Sanyo, Osaka, Japão) por mais cinco dias antes da infecção (DAIGNEAULT et al., 2010).

3.12.3. Cultivo do Mycobacterium smegmatis

Cepas de *M. smegmatis* mc²155, expressando e não expressando a proteína HspX (MS::HspX e MS, respectivamente) foram utilizadas para infectar os macrófagos descritos no item 3.12.2. A expressão da proteína HspX foi induzida como descrito no item 3.6.3, 24 horas antes da infecção dos macrófagos. Para manter a indução da proteína, 48horas antes e no dia da infecção foi adicionado ao meio RPMI o indutor químico acetamida 0,2% (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

3.12.4. Infecção dos macrófagos com Mycobacterium smegmatis

Para o experimento de infecção, os macrófagos previamente ativados com PMA (item 3.12.1) foram infectados separadamente com as cepas MS::HspX e MS, na proporção de 10 bactérias para cada macrófago (MOI 10:1). Em seguida, os macrófagos foram incubados em estufa a 37°C e com 5% de CO₂ (Sanyo, Osaka, Japão). Após 3 horas de infecção, as células foram lavadas 3X com meio RPMI para remoção dos bacilos não fagocitados, e as culturas novamente incubadas por 48 horas a 37°C com 5% CO₂. Nos tempos 0, 3, 6, 24 e 48hs, os macrófagos foram lisados para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) e para a extração de RNA. Além disso, o sobrenadante das culturas foi removido e estocado para a dosagem de citocinas, descritos em detalhes nos próximos itens. Foram realizados três experimentos independentes (triplicata biológica).

3.12.5. Contagem de UFC

Em cada tempo previamente determinado, os macrófagos foram lisados com 1mL de Triton X-100 a 1%. Em seguida, foi feita uma diluição decimal (até 10⁻⁸) em PBS 1X e alíquotas foram plaqueadas em quintuplicata em ágar Mueller-Hinton. As unidades formadoras de colônias foram determinadas após incubação das placas a 37 °C por 72 horas.

3.12.6. Extração do RNA

O RNA dos macrófagos foi extraído utilizando o *Rneasy* Plus *Mini Kit* (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany). Para isso, os macrófagos foram lisados e

ressuspendidos com o tampão de lise *RLT plus* (fornecido no kit) que contém isotiocianato de guanidina adicionado de β-mercaptoetanol. Todo o lisado foi transferido para um tubo de microcentrifuga (1,5mL) e as demais etapas da extração foram conduzidas conforme recomendações do fabricante do kit. A quantificação e a análise da integridade do RNA extraído foram realizadas utilizando o equipamento Nanodrop (ND-1000, NanoDrop Technologies, EUA) e a plataforma Bioanalyzer 2100 (RNA 6000 Nano Chip) (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA), respectivamente. O RNA extraído foi mantido em freezer -80°C até o momento do uso.

3.12.6.1 Transcrição reversa e PCR em tempo Real (RT-qPCR)

A síntese do cDNA foi realizada utilizando o RT² First Strand Kit (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany), cujo procedimento compreende 2 etapas: a eliminação da contaminação com DNA genômico e a transcrição reversa. Inicialmente, o RNA extraído foi submetido ao tratamento com o tampão GE2 (fornecido no kit) seguido de uma incubação a 37ºC por 5 minutos para eliminar qualquer contaminação residual de DNA genômico. Em seguida, a fita de DNA complementar foi sintetizada a partir de 1µg de RNA tratado com o tampão GE2, utilizando o BC4 Reverse Transcriptase Mix, que inclui além de iniciadores randômicos (hexâmeros e oligo-dT), a enzima transcriptase reversa MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Após a etapa de incubação em termociclador (42ºC por 15min - ação enzimática e 95ºC por 5min- inativação da enzima), foram adicionados 91µL de água livre de nucleases ao cDNA, e este foi armazenado a -20ºC até o momento do uso.

A quantificação relativa da expressão do RNAm dos genes estudados foi realizada pela PCR em Tempo Real utilizando o kit RT² Profiler PCR Array e RT²SYBR Green Mastermix (Qiagen, Strasse, Hilden, Germany). Para isso, foi utilizado o sistema automatizado 7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A PCR ocorreu nas seguintes condições: um ciclo de 10 min a 95°C (ativação da *Hot Start DNA Taq* Polymerase); 40 ciclos de 15 s a 95°C (desnaturação) e 1 min a 60°C (hibridização e extensão).

Para cada amostra foram analisados 22 genes, incluindo 5 controles endógenos (*Glyceraldehide-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH; *Ubiquitin*, UBC; *Homo sapiens succinate dehydrogenase complex*, SDHA; *Beta-2microglobulina*, B2M e *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, HPRT-1), um controle de DNA genômico (HGDC), um controle da transcriptase reversa (RTC), e um controle positivo da PCR (PPC). Os 14 genes analisados foram selecionados com base nas vias disponíveis no site http://www.sabiosciences.com/ArrayList.php.

Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de CT (Livak e Schmittgen, 2001), com algumas modificações. Para expressão dos genes alvos a fórmula utilizada foi basicamente $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ amostras infectadas - ΔCT médio da amostra controle ou calibrador (macrófago não infectado). Os dados foram inicialmente analisados utilizando o programa 7500 Software v 2.0.5 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Antes de calcular o valor de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os valores de Ct foram ajustados de acordo com as regras abaixo:

- a. Todos os valores de Ct maiores que 35 ou não detectados (N/A) deveriam ser considerados como negativo (NÃO EXPRESSO).
- b. Valores de CT do controle de contaminação com DNA genômico (HGDC) deveriam ser ≥ 35. Neste caso, o nível de contaminação genômica é muito baixo para afetar o resultado de expressão gênica.
- c. Valores de CT do controle da transcrição reversa (RTC). Em cada placa, a média CT^{RTC} média CT^{PPC} deveria ser menor que 5, indicando que não houve nenhuma inibição da transcrição reversa.
- d. Valores de CT do controle positivo da PCR (PPC). Em cada placa, a média de CT^{PPC} deveria ser 20 ± 2 e não deveria variar mais do que 2 ciclos entre as placas analisadas.
- e. Cálculo do ΔCT para cada gene alvo (GA) deveria ser normalizado com a média dos genes endógenos (MÉD END), utilizando a fórmula ΔCT = CT ^{GA} CT ^{MÉD END}.

Em seguida, foi calculado o ΔΔCT utilizando os valores do macrófago não infectado como controle (calibrador) da reação.

3.12.7. Dosagem de citocinas

Para a dosagem de citocinas, o sobrenadante da cultura de macrófagos foi recuperado e filtrado (0.22µm). Em seguida, foi adicionado o inibidor de protease PMSF (1mM) e o sobrenandante estocado a -20°C até o momento do uso. As concentrações das citocinas foram determinadas através da tecnologia multiplex, utilizando o kit Fluorokine® MAP multiplex (R&D Systems) e o sistema de detecção Luminex®100[™] (Luminex Corporation).

3.13. Análise estatítica

Para a análise e construção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism®, versão 5.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). Para comparar a expressão dos genes bacterianos (nos diferentes tempos, após a indução da proteína HspX) e dos genes de macrófagos (nos diferentes tempos após a infecção) utilizou-se a análise de variância (Two way ANOVA) seguida de teste de comparação múltipla de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de p < 0,05.

#RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Amplificação do gene hspX

A figura 10 mostra o fragmento de 435pb obtidos por amplificação do gene *hspX* a partir do DNA genômico do *M. tuberculsosis* H37Rv.



Figura 10 - Análise do produto da PCR do gene *hsp*X pela eletroforese em gel de agarose 1% (corado com Gel Red[™]). **M**: Marcador de peso molecular de 1Kb; **Posição 1 e 2**: produto da PCR do gene *hsp*X.

4.2. Clonagem do gene *hsp*X no vetor pGEM-T[®] easy vector

As colônias que foram recuperadas do meio contendo o antibiótico ampicilina foram triadas para a análise dos plasmídeos recombinantes.

A figura 11 mostra que os clones que continham o gene *hsp*X apresentavam dois fragmentos (278pb e 157pb), além do fragmento correspondente ao plasmídeo linear (3Kb), resultantes da digestão com a enzima EcoRI. Isso ocorreu porque dentro da sequência do gene *hsp*X existe um sítio de reconhecimento da enzima EcoRI (Figura 12).



Figura 11 - Análise dos plasmídeos recombinantes pGEMT::hspX por restrição enzimática com *EcoRI*. Eletroforese em gel de agarose 1% (corado com Gel RedTM). **M**: Marcador de peso molecular de 1Kb; **1 e 3**: plasmideo sem inserto não digerido; **2 e 4**: plasmídeo sem inserto digerido; **5 e 6**: plasmideo contendo o gene *hsp*X, não digerido e digerido respectivamente; **7 e 8**: plasmideo contendo o controle positivo de ligação fornecido pelo kit (~600pb), não digerido e digerido respectivamente.



Figura 12 - Desenho esquemático do gene *hspX* (cinza) mostrando o sitio de clivagem pela enzima EcoRI, e os respectivos fragmentos gerados (azul).
Após a restrição enzimática, os plasmídeos que liberavam um fragmento de tamanho correspondente ao do produto amplificado foram selecionados e submetidos à reação de sequenciamento. Os clones contendo a sequência correta do gene *hsp*X passaram a ser denominados de pGEMT::*hspX* (Figura 13).

	$\dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots \dots $
pGEMT:hspX	CATATGGTCG ACCTGCAGGC GGCCGCGAAT TCACTAGTGA TTCATCTGCA
hspX	
	460 470 480 490 500
pGEMT:hspX	GATGGCCACC ACCCTTCCCG TTCAGCGCCA CCCGCGGTCC CTCTTCCCCG
hspX	-ATGGCCACC ACCCTTCCCG TTCAGCGCCA CCCGCGGTCC CTCTTCCCCG
	510 520 530 540 550
pGEMT:hspX	AGTTTTCTGA GCTGTTCGCG GCCTTCCCGT CATTCGCCGG ACTCCGGCCC
hspX	AGTTTTCTGA GCTGTTCGCG GCCTTCCCGT CATTCGCCGG ACTCCGGCCC
	560 570 580 590 600
pGEMT:hspX	ACCTTCGACA CCCGGTTGAT GCGGCTGGAA GACGAGATGA AAGAGGGGGCG
hspX	ACCTTCGACA CCCGGTTGAT GCGGCTGGAA GACGAGATGA AAGAGGGGCG
DGEMT·benY	
hspX	CTACGAGGTA CGCGCGGAGC TTCCCCGGGGT CGACCCCGAC AAGGACGTCG
- 1	
	660 670 680 690 700
pGEMT:hspX	ACATTATGGT CCGCGATGGT CAGCTGACCA TCAAGGCCGA GCGCACCGAG
hspX	ACATTATGGT CCGCGATGGT CAGCTGACCA TCAAGGCCGA GCGCACCGAG
	$\begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$
pGEMT:hspX	CAGAAGGACT TCGACGGTCG CTCGGAATTC GCGTACGGTT CCTTCGTTCG
hspX	CAGAAGGACT TCGACGGTCG CTCGGAATTC GCGTACGGTT CCTTCGTTCG
	····· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ·····
	760 770 780 790 800
pGEMT:nspx	CACGGTGTCG CTGCCGGTAG GTGCTGACGA GGACGACATT AAGGCCACCT
nopn	
	810 820 830 840 850
pGEMT:hspX	ACGACAAGGG CATTCTTACT GTGTCGGTGG CGGTTTCGGA AGGGAAGCCA
hspX	ACGACAAGGG CATTCTTACT GTGTCGGTGG CGGTTTCGGA AGGGAAGCCA
pGEMT:hspX	ACCGAAAAGC ACATTCAGAT CCGGTCCACC AACTGAGCAT GCAGGAATCG
hspX	ACCGAAAAGC ACATTCAGAT CCGGTCCACC AACTGA

Figura 13 - Alinhamento das seqüencias de um dos clones pGEMT::*hspX* com a sequência do gene *hsp*X disponível no banco de dados (NCBI), utilizando o sofware *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

4.3. Subclonagem do gene hspX no vetor de expressão pFPCA1GFP

A figura 14 mostra a eletroforese dos produtos da PCR obtidos nas condições de amplificação descrita no item 3.5, onde foi possível obter o fragmento desejado (454pb) com ausência de amplicons inespecíficos.



Figura 14 - Análise do produto da PCR do gene *hsp*X por eletroforese em gel de agarose 1% (corado com Gel Red[™]). **M**: Marcador de peso molecular de 1Kb; **Posição 1 e 2**: produto da PCR do gene *hsp*X.

A figura 15 mostra a separação pela eletroforese dos produtos da digestão do vetor de expressão para remoção do *gfp*, onde podemos verificar dois fragmentos, um de aproximadamente 6,4Kb correspondente ao vetor sem *gfp* e outro de 751pb referente ao gene *gfp*.



Figura 15 - Análise do produto da digestão do plasmídeo pFPCA1*GFP* com a enzima *Bam*HI e *Cla*I. Eletroforese em gel de agarose "Low melting" 1% (corado com Gel RedTM). **M**: Marcador de peso molecular de 1Kb; **Posição 1**: plasmídeo pFPCA1*GFP* pós restrição enzimática.

Os clones recombinantes pFPCA1::hspX foram triados por digestão com as mesmas enzimas de restrição utilizadas para remover o gene *gfp* do vetor de expressão (*Bam*HI e *Cla*I). Os produtos da digestão foram separados pela eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 16).



Figura 16 – Fotografia do gel de eletroforese em agarose 1% (corado com Gel Red[™]) pós digestão dos recombinantes pFPCA1::hspX pela restrição com as enzimas *Bam*HI e *Cla*I. **M**: Marcador de peso molecular de 1Kb; **Posição 1**: plasmideo contendo o gene *hsp*X; **Posição 2:** plasmídeo sem inserto.

Aqueles clones que exibiram dois fragmentos (um de aproximadamente 6423pb, correspondente ao vetor e outro de aproximadamente 445pb correspondente ao gene *hspX*) foram enviados para o sequenciamento (figura 17).

560 570 580 590 600 pFPCA:hspX ACACCGCTGA ACTTCTTMGT CGGCGGAGGA TCCATGGCCA CCACCCTTCC hspX -----ATGGCCA CCACCCTTCC 610 620 630 640 650 pFPCA:hspX CGTTCAGCGC CACCCGCGGT CCCTCTTCCC CGAGTTTTCT GAGCTGTTCG hspX CGTTCAGCGC CACCCGCGGT CCCTCTTCCC CGAGTTTTCT GAGCTGTTCG 660 670 680 690 700 pFPCA:hspX CGGCCTTCCC GTCATTCGCC GGACTCCGGC CCACCTTCGA CACCCGGTTG CGGCCTTCCC GTCATTCGCC GGACTCCGGC CCACCTTCGA CACCCGGTTG hspX 710 720 730 740 750 ATGCGGCTGG AAGACGAGAT GAAAGAGGGG CGCTACGAGG TACGCGCGGA pFPCA:hspX ATGCGGCTGG AAGACGAGAT GAAAGAGGGG CGCTACGAGG TACGCGCGGA hspX 760 770 780 790 800 GCTTCCCGGG GTCGACCCCG ACAAGGACGT CGACATTATG GTCCGCGATG pFPCA:hspX hspX GCTTCCCGGG GTCGACCCCG ACAAGGACGT CGACATTATG GTCCGCGATG ····|····| ····| ····| ····| ····| ····| 810 820 830 840 850 pFPCA:hspX GTCAGCTGAC CATCAAGGCC GAGCGCACCG AGCAGAAGGA CTTCGACGGT hspX GTCAGCTGAC CATCAAGGCC GAGCGCACCG AGCAGAAGGA CTTCGACGGT ····· 860 870 880 890 900 CGCTCGGAAT TCGCGTACGG TTCCTTCGTT CGCACGGTGT CGCTGCCGGT pFPCA:hspX hspX CGCTCGGAAT TCGCGTACGG TTCCTTCGTT CGCACGGTGT CGCTGCCGGT ····· 910 920 930 940 950 pFPCA:hspX AGGTGCTGAC GAGGACGACA TTAAGGCCAC CTACGACAAG GGCATTCTTA hspX AGGTGCTGAC GAGGACGACA TTAAGGCCAC CTACGACAAG GGCATTCTTA ····· 960 970 980 990 1000 CTGTGTCGGT GGCGGTTTCG GAAGGGAAGC CAACCGAAAA GCACATTCAG pFPCA:hspX CTGTGTCGGT GGCGGTTTCG GAAGGGAAGC CAACCGAAAA GCACATTCAG hspX 1010 1020 1030 1040 1050 ATCCGGTCCA CCAACTGAAT CGATGTCGAC GTAGTTWAYT AGCGTACGAT pFPCA:hspX hspX ATCCGGTCCA CCAACTGA-- ------ ------- -------

Figura 17 - Alinhamento das seqüencias de um dos clones pFPCA1::hspX com a sequência do gene *hsp*X disponível no banco de dados (NCBI), utilizando o sofware *BioEdit Sequence Alignment Editor*.

4.4. Expressão da proteína HspX

Os clones recombinantes confirmados por sequenciamento foram utilizados para transformar células de *M. smegmatis* mc²155. As colônias crescidas no meio contendo canamicina foram selecionadas e observadas no microscópio de fluorescência para visualizar a expressão da proteína GFP nas culturas bacterianas sob luz UV (figura 18). As colônias resistentes à canamicina e que não fluoresciam quando visualizadas sob luz UV, foram utilizadas para a indução da proteína HspX.



Figura 18 - Microfotografia de culturas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o plasmídeo pFPCA1*GFP* e pFPCA1::hspX visualizadas no microscópio de fluorescência sob luz UV. Aumento de 1000x.

A indução da expressão da proteína HspX foi realizada com a adição de acetamida (0,2%) no meio, quando a densidade ótica a 600nm (DO600) da cultura era de aproximadamente 0,5 (figura 19).



Figura 19 - Curva de crescimento celular, determinado pelo valor de Densidade Ótica em 600nm (DO₆₀₀), de *M. smegmatis* mc²155 contendo o plasmídeo recombinante pFPCA1::hspX em Meio Middlebrook 7H9 com antibiótico canamicina 30µg/mL.

Após 24hs de indução, observou-se que nas amostras induzidas houve um retardo no crescimento em relação à amostra não induzida. Nesse momento, foram retiradas alíquotas para a análise macro e microscópica das bactérias, e para a extração de proteínas para a análise de expressão. Utilizando o vetor pFPCA1*GFP*, a proteína é expressa fusionada com um fragmento de 4kDa (mais detalhes na discussão dos resultados). Logo, o peso molecular esperado era de 20kDa (16kDa da proteína + 4kDa do fragmento). Na figura 20, é possível visualizar um fragmento de 20kDa mais intenso nas amostras induzidas contendo o vetor pFPCA1::hspX. Porém a expressão só pôde ser corfirmada por *Western blotting* (figura 21).



Figura 20 - Fotografia do gel de eletroforese em SDS-PAGE para a análise da expressão da proteína HspX em gel SDS-PAGE 4-20% corado com Coomassie blue. **M**: marcador de peso molecular com valores em kDa; *M. smegmatis* = bactéria sem plasmídeo; **pFPCA1***GFP* = *M. smegmatis* transformadas com o vetor não recombinante pFPCA1*GFP*; **pFPCA:***hsp*X(4), (6) e (9) = *M. smegmatis* transformadas com os clones recombinantes pFPCA1::hspX, identificadas com os números 4, 6 e 9. **NI**: não induzido; **I**: induzido.



Figura 21 - Fotografia do filme de revelação do *Western blot,* confirmando a expressão da proteína HspX utilizando o anticorpo Anti-HspX e revelação com o sistema HRP/ECL, utilizando um substrato quimioluminescente. **M**: marcador de massa molecular com valores em kDa; *M. smegmatis* = bactéria sem plasmídeo; **pFPCA1***GFP* = *M. smegmatis* transformadas com o vetor não recombinante pFPCA1*GFP*; **pFPCA:***hsp*X(4), (6) e (9) = *M. smegmatis* transformadas com os clones recombinantes pFPCA1::hspX, identificadas com os números 4, 6 e 9. **NI**: não induzido; **I**: induzido.

4.5. Análise macro e microscópica das bactérias

As amostras induzidas e não induzidas foram analisadas quanto à morfologia e tamanho, das colônias crescidas em meio 7H10 e das células bacterianas coradas pela técnica de *Ziehl Neelsen*. Das amostras induzidas, as células bacterianas contendo pFPCA1::hspX, quando visualizadas no microscópio apresentaram uma tendência à filamentação comparada à bactéria sem vetor e à bactéria contendo o vetor não recombinante (Figura 22). Enquanto que no exame macroscópico, as colônias se mostraram menores em relação às demais bactérias (Figura 23).



Figura 22 - Microfotografia de culturas de *M. smegmatis,* após 24hs de indução com acetamida, coradas pela técnica de *Ziehl Neelsen*. Aumento de 1000x. .
MS: *M. smegmatis* mc²155 sem plasmídeo; V: *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o vetor não recombinante pFPCA1*GFP*; H: *M. smegmatis* mc²155 transformadas com clone recombinante pFPCA1::hspX.



Figura 23 - Cultura de *M. smegmatis* em Meio Middlebrook 7H10 sem antibiótico (MS+) e com canamicina 30μg/mL (V+ e H+). Após 24hs de indução do promotor da acetamidase. MS: *M. smegmatis* mc²155 sem plasmídeo; V: *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o vetor não recombinante pFPCA1*GFP*;
H: *M. smegmatis* mc²155 transformadas com clone recombinante pFPCA1::hspX.

4.6. Resultados de expressão gênica pela RT-PCRq

A figura 24 a 29 mostram os valores de expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) do gene analisados em M. smegmatis mc²155 transformadas com o vetor recombinante pFPCA1::hspX, em relação a bactéria transformada com o vetor não recombinante nos diferentes tempos de indução do promotor.

4.6.1 Genes de replicação do DNA e divisão celular

Devido as amostras induzidas expressando a proteína HspX evidenciarem uma tendência a filamentação das células e um retardo no crescimento em relação às amostras não induzidas, foi avaliado se a expressão dessa proteína altera os valores de expressão relativa de alguns genes envolvidos com o processo de replicação do DNA (*dna*A e *dna*G) e de divisão celular (*fts*Z e *whm*D).



Figura 24 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes *dnaA*, *dnaG*, *ftsZ e whmD* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (*= p<0,05; **= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

A figura 24 mostra que nas amostras expressando a proteína HspX foi observada uma redução estatisticamente significante na expressão dos quatro genes analisados, principalmente após 24hs de indução do promotor. Com relação ao gene *fts*Z, essa redução já foi observada após 3hs de indução. Nesse mesmo tempo, a expressão dos genes *dna*A, *dna*G e *whm*D aumentou aproximadamente 2x nas bactérias expressando a proteína HspX.

4.6.2. Genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular

As figuras 25 a 29 apresentam os valores de expressão relativa de genes envolvidos com o processo de síntese de componentes da parede celular das micobactérias, como ácidos micólicos, peptidoglicano, Lipoarabinomanana (LAM), Arabinogalactana (AG), mono e dimicolato de trealose (TMM e TDM, respectivamente).

Síntese de ácido micólicos



Figura 25 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes *kasA e kasB* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (*** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

Nas amostras expressando a proteína HspX foi observada um aumento estatisticamente significante na expressão do gene *kas*A nos tempo 24hs e uma redução no tempo 48hs pós indução do promotor. Com relação ao gene *kas*B, houve um aumento na sua expressão apenas em 3hs de indução (figura 25).

Síntese de peptidoglicano

Os dados de expressão dos genes envolvidos na síntese do peptidoglicano são apresentados nas figuras 26 e 27. Os genes *mur*B, *mur*C, *mur*E, *mur*F e murG nas bactérias expressando a proteína HspX apresentaram aumento de expressão apenas em 3hs pós indução, exceto *mur*G, no qual a expressão permanece elevada até 6hs pós indução (figura 27). Com relação ao gene *pbp*A, houve um aumento na sua expressão em 3hs de indução e uma redução em 24 e 48hs pós indução do promotor (figura 26).



Figura 26 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ do gene *pbpA* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (*** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.



Tempo pós indução (horas)

Figura 27 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes *murB murC, murE, murF e murG* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (*= p<0,05; **= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

Outros genes

A expressão de outros genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular como *LAM, AG, TMM e TDM* também foram analisados e os dados são apresentados nas figuras 28 e 29.



Figura 28 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes *embA*, *embB e embC* em *M*. *smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (**= p<0,1). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

A expressão dos genes *emb*B e *emb*C nas bactérias expressando a proteína HspX apresentaram uma redução nos tempos 0hs e 48hs pós indução. Sendo que no gene *emb*C essa expressão aumentou no tempo 24hs.

Não houve diferença estatisticamente significante na expressão de *emb*A (Figura 30). Uma redução estatisticamente significante na expressão do gene *sigF* foi observada apenas 48hs pós indução do promotor. Em 3hs de indução, verifica-se um aumento na expressão dos genes *pim*B e *fbp*A, e neste ultimo também é visível uma redução nos tempos 24 e 48hs pós indução (Figura 29).



Figura 29 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) dos genes *pimB, sigF* e *fbpA* em *M. smegmatis* mc²155 transformadas com o clone recombinante pFPCA1::hspX, após indução do promotor da acetamidase (*= p<0,05; **= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.7. Sobrevivência in vivo

As bactérias *M. smegmatis* mc²155, expressando e não expressando a proteína HspX (MS::HspX e MS, respectivamente), foram utilizadas para infectar macrófagos em um MOI 10:1. Desta forma, a carga bacteriana inicial utilizada na infecção foi de 1×10⁷ Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Nos tempos 3, 6, 24 e 48hs, os macrófagos foram lisados e foi realizada a contagem de UFC, cujos valores são apresentados na figura 30. Embora, a diferença na contagem de CFU não tenha apresentado significância estatística, verifica-se que nas primeiras horas de infecção a contagem de MS foi superior à contagem de MS::HspX, situação que se inverte a partir de 24horas de infecção.



Figura 30 - Curva de crescimento intracelular *do M. smegmatis* mc²155, contendo e não contendo o plasmídeo recombinante pFPCA1::hspX, dentro de macrófagos, determinado pelo número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.8. Expressão gênica em macrófagos

4.8.1. Citocinas

Foram analisadas a expressão dos genes IL1B, IL8, IL10 e TNF que codificam para citocinas pró e antiinflamatórias expressas em macrófagos na resposta inata à infecção. Os dados de expressão estão apresentados na figura 31. Os genes que codificam para a interleucina 1- beta e interleucina 8 tiveram sua expressão, aproximadamente, 2x mais elevada em 48hs pós infecção com a bactéria MS::HspX quando comparada ao macrófago não infectado (controle) e ao macrófago infectado com MS.



Figura 31 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes IL1B, IL8, IL10 e TNF em macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X (*= p<0,05; **= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.8.2. Genes anti e pró- apoptóticos

Foi avaliado também se a expressão da proteína HspX alterava a expressão de genes que codificam para proteínas anti (MCL1, BCL2, BCL2L1) e pró-apoptóticas (CASP3 e BAX) expressas em macrófagos. Apenas o gene BCL2 foi diferentemente expresso (3hs pós-infecção), entre macrófagos infectados com a bactéria MS e os macrófagos infectados com MS::HspX, sendo os níveis de expressão deste último, semelhante aos níveis de expressão em macrófagos não infectados (figura 32).



Figura 32 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa (2^{-ΔΔCt}) dos genes MCL-1, BCL2L1, BCL2, BAX, CASP3 em macrófagos infectados

com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X (*= p<0,05; **= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.8.3. Receptores Toll like

Os genes que codificam para os receptores Toll like 1, 2 e 6 foram analisados, porém, não houve diferença estatisticamente significante na expressão desses genes entre os grupos analisados (figura 33).



Figura 33 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes TLR1, TLR2 e TLR6 em macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X. Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.8.3. Outros genes

Outros genes estudados foram NOS2 e IRGM. Não houve diferença estatisticamente significante na expressão do gene NOS2. A partir de 24hs de infecção, o gene IRGM foi diferentemente expresso (aproximadamente 3x mais elevado) nos macrófagos infectados com a bactéria MS do que nos macrófagos infectados com MS::HspX, sendo os níveis de expressão deste último, semelhante aos níveis de expressão em macrófagos não infectados (Figura 34).



Figura 34 - Representação gráfica dos valores da expressão relativa $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ dos genes NOS2 e IRGM em macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X (*= p<0,05; **= p<0,1). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

4.9. Dosagem de citocinas por multiplex

Os resultados da concentração de IL1b e IL8 no sobrenadante das culturas dos macrófagos estão apresentados nas figuras 35 e 36. Observa-se que os níveis de IL1b são similares entre os grupos até 6hs de infecção. Com 48hs de infecção, observa-se que o grupo expressando a proteína HspX, apresentou maiores níveis de IL1b que o grupo controle e o grupo infectado com MS (Figura 35). A concentração de IL8 não apresentou diferenças entre os grupos ao longo do experimento, apenas em relação ao macrófago não infectado e em 48hs de infecção (Figura 36).



Figura 35 - Representação gráfica dos valores da concentração da citocina IL1b no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com *M. smegmatis* mc²155 transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X (**= p<0,1; *** = p<0,001). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.



Figura 36 - Representação gráfica dos valores da concentração da citocina IL8 no sobrenadante de culturas de macrófagos infectados com *M. smegmatis* $mc^{2}155$ transformados e não transformados com o vetor recombinante pFPCA1::*hsp*X (*= p<0,05). Os resultados expressos representam a média ± erro padrão.

#DISCUSSÃO

5. Discussão

A proteína HspX do *M. tuberculosis* é um elemento fortemente associado com a TB latente por ser uma das proteínas mais abundantes nesse estágio. Dentro do macrófago e /ou granuloma, a depleção de oxigênio é diretamente proporcional ao aumento na expressão do gene *hsp*X (DESJARDIN et al, 2001; BACON et al, 2004; RABAHI et al, 2007; FONTÁN et al, 2008). Baseado na sua forte indução bem como sua localização celular, e nas mudanças estruturais e metabólicas que acompanham a bactéria nessa fase, o presente estudo propôs verificar se a expressão da proteína HspX estaria envolvida com a alteração na expressão de genes relacionados com a síntese de componentes da parede celular e no processo de replicação do DNA e de divisão celular.

Para isso, inicialmente o gene *hspX* (Rv2031c) foi amplificado pela PCR a partir do DNA da cepa padrão *M. tuberculosis* H37Rv e clonado no vetor de expressão pFPCA1*GFP* (CHANGSEN, FRANZBLAU; PALITTAPONGARNPIM, 2003), para a posterior expressão na cepa *M. smegmatis* mc²155. Por ser uma micobactéria não patogênica, cultivável na maioria dos meios sintéticos, de crescimento rápido e por apresentar características estruturais comuns a todas as micobactérias, a espécie *M.smegmatis* tem se tornado o organismo modelo utilizado para estudos de análise genética de patógenos virulentos como o *M. tuberculosis* (ETIENNE et al, 2005).

Os resultados do presente estudo, mostram que a expressão da proteína HspX em *M. smegmatis* resultou em uma proteína de aproximadamente 20kDa. Isso ocorreu porque, no vetor de expressão pFPCA1Δ*gfp* o gene *hsp*X foi clonado sob controle do promotor do gene da enzima acetamidase. No genoma da micobactéria, essa sequência promotora é antecedida por um operon constituído por quatro genes que codificam para moléculas reguladoras (indutoras e repressoras), cuja expressão é alterada na presença ou ausência do indutor acetamida (PARISH, TURNER; STOKER, 2001; ROBERTS, MUTTUCUMARU; PARISH, 2003). Na construção do vetor pFPCA1*GFP* foram utilizadas as sequências completas de 3 desses genes (*amiC, amiA* e *amiD*) mais um fragmento de 114pb do gene *ami*S que corresponde a um fragmento de 4kDa da quarta molécula do operon (LUCKNER, 2009). Dessa forma, a proteína HspX foi expressa fusionada a esse fragmento de 4kDa.

No ensaio de WB (figura 21), o anticorpo anti-HspX reagiu fortemente com uma proteína de 20kDa e fracamente com outra de 16kDa (peso molecular da proteína sem o fragmento). Como o anticorpo só reagiu com as amostras induzidas que continham o plasmídeo pFPCA1::*hspX*, acreditamos que a presença dos dois fragmentos não se trata de uma reação inespecífica do anticorpo, mas sugere que ocorreu, por algum motivo, a perda do fragmento de 4kDa da proteína HspX.

Um novo experimento de indução da proteína HspX foi realizado, visando a extração de RNA para a análise de expressão gênica pela PCR em tempo real de genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular, na replicação do DNA e na divisão celular.

99

5.1 Genes de replicação do DNA e de divisão celular

De acordo com dados da literatura, a depleção gradual de oxigênio induz culturas de *M. tuberculosis* a entrarem em um estado de dormência metabólica, no qual em geral, os microrganismos não exibem uma síntese de DNA detectável nem um processo de divisão celular sincronizada (HATFULL; JACOBS JR, 2000; VELAYATI et al, 2011). Trabalhos mostram que a proteína HspX exerce um papel ativo no retardo do crescimento do *M. tuberculosis* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (YUAN et al, 1996; HU et al, 2006). Porém, não há dados na literatura sobre quais estruturas e/ou componentes da bactéria são alvos dessa proteína.

No presente estudo, foram escolhidos os genes *dna*A, *dna*G, *whmD* e *fts*Z para a análise de expressão gênica.

O gene *dna*A codifica para a enzima DnaA responsável pela hidrólise de ATP necessária para a abertura da dupla fita de DNA no momento da replicação, e o gene *dna*G codifica para a enzima primase, uma RNA polimerase especial envolvida na síntese de um iniciador para a replicação do DNA. Em micobactérias, o nível dessas proteínas é crítico para a manutenção da cordenação entre replicação do DNA e divisão celular (KLANN et al, 1998; GRENDYKE et al, 2002).

Os resultados mostram que 24hs após a indução do promotor da acetamidase os níveis de expressão dos genes *dna*A e *dna*G reduziram drasticamente nas cepas transformadas com o vetor recombinante pFPCA::hspX em comparação com as bactéria contendo o vetor não recombinante, o que sugere que a proteína HspX pode estar envolvida, de forma direta ou indireta nas alterações de replicação do DNA detectadas em

bactérias dormentes (Figura 24). Além disso, essa diminuição pode explicar também o retardo no crescimento das bactérias induzidas, como observado na curva de crescimento da figura 19.

Por outro lado, é possível observar que 3 horas após a indução do promotor da acetamidase os níveis de expressão dos genes *dna*A e *dna*G quase duplicam nas cepas transformadas com o vetor recombinante pFPCA::hspX em comparação com as bactéria contendo o vetor não recombinante. Fato semelhante ocorreu com outros genes como *whm*D, *kas*B, *pbp*A, *mur*B-G, *pim*B e *fbp*A (detalhados posteriormente). Isso pode ter ocorrido em consequência da adição de acetamida no meio de cultura. Como as bactérias estavam sendo cultivadas em um meio mínimo (sem o complexo enriquecedor ADC), a taxa de multiplicação tende a diminuir. Ao adicionar acetamida, a bactéria a utiliza como fonte de carbono e as taxas de replicação e divisão celular se elevam (ROBERTS, MUTTUCUMARU; PARISH, 2003).

Considerando que ambas as culturas foram submetidas às mesmas condições de cultivo e que a única diferença entre os dois grupos analisados é a superexpressão da proteína HspX, acredita-se que a presença desta foi responsável de alguma forma por essa expressão diferencial entre as culturas expressando e não expressando a proteína HspX. O promotor da acetamidase é considerado um promotor fraco na ausência do indutor, porém, um nível basal de expressão ocorre (PARISH, TURNER; STOKER, 2001; ROBERTS, MUTTUCUMARU; PARISH, 2003). Desta forma, nas bactérias contendo o vetor recombinante ocorre uma produção de HspX mesmo na ausência do indutor químico acetamida. E a presença dessa proteína, mesmo em baixas quantidades, pode ter sido o suficiente para exercer alguma influência sobre esse aumento de expressão em 3hs de indução.

Em condições de privação de nutrientes, a expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos, cofatores e lipídeos, na replicação do DNA, em modificações traducionais e pós-traducionais e na virulência em geral estão diminuídos (BETTS et al, 2002). Por outro lado, alguns genes do *M. tuberculosis* são induzidos sob condições de privação oxigênio e nutrientes, como por exemplo, fatores de transcrição, reguladores de resposta e o gene *hsp*X (SHERMAN et al, 2001; PARK et al, 2003; SAINI et al, 2004).

Durante os estágios em que a bactéria não se multiplica ou se multiplica mais lentamente, ocorre um acúmulo de proteínas danificadas e o custo energético para repará-la é bastante elevado. Como a proteína HspX tem homologia com proteínas pertencentes a uma família de chaperonas, durante a privação de nutriente (cultivo em meio mínimo) ela pode ter protegido as estruturas celulares estabilizando proteínas necessárias no processo de replicação, transcrição e tradução (VERBON et al, 1992; YANG et al, 1999; VALDEZ et al, 2002).

Com a adição da acetamida, essas estruturas protegidas foram capazes de replicar o DNA e iniciar a transcrição de genes necessários para o crescimento da bactéria, mais rapidamente que o grupo sem o vetor recombinante. O que justificaria os níveis de expresão de *dna*A e *dna*G, bem como dos genes *whm*D, *kas*B, *pbp*A, *mur*B-G, *pim*B e *fbp*A, mais elevadas nesse grupo após 3 horas de indução (Figuras 24, 25, 26, 27 e 29).

O gene *whm*D codifica para uma proteína que exerce um papel importante na septação adequada e nos estágios iniciais de divisão celular do

102

M. smegmatis (GOMEZ; BISHAI, 2000). A proteína homóloga em *M. tuberculosis,* WhiB2, é uma proteína que regula a expressão de genes envolvidos na cascata de divisão celular e no remodelamento da parede celular. Sua expressão diminui consideravelmente após a fagocitose por macrófagos (GEIMAN, et al, 2006; RAGHUNAND; BISHAI, 2006; FONTÁN et al, 2008; HETT; RUBIN, 2008).

No presente estudo, as bactérias expressando HspX apresentaram uma redução significativa na expressão do gene *whmD* nos tempos 24 e 48hs (Figura 24). Os resultados também mostram que essas bactérias apresentaram uma tendência a filamentação das células e uma redução no tamanho das colônias quando semeadas em meio 7H10 (Figuras 22 e 23). Alterações fenotípicas semelhantes também foram observadas por Raghunand e Bishai (2006), que demonstraram que a deleção do gene *whmD* em *M. smegmatis* e do gene *whiB2* em *M. tuberculosis* resultou em bactérias filamentosas com colônias pequenas, e redução na viabilidade.

Outro gene envolvido com o processo de divisão celular é o *fstZ* (DATTA et al 2002; HETT; RUBIN, 2008). Depois da partição do cromossomo, a célula pode se dividir, formando um septo de divisão na região mediana que irá separar as duas células filhas. O início de formação do septo de divisão é a montagem de um anel na região mediana formado pela proteína FtsZ, que servirá de arcabouço, para o septo (MARQUES, 2012). Os resultados do presente estudo mostraram que a expressão de *fts*Z diminui após 3 horas de indução do promotor da acetamidase nas bactérias expressando HspX (Figura 24).

Roy e colaboradores (2011) mostraram que durante a hipóxia o nível de expressão de *fts*Z cai para 50% enquanto o nível de expressão de *hsp*X aumenta 2X. Alguns estudos mostram que a redução nos níveis de FtsZ interfere com a divisão celular e levam a filamentação (DZIADEK et al, 2003). Característica também observada no presente estudo, onde a expressão da proteína HspX foi acompanhada de uma redução na expressão de FtsZ e uma filamentação das células bacterianas.

5.2. Genes envolvidos na síntese de componentes da parede celular

Além da redução na taxa de crescimento, uma série de modificações morfológicas ocorre com a bactéria em estado de dormência em consequência de alterações na composição da parede celular (SHLEEVA et al, 2011; VELAYATI et al, 2011).

As micobactérias possuem uma parede celular incomum rica em ácidos micólicos, os quais exercem um papel crítico tanto para a sua estrutura quanto para a sua função (HATFULL; JACOBS JR, 2000). Entre as proteínas mais expressas em condições de anaerobiose estão as proteínas relacionadas com a síntese de ácidos micólicos (STARCK et al, 2004).

Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeias longas que são encontrados tanto, esterificadas a uma molécula de arabinogalactana (ligada ao peptidoglicano), como intercalados na parede celular como um glicolípideo (dimicolato de trealose, por exemplo) (HATFULL; JACOBS JR, 2000).

A biosíntese dos ácidos micólicos envolve dois sistemas de sintese de acidos graxos, o sistema FAS-I, o qual realiza a sintese de ácidos graxos de 24 a 26 carbonos, além, dos produtos usuais de 16 e 18 carbonos, com a cadeia

acílica ancorada à coenzima A, e o sistema FAS-II, composto por enzimas que promovem a extensão dos produtos de FAS-I, gerando lipídeos de 24 a 56 carbonos, os quais se encontram ancorados à proteina carreadora de acila (PCA) (BHATT et al 2007; SWANSON, GOKULAN; SACCHETTINI, 2009).

O sistema FAS-II catalisa a extensão de ácidos graxos provenientes do FAS-I por meio de ciclos repetidos de quatro reações, das quais a primeira é catalisada pelo complexo enzimático β-cetoacil-PCA sintase (KasA/KasB). Essas duas enzimas, codificadas pelos genes *kas*A e *kas*B, agem independentemente em ácidos graxos com cadeias de diferentes tamanhos. Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que, enquanto, KasA esta envolvida na extensão inicial da cadeia, gerando ácidos graxos monosaturados com uma média de 40 carbonos, KasB, na presença de KasA, leva a produção de cadeias maiores sendo responsável pela extensão total dos ácidos micólicos (SCHAEFFER et al, 2001; RAFIDINARIVO et al, 2009).

No presente estudo, o gene *kas*B só apresentou expressão diferencial em 3hs de indução (Figura 25), provavelmente por motivos já explicados no item 5.1. Por outro lado, foi possível verificar um aumento na expressão do gene *kasA* após 24hs de indução do promotor da acetamidase nas bactérias superexpressando a proteína HspX (Figura 25).

Shi e colaboradores (2010), observaram que nas cepas *M. tuberculosis* H37Rv utilizadas para infectar camundongos C57BL/6, a expressão de *kas*A elevou-se cerca de 2 vezes entre 15 e 30 dias de infecção. Esse grupo de pesquisa demonstrou ainda, que nessas mesmas condições, ocorre uma forte inibição na expressão do produto de *fabH* (25X), responsável por conectar os

105

sistemas FAS-I e FAS-II durante a síntese de ácido micólicos. Essa inibição, por sua vez, leva ao desacoplamento desses dois sistemas, redirecionado o produto de FAS-I (Acetil-CoA) para outras vias, como a síntese de triacilglicerol (TAG). Evidências sugerem que bactérias dormentes tendem a acumular lipídeos, especialmente TAG para posterior utilização como fonte de carbono (FILIPPINI et al 2010; PATEL et al, 2012).

Uma vez desacoplado do sistema FAS-I, o sistema FAS-II é incapaz de extender o substrato recém-sintetizados por FAS-I. No entanto, foi visto que KasA interage com as proteínas PpsB e PpsD, duas enzimas envolvidas na biossintese do lipídeo tiocerol dimicocerosato (phthiocerol dimycocerosate, PDIM), superregulado durante a infecção. Essa interação possibilita a transferência do substrato (lipídio) da via biossintetica PDIM para a via FAS-II, em especial para a enzima KasA. A subsequente incorporação e extensão desse substrato gerando ácidos graxos longos demonstra a natureza funcional dessa interação, sugerindo uma rota alternativa para síntese de ácidos micólicos independente de FAS-I, aumentando a diversidade lipídica micobacteriana durante a infecção (KRUH et al, 2008).

Portanto, um aumento na expressão de *kas*A observada no presente estudo após a indução da proteína HspX, sugere que *in vivo* esse aumento de expressão pode ser uma tentativa de manter a integridade da parede celular da micobacteria mesmo diante das condições de estresse encontradas dentro dos macrófagos (hipóxia), aumentando a síntese de ácidos micólicos a partir de lipídeos pré-existentes (PDIM), confirmando então, que a composição lipídica de bacterias dormentes difere estruturalmente dos bacilos em multiplicação.

Peptidoglicano

Estudos mostram que durante a dormência metabólica, a parede micobacteriana torna-se mais espessa (CUNNINGHAM; SPREADBURY, 1998). Por essa razão, foi incluída nesse trabalho a análise da expressão de *mur*B, *mur*C, *mur*E, *mur*F, *mur*G e *pbp*A, alguns dos genes envolvidos com a sintese de peptoglicano, estrutura que confere rigidez à parede celular e determina a forma da bactéria.

Os genes *mur*B, *mur*C, *mur*E, *mur*F e *mur*G codificam enzimas envolvidas na síntese do MurNAc-pentapeptídeo-GlcNAc, unidade do polímero glicopeptidico que compõe o peptidoglicano. Enquanto o gene *pbp*A codifica para a enzima (PBP) que é responsável pela transpeptidação entre polimeros adjacentes, formando uma rede de peptidoglicano (HATFULL; JACOBS JR, 2000).

Após 3hs de indução do promotor da acetamidase foi possível observar um aumento de expressão dos genes *pbp*A, *mur*B, *mur*C, *mur*E, *mur*F e *mur*G em relação a bactéria com o vetor não recombinante, provavelmente por motivos já explicados no item 5.1. Apartir de 24hs de indução, ocorreu uma redução na expressão de *pbp*A em relação ao controle (Figura 27).

O *M. tuberculosis* em estado de dormência metabólica apresenta uma complexa resposta adaptativa alterando o seu perfil de expressão gênica. Essa resposta adaptativa também envolve o remodelamento da rede de peptidoglicano através da substituição da ligação cruzada $4\rightarrow3$, formada pela atividade D,D-transpeptidase de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), pela ligação cruzada $3 \rightarrow 3$ realizada por uma transpeptidase com especifidade L,D

(LAVOLLAY et al, 2008). Desta forma, os resultados sugerem que na dormência bacteriana induzida por hipóxia, um aumento na expressão da proteína HspX pode ter relação com a redução na expressão de *pbp*A, e consequentemente com o remodelamento do peptidoglicano.

5.3. Outros genes

Os principais componentes da parede celular de micobactérias são o complexo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano e a molécula lipoarabinomanana (LAM). A molécula arabinogalactana (AG) é uma glicoproteína que se encontra ancorada à camada de peptideoglicano. Os genes *emb*A e *emb*B codificam para enzimas arabinosiltransferase responsáveis pela adição do resididuo de arabinose ao glicolipideo galactana na biossíntese da AG. Enquanto o gene *fbp*A codifica para uma micoliltransferase responsável pela transferência de ácidos micólicos para a extremidade da AG (HATFULL; JACOBS JR, 2000).

A biossíntese de LAM está diretamente relacionada com a síntese do fosfatidil inositol (PI), do fosfatidilinositol manosideo (PIM) e da lipomanana (LM), cuja a ordem de síntese segue: $PI \rightarrow PIM \rightarrow LM \rightarrow LAM$. Nessa rota de síntese, a adição de resíduos de manose ao PI para a formação de PIM (PIM₂ a PIM₆) ocorre graças à ação de enzimas denominadas manosiltransferases. Uma dessas enzimas codificada pelo gene *pim*B é responsável pela síntese de PIM₂, considerada a estrutura característica predominante encontrada tanto em LM quanto LAM (TORRELLES et al, 2009). Semelhante à biossíntese de AG, uma arabinosil transferase é necessária para a transferência de um resíduo de
arabinose para a molécula de LM para gerar a LAM. No entanto, nesse caso a enzima é codificada pelo gene *emb*C (GOUDE et al, 2008).

No presente estudo, no tempo 3hs de indução (adição de acetamida) houve um aumento na expressão de *pim*B e *fbp*A nas bactérias expressando a proteína HspX (explicações no item 5.1). Em 24hs, os níveis de expressão de *emb*C duplicaram enquanto o *fbp*A reduziu drasticamente e, em 48hs, tanto a expressão de *emb*B, quanto de *emb*C e *fbp*A estavam reduzidas (Figuras 28 e 29).

Um dos principais componentes da parede celular do *M. tuberculosis* que está envolvido com o processo de fagocitose é o LAM, através da sua ligação com o receptor de manose. Essa interação está associada com uma resposta antiinflamatória, uma vez que, LAM inibe a produção de IL-12 dependente do receptor de manose. Além disso, o LAM também exerce um efeito na maturação do fagolisossoma limitando a fusão fagossoma-lisossoma bem como inibe a apoptose dos macrófagos infectados, favorecendo assim, a infecção e promovendo a persistência da bactéria dentro do macrófago (AHMAD, 2011).

Portanto, na fase inicial da infecção a presença da molécula LAM é essencial para a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago, permitindo que o bacilo tenha um tempo hábil para modificar seu perfil de expressão e passe por um processo de adapatação morfológica e metabólica, e entre no estado de dormência. O que justificaria então, o aumento na expressão de *emb*C com 24hs de expressão da proteína HspX, já que o produto resultante desse gene está envolvido na biossíntese de LAM.

Como relatado anteriormente, durante a dormência metabólica, a parede celular e seus componentes sofrem modificações, e uma dessas alterações é na composição dos lipídeos. Dhiman e colaboradores (2011), analisando frações subcelulares do *M.smegmatis* verificaram que durante as fases do crescimento bacteriano mudanças significantes no conteúdo LAM ocorrem. O conteúdo de LAM da parede celular de *M. smegmatis* reduz drasticamente logo que a bactéria entra na fase estacionária, e essa mudança vem acompanhada de alterações na morfologia e na característica de álcool-ácido resistência.

Portanto, essa concentração celular de LAM em *M. smegmatis* é seletivamente modulada com a fase de crescimento. Como as características das bactéria dormentes dentro do macrófago assemelham-se, morfo e metabolicamente, à bactéria na fase estacionária do crescimento *in vitro* (FONTÁN et al, 2008; DEB et al 2009), pode-se inferir que essa redução no conteúdo de LAM também ocorre *in vivo* tornando a bactéria menos imunogênica durante a TB latente.

Provavelmente, por esta razão é possível verificar em 48hs de indução da proteína HspX, uma redução tanto na expressão de *embA*, quanto de *emb*B e *emb*C (Figura 28).

O gene *fbpA*, cujo produto protéico é o antígeno imunodominante Ag85A (MALEN et al., 2007), localizado na membrana (GU et al., 2003), é responsável pela alta afinidade da micobactéria pela fibronectina. A proteína Ag85A está envolvida com o metabolismo de lipídeos em micobactérias por meio da sua atividade micoliltransferase na síntese de AG, bem como, pela transferência de ácidos micólicos para o dissacarídeo trealose, um componente estrutural da parede micobacteriana, resultando na formação do monomicolato de trealose

(MMT) quanto do dimicolato de trealose (DMT, também conhecido como fator corda) (NGUYEN et al, 2005).

O DMT é uma estrutura necessária para a integridade da parede celular, formando uma barreira hidrofóbica impermeável que protege a bactéria de estresses ambientais e da ação de diversos agentes antimicrobianos (KREMER et al, 2002; PUECH, et al, 2002). O DMT é considerado um importante fator de virulência do *M. tuberculosis* necessário tanto para o reconhecimento e fagocitose do bacilo, bem como para a ativação da resposta imune do hospedeiro (ARMITIGE et al, 2000).

Segundo Shi e colaboradores (2004), a diminuição na multiplicação do *M. tuberculosis* durante a infecção latente é acompanhada de uma redução de 10 a 20 vezes nos níveis de transcrição do gene que codifica a proteína Ag85A. Logo, durante a TB latente, a redução nos níveis de expressão de *fbpA*, consequentemente reduz a produção de DMT, e esta redução por sua vez pode levar a um menor ativação do sistema imune.

Nesse trabalho, verificou-se que a partir de 24hs após a indução do promotor da acetamidase, as bactérias expressando a proteína HspX apresentaram uma redução significativa na expressão do mRNA do gene *fbpA* em relação ao controles, corroborando então com os dados da literatura (Figura 29).

A habilidade da micobactéria de se adaptar às diversas condições de estresse é resultante da expressão de regulons específicos. A expressão desses regulons é controlada por fatores sigma (σ). O fator σ é a subunidade da RNA polimerase responsável pelo reconhecimento da região promotora,

permitindo a ligação das outras subunidades da enzima e o início da transcrição gênica. As micobactérias possuem um vasto repertório de fatores sigmas relacionados com a adaptação da bactéria à fase estacionária e ao estresse ambiental, entre eles, o fator sigma F (sigF) (RODRIGUE *et al,* 2006; SACHDEVA et al, 2010).

O SigF de *M. tuberculosis* é homologo ao fator sigma envolvidas com o processo de esporulação em outras bactérias, como *Bacillus subtilis* e *Streptomyces coelicolor* (DE MAIO et al, 1997). Acredita-se que SigF contribui para a virulência do bacilo e imunopatogênese da TB, regulando a expressão de genes envolvidos na biossíntese e estrutura da parede celular (WILLIAMS et al, 2007).

Neste trabalho a expressão de *sigF* foi reduzida em 48hs pós indução do promotor (Figura 29). Enquanto alguns trabalhos mostram que SigF parece estar envolvido na sobrevivência e proliferação do bacilo durante a fase estacionária de crescimento, e no interior de macrófagos, *in vitro* e *in vivo* (GEIMAN et al, 2004). Outros afirmam que SigF não é necessária para sobrevivência bacilar dentro de macrófagos e que a superexpressão de *sigF*, não resulta em retardo do crescimento da bactéria *in vitro* (WILLIAMS et al, 2007).

Por outro lado, Chen e colaboradores (2000) mostraram que a deleção do gene *sig*F resultou em um mutante capaz de crescer 3 vezes mais na fase estacionária do que a cepa controle, embora as taxas de crescimento na fase exponencial tenham sido as mesmas. E quando semeadas em um novo meio de cultura o mutante começou a crescer mais rapidamente que a cepa controle, não exibindo a fase lag. Além disso, no experimento conduzido por Lee e

colaboradores (2008), a superexpressão de sigF resultou em redução das taxas de crescimento intracelular do *M. tuberculosis*. Portanto, os dados da literatura são bastante conflitantes quanto ao papel de SigF na persistência do bacilo.

Segundo Manganelli e colaboradores (1999), a exposição do *M. tuberculosis* H37Rv à hipóxia, não altera os níveis transcricionais de *sigF.* Porém, a condição de hipóxia, a qual as culturas foram submetidas, foi uma incubação sem agitação por apenas 24hs. Portanto, não houve uma real condição de hipóxia, e mesmo nessas condições, os resultados mostram que houve uma tendência a diminuição dos níveis transcricionais de *sigF.* Considerando que o *M. tuberculosis* possui um tempo de geração longo, a exposição dessa bactéria por um tempo mais prolongado e sob condições mais fidedignas de hipóxia talvez resultasse em uma redução de expressão mais significativa.

Em conjunto, os resultados obtidos nesse estudo mostram que um aumento na expressão de HspX levou a uma série de alterações de expressão gênica que podem resultar em modificações morfológicas e metabólicas do bacilo. Juntamente com dados da literatura, esses resultados sugerem que *in vivo* um aumento na expressão de HspX em consequência da depleção de oxigênio pode contribuir para a adaptação morfológica e metabólica do bacilo às novas condições do meio durante a infecção latente.

Essa adaptação, por sua vez, poderia levar a uma modificação da estrutura do envelope celular micobacteriano, consequentemente, modificando suas propriedades antigênicas para permitir que a bactéria escape do

reconhecimento e da eliminação pelo sistema imune, e possa permanecer por longos períodos no organismo humano. Por essa razão, realizamos um ensaio de infecção de macrófagos para avaliar a sobrevivência desses bacilos, e o perfil de expressão gênica dos macrófagos expressando a proteína HspX.

5.4. Infecção de macrófagos

As bactérias utilizadas para a infecção de macrófagos foram previamente induzidas com acetamida (24hs antes). Por tanto, todas as modificações observadas no tempo 24hs de indução discutidas nos itens anteriores, estavam presentes no momento da infecção. De acordo com a figura 24, podemos observar que em 24hs de infecção mesmo havendo uma queda no número de UFC, é possível observar uma maior sobrevivência das bactérias MS::HspX, isso porque essas modificações deixam a bactéria menos imunogênicas, e portanto, conseguem sobreviver melhor e por mais tempo dentro do macrófago do que a bactéria MS.

Dos macrófagos infectados com MS e MS::HspX, bem como de macrófagos não infectados (controles) foram analisados genes cujos produtos estão envolvidos com a resposta inata do macrófago à infecções, como por exemplo, receptores Toll-like, citocinas, quimiocinas, proteínas pró e antiapoptóticas, entre outros.

Os receptores *Toll-like* (TLRs) exercem um papel crítico no reconhecimento de vários patógenos, incluindo *M. tuberculosis*, cujos antígenos são reconhecidos por distintos TLRs resultando em uma rápida ativação da resposta imune inata e adaptativa, como a síntese de TNF-α e IL-12 (RYFFEL et al, 2005; KLEINNIJENHUIS et al, 2011).

No presente estudo, foram avaliados a expressão dos genes que codificam para os receptores *Toll like* 1, 2 e 6. Os genes que codificam para receptores foram escolhidos porque estão envolvidos esses com reconhecimento de componentes da parede celular de micobactérias. Onde, TLR2 forma um heterodímero com TLR1 para o reconhecimento tanto de lipopeptideos triacilados, quanto de glicolipídeos da parede celular, incluindo LAM, LM, PIM e DMT. Enquanto, o heterodímero TLR2-TLR6 reconhece peptideoglicano e fatores solúveis de M. tuberculosis, e o TLR1-TLR6 reconhece lipopeptídeos diacilados (RYFFEL et al, 2005; HARDING; BOOM, 2010). Porém, não houve uma diferença de expressão significante desses receptores entre os grupos analisados.

Uma das estratégias de defesa dos macrófagos infectados é a ativação da morte programada (apoptose) da célula hospedeira. Apoptose é um processo altamente regulado, que pode ocorrer por duas vias, a via extríseca (clássica) mediada por uma família de proteases denominadas caspases, e a via intrínseca, mediada por proteínas integrantes da família Bcl-2. Nesta última, as proteínas pró-apoptótica BAX e BAK formam poros na membrana externa das mitocôndrias, permitindo a liberação de citocromo c. Fenômeno este que é bloqueado pela presença de membros anti-apoptóticos da família, incluindo BCL-2, BCLX-L e MCL-1. O destino da célula é assim determinado pelo balanço e integração das atividades de ambas as proteínas, pró e antiapoptóticas (LEE, HARTMAN; KORNFELD, 2009; ABEBE et al 2010).

Com relação aos genes envolvidos com apoptose avaliados nesse estudo, apenas o gene anti-apoptótico BCL2 apresentou uma diferença de expressão entre os grupos analisados, sendo mais expresso nos macrófagos infectados com MS (3hs de infecção), do que nos macrófagos infectados com MS::HspX. Uma hipótese para isso seria que as modificação gênicas ocorridas com a bactéria na presença da proteína HspX, a tornaram menos virulenta no momento da infecção, e portanto, em 3hs de infecção a presença dos glicolipídeos da bactéria MS induziram mais a expressão do gene anti-apoptóticos. Isso também justificaria uma maior proliferação dessas bactérias no inicio da infecção, como mostra a figura 24.

Maiti e colaboradres (2001) demonstraram que a LAM de espécies virulentas de *M. tuberculosis* estimula a fosforilação de BAD, uma proteína próapoptótica também pertencente à família Bcl-2, e essa fosforilação por sua vez, leva a ativação de proteínas antiapoptóticas, promovendo a sobrevivência celular. Portanto, os fatores de virulência do *M. tuberculosis* são capazes de regular as vias de sinalização de controle da apoptose, promovendo a sobrevivência do bacilo.

Isso foi comprovado por Zhang et al (2005), que tentando definir o mecanismo pelo qual as cepas virulentas de *M. tuberculosis* escapam da apoptose e da morte em macrófagos, verificaram através da PCR em tempo real, que a proteína Bcl-2 foi superexpressa em macrófagos infectados com H37Rv e subexpressa em macrófagos infectados com H37Rv e subexpressa em macrófagos infectados com H37Ra. Esses resultados indicam que, na fase inicial da infecção, cepas mais virulentas expressam mais BCL-2, o qual leva a uma atividade anti-apoptótica.

Das citocinas e/ou quimiocinas analisadas apenas o mRNA dos genes IL-1B e IL-8 tiveram sua expressão diferentemente expressas nos macrófagos infectados com a bactéria expressando HspX, a partir de 48hs de infecção.

Apenas a expressão da proteína IL-1b foi confirmada através da quatificação dessa citocina no sobrenadante do meio de cultura (figuras 35).

O contato inicial entre o patógeno *M. tuberculosis* e o hospedeiro humano pode determinar o desfecho da infecção. Assim, após a captura do bacilo por macrófagos alveolares, o bacilo pode ser destruído imediatamente ou a infecção pode se instalar. Neste último caso, uma rápida resposta inflamatória não específica (imunidade inata) ocorre, e é importante para a contenção do bacilo no foco de infecção. Esta resposta é regulada por um conjunto de citocinas pró e antiinflamatória e quimiocinas, sendo a maioria derivada dos macrófagos e de células dendríticas (CREVEL, OTTENHOFF; MEER, 2002).

A quimiocinas são citocinas quimiotáticas responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para o foco da infecção. O papel de algumas dessas quimiocinas na TB vem sendo estudada, como por exemplo, a IL-8. Após a fagocitose do *M. tuberculosis* ou estimulação com LAM, os macrófagos produzem IL-8, o qual atrai especialmente neutrófilos para o foco da infecção. Porém, essa produção é bloqueada pela neutralização por TNF-α e IL-1b, indicando que a produção de IL-8 está sob controle dessas citocinas (CREVEL, OTTENHOFF; MEER, 2002).

Os resultados do presente estudo mostram que a expressão do mRNA de IL-1b correlacionou com a expressão da proteína no sobrenadante da cultura de célula, o que não ocorreu com a IL-8. Sugerindo que a regulação dessa citocina pela IL-1b pode ter ocorrido após a transcrição. Por tanto, a

presença da proteína HspX, modulou a expressão de algumas citocinas envolvidas com a reposta imune inata.

Retzlaff e colaboradores (1994), já associavam a presença de proteínas de choque térmico de micobactérias com a modulação de citocinas em macrófagos, especialmente, na indução direta do mRNA e na secreção da IL-1.

A IL-1b é uma citocina pró-inflamatória, e assim como o TNF-α, é produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas. Na TB, a IL-1b é expressa em excesso e está envolvida na resposta do hospedeiro ao *M. tuberculosis,* recrutando e retendo macrófagos no foco da infecção. Uma deficiência dessa citocina leva a um aumento no crescimento micobacteriano e compromente a formação do granuloma após a infecção (CREVEL, OTTENHOFF; MEER, 2002; RIDER et al, 2011).

A IL-1b é sintetizada como uma pró citocina biologicamente inativa de 31kDa (proIL-1b), no citosol de monócitos e macrófagos. A conversão para sua forma biologicamente ativa de 17kDa requer a maturação proteolítica pela caspase-1 (casp-1). A proteólise da proIL-1b é imediatamente seguida pela secreção da citocina madura para o espaço extracelular (MISHRA et al, 2010).

A expressão de IL-1b é controlada pela combinação de dois diferentes sinais: o primeiro induz a expressão da pro–IL-1b e o segundo que resulta na maturação protéica via casp-1. O primeiro sinal tipicamente envolve a sinalização via TLR e a própria IL-1 como regulador positivo dessa via (TODA et al, 2002). O sinal 2, em contraste, envolve um número de eventos que levam a montagem de um complexo protéico conhecido como inflamossoma que ativa casp-1, clivando assim, a proIL-1b em IL-1b madura.

Master e colaboradores (2008) mostraram que o *M. tuberculosis* previne a ativação de inflamossoma, e o consequente processamento de IL-1b. No entanto, dois anos depois, um outro grupo afirmou como base em seus resultados que durante a infecção, a citocina IL-1b pode ser gerada por um mecanismo que não requer a sinalização por TLR nem a ativação por casp-1 (BARBER et al, 2010). O que justificaria o fato de não ser observado uma diferença de expressão nos receptores TLRs entres os grupos analisados no presente estudo, apesar da superregulação de IL-1b no grupo MS::HspX.

A montagem e ativação do inflamossoma são processos essenciais na resposta imune inata contra o patógeno. Um inflamossoma típico é formado por membros da família de sensores citosólico da imunidade inata, denominados de receptores NOD-like (NLRs) (LAZAREVIC; MARTINON, 2008). Esses sensores citoplasmáticos além da montagem e ativação do inflamassoma estão envolvidos na ativação transcricional de mediadores inflamatórios através da translocação nuclear de fatores de transcrição, como NF-kB e AP-1 (MARTINON; TSCHOPP, 2005; YANG et al, 2007; COULOMBE et al 2009). Os receptores NLRs compreendem duas grandes subclasses com características estruturais diferentes, os NODs (5 membros) e NALPs (14 membros) (MEYLAN, TSCHOPP; KARIN, 2006).

Os membros da familia NLR subclasse NALP: NALP3, NAIP5, ou IPAF e o adaptador ASC estão envolvidos na ativação da casp-1 em resposta a infecção bacteriana, disparando o processamento e maturação das citocinas IL-1b e IL-18 (LAZAREVIC; MARTINON, 2008).

A sinalização de NOD2 após estimulação com muramildipeptideo (MDP), componente do peptidoglicano comum entre as bactérias, tem um efeito duplo tanto na ativação da transcrição do mRNA proIL-1b quanto na indução da secreção IL-1b bioativa (FERWERDA et al 2008). A sinalização de NOD2 também induz a transcrição e a expressão da enzima autofágica IRGM em macrófagos alveolares (JUAREZ et al, 2012).

A enzima IRGM exerce um papel na autofagia e na redução da carga bacilar intracelular de *M. tuberculosis* (SINGH et al, 2006; SINGH, 2011; SONGANE et al, 2012). A autofagia é mecanismo homeostático vital altamente conservado para a degradação lisossomal de constituintes citosólicos, em estruturas especializadas denominadas autofagossomas. Os autofagossomas são formados em resposta a estímulos ambientais, incluindo moléculas derivadas tanto do patógeno, como ligantes de receptores *Toll-like*, quanto do hospedeiro, como citocinas (HARRIS, 2011). Autofagia tem se destacado como mecanismo crucial de defesa contra infecções bacterianas, incluindo o *M. tuberculosis* (GUTIERREZ, 2004; DERETIC, 2006; DERETIC et al, 2009; CHEALLAIGH, 2011; HOMER et al 2012; ZULLO; LEE, 2012).

Os sensores NOD1 e NOD2 são críticos para a resposta autofágica contra bactérias intracelulares. Além da proteína IRGM, outras proteínas autofágicas como LC3 e ATG16L1 são recrutadas para os autofagossomas contendo a bactéria (JUAREZ et al, 2012; TRAVASSOS et al, 2010).

Animais deficientes de ATG16L1 apresentam ausência de autofagia, aumentando o processamento de IL-1b e IL-18 de uma maneira dependente de inflamossoma. Por tanto, a autofagia modula a secreção de citocinas pró inflamatórias em células humanas através de uma via independente de inflamassoma (CRISAN et al 2011). A autofagia controla a secreção de IL-1b direcionando a pro-IL-1b para a degradação lisossomal (HARRIS et al 2011; LEE et al, 2011).

No presente estudo verificamos que nos macrófagos infectados com MS::HspX, o mRNA do gene IRGM, nos tempos 24 e 48hs, de infecção foi aproximadamente 3 vezes menos expresso do que no macrófago infectado com MS. Indicando que a presença da proteína HspX inibiu a expressão de IRGM. Como a enzima IRGM está envolvida com a autofagia e com a redução da carga bacilar dentro do macrófago, talvez a superregulação desse gene pela bactéria MS tenha sido responsável pela menor contagem de UFC dessas bactérias em 24 e 48hs quando comparados a bactéria expressando HspX.

A infecção de macrófagos por *M. tuberculosis* estimula a atividade de casp-1 e promove a secreção de IL-1b madura. Existem hipóteses de que a ativação do inflamassoma é disparada por componentes do *M. tuberculosis* que atravessam a barreira fagossomal e são reconhecidas por receptores citosólicos promovendo a maturação de IL-1b. Apesar da contenção da bactéria no fagossoma, o *M. tuberculosis* tem se mostrado capaz de ativar a sinalização via NLR. Esse reconhecimento é dependente de um sistema especializado de secreção de proteínas denominado ESX-1. Esse sistema é conhecido por causar pertubação na membrana celular, facilitando a passagem de produtos bacterianos imunoestimulatórios do fagossoma para o citossol. Vários componentes da bactéria conseguem atravessar a membrana fagossomal, e alcançar o citosol de macrófagos durante a infecção, entre eles,

o antígeno com Ag85 (MCLAUGHLIN et al, 2007; MISHRA et al 2010; DAS, GHOSH; MANDE, 2011; MANZANILLO et al 2012).

A proteína HspX pertence a uma família de pequenas proteínas de choque térmico (*small heat shock proteins*, sHsp), uma classe diversa e ubíqua, que tem como característica em comum o baixo peso molecular, com monômeros variando em tamanho de 12 a 42kDa. A característica principal dessa classe é um domínio de 90-100 aminoácidos localizado na porção C-terminal, conhecido como domínio α-cristalina. Esse domínio é flaqueado por uma extremidade N-terminal, de sequência e comprimento variável (média de 55 aminoácidos), e uma estremidade C-terminal, tipicamente contendo menos de 20 resíduos (JIAO et al, 2005; KENNAWAY et al, 2005).

Além do baixo peso molecular, outras duas características em comum dessas proteínas é a sua estrutura oligomérica que varia de 9 a 50 subunidades e sua função chaperona *in vitro*, propriedade que auxilia no enovelamento correto de proteínas e/ou encaminha a proteína à destruição, caso não seja possível atingir a configuração correta (JIAO et al, 2005). Apesar das características comuns das sHSP, alguns autores sugerem que é necessário cautela ao classificar todas essas proteínas dentro de um único modelo de estrutura e mecanismo de ação (BASHA, O'NEILL; VIERLING, 2012).

Dados recentes fornecem informações fundamentais sobre a variedade de estruturas dessas proteínas, seu comportamento dinâmico, como elas reconhecem substratos, sobre a interação proteína–proteína e suas outras possíveis funções celulares além de chaperonas, que requer interações de proteínas (FU et al, 2004; BASHA, O'NEILL; VIERLING, 2012).

Preneta e colaboradores (2004), demonstraram que a proteína HspX é uma fosfoproteína e possui uma atividade quinase intríseca, catalizando sua autofosforilação em um resíduo de serina, ou seja, ela é uma serina autoquinase. Porém, pouco se sabe a respeito do papel biológico dessa fosforilação. Devido a capacidade da proteína HspX de interagir com outras proteínas (KENNAWAY et al, 2005), acredita-se que a atividade quinase da HspX pode não ser restrita a sua própria fosforilação, podendo agir também sobre outros substratos (proteínas), tanto dentro da parede micobacteriana, quanto no citosol da bactéria e/ou no meio externo (dentro de células infectadas).

As alterações de expressão gênica encontradas nesse estudo, poderiam ser explicadas por essas propriedades (quinase, ou ainda, uma possível atividade fosfatase) da proteína HspX. Contudo, os fenômenos observados no presente estudo envolvem proteína e sequências nucleotídidicas (genes). Seria interessante investigar se existe também essa relação entre a proteína HspX e as moléculas reguladoras dos genes estudados, em nível de proteína, a fim de avaliar melhor, o efeito da expressão da proteína HspX na dormência metabólica do *M. tuberculosis in vivo.*

A figura 37 mostra uma possível via de sinalização da proteína HspX durante a infecção de macrófagos com base nos resultados desse estudo e dados da literatura. Como a proteína HspX é um antígeno encontrado no filtrado do meio de cultura, mesmo sem possuir uma sequencia sinal que permita sua secreção por vias clásssicas (HATFULL; JACOBS JR, 2000), pode-se sugerir que essa proteína seja transportada para o citosol de macrófagos através do sistema ESX1. Uma vez no citosol, essa proteína, assim como, outros componentes da micobactéria, podem ativar a sinalização via NOD2 e induzir a expressão e maturação da IL-1b, a qual é importante na formação do granuloma e contenção do bacilo. Além disso, a expressão de HspX foi acompanhada de uma inibição na expressão da enzima autofágica IRGM. Uma diminuição dessa enzima pode levar a um bloqueio da autofagia como um mecanismo de sobrevivência, e consequentemente, não ocorre degração lisossomal de IL1b, elevando os níveis da citocina madura secretada no meio extracelular.



Figura 37: Esquema sugestivo da influência da proteína HspX na regulação da resposta imune inata na infecção com *M. tuberculosis,* elaborado com base nos resultados do presente estudo e em dados da literatura. Setas preta e vermelha: vias clássicas de ativação e degradação de IL-1b, respectivamente. Seta verde: Vias ativadas por proteínas secretadas pelo *M. tuberculosis* via ESX-1. Seta amarela: Possíveis vias moduladas pela proteína HspX.

#CONCLUSÃO

6. Conclusões

Utilizando *M. smegmatis* como organismo modelo foi possível concluir

que:

- A expressão da proteína HspX resulta em alteração no tamanho da célula bacteriana e da colônia em meio 7H10.
- 2. O aumento da expressão de HspX altera, direta ou indiretamente a expressão de genes envolvidos com a síntese de componentes da parede celular (*emb*B, *emb*C, *pbp*A, *kas*A, *sig*F e *fbpA*), no processo de replicação do DNA (*dnaA* e *dnaG*) e de divisão celular (*whmD* e *ftsZ*).
- 3. Alterações de expressão gênica na bactéria em resposta à presença de da proteína HspX pode contribuir para modulação da resposta imune inata. Essa modulação pode ocorrer ou como consequência das modificações na composição da parede celular da bactéria, ou por ação direta do antígeno HspX.

#REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas (ABNT NBR 6023)

ABEBE, M.; KIM, L.; ROOK, G.; ASEFFA, A.; LIYAWASSIE; ZEWDIE, M.; ZUMLA, A.; ENGERS, H.; ANDERSEN; P.; DOHERTY, T. M. Modulation of cell death by *m. Tuberculosis* as a strategy for pathogen survival. **Clinical and Developmental Immunology**, 2011.

AHMAD, S. Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent *Mycobacterium tuberculosis* Infection. **Clinical and Developmental Immunology.** 2011.

ARMITIGE, L. Y., JAGANNATH, C., WANGER, A. R.; NORRIS, S. J. Disruption of the Genes Encoding Antigen 85A and Antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Effect on Growth in Culture and in Macrophages. **Infection and Immunity.** v. 68, n. 2, p. 767–778, 2000.

BACON, J., JAMES, B. W., WERNISCH, L., WILLIAMS, A., MORLEY, K. A., HATCH, G. J., MANGAN, J. A., HINDS, J., STOKER, N. G., BUTCHER, P. D.; MARSH, P. D. The influence of reduced oxygen availability on pathogenicity and gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**. v. 84, p. 205–217, 2004.

BAENA, A.; PORCELLI, S.A. Evasion and subversion of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*. **Tissue Antigens**. v.74, n.3, p. 189–204, 2009.

BAGCHI, G., CHAUHAN, S., SHARMA, D.; TYAGI, J. S. Transcription and autoregulation of the Rv3134c devR-devS operon of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**. v.151, p. 4045–4053, 2005.

BARCO, P., CARDOSO, R. F., HIRATA, R. D. C., LEITE, C. Q. F., PANDOLFI, J. R., SATO, D. N., SHIKAMA, M. L., FIUZA DE MELO, F., MAMIZUKA, E. M., CAMPANERUT, P. A. Z.; HIRATA, M. H. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from the southeast region of Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.58, p.930–935, 2006.

BASHA, E., O'NEILL, H.; VIERLING, E. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. **Trends in Biochemical Sciences.** v.37, n.3, 2012.

BECK, S.T., LEITE, O.M., ARRUDA, R.S.; FERREIRA, A.W. Humoral response to low molecular weight antigens of *Mycobacterium tuberculosis* by tuberculosis patients and contacts. **Braz J Med Biol Res** v.38, n.4, p. 587-596. 2005.

BEHAR, S. M., DIVANGAHI, M.; REMOLD, H. G. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? **Nature Reviews Microbiology.** v.8, p.668-674, 2010.

BETTS, J.C.; LUKEY, P. T.; ROBB, L. C.; MCADAM; R. A.; DUNCAN, K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 717–731, 2002.

BHATT, A.; MOLLE, V.; BESRA, G. S.; JACOBS JR, W. R.; KREMER, L. The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. **Molecular Microbiology**, v. 64, n. 6, p.1442–1454, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico. Especial Tuberculose.** v. 43. Brasília. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual Nacional de Vigilância** Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias. Brasília. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Recomendações para o Controle da Tuberculose no Brasil.** Brasília. 2011.

BRETL, D. J., DEMETRIADOU, C.; ZAHRT, T. C. Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 75, n. 4, p. 566–582, 2011.

CAMPOS, H. S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Pulmão RJ**. n.15, v.1, p.29-35, 2006.

CARDOSO, R. F., CARDOSO, M. A., LEITE, C. Q. F., SATO, D. N., MAMIZUKA, E. M., HIRATA, R. D. C., FIÚZA DE MELLO, F.; HIRATA, M. H. Characterization of *ndh* gene of isoniazid resistant and susceptible *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 102, n.1, p. 59-61, 2007.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P.; BARCO, P.; CECON, L.; FORESTIERO, F.; LEITE, C. Q. F.; SATO, D. N.; SHIKAMA, M. L.; MAMIZUKA, E. M.; HIRATA, R. D. C.; HIRATA, M. H. Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n.9, p. 3373–3381, sept. 2004.

CAWS, M., THWAITES, G., DUNSTAN, S., HAWN, T.R., LAN, N.T.N., et al. The Influence of Host and Bacterial Genotype on the Development of Disseminated Disease with *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS Pathog. v.**4, n.3, 2008. CECON, L. **Mutações no gene nat de isolados de** *Mycobacterium tuberculosis*: efeito na atividade enzimática e no perfil de resistência à **isoniazida.** 2009. 150p. Tese (Doutorado em Farmácia - Análises Clínicas) – Programa de Pós-graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CHANGSEN, C., FRANZBLAU, S. G.; PALITTAPONGARNPIM, P. Improved Green Fluorescent Protein Reporter Gene-Based Microplate Screening for Antituberculosis Compounds by Utilizing an Acetamidase Promoter. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.47, n.12, p. 3682–3687, 2003.

CHAUHAN, S.; TYAGI, J. S. Cooperative Binding of Phosphorylated DevR to Upstream Sites Is Necessary and Sufficient for Activation of the Rv3134c*devRS* Operon in *Mycobacterium tuberculosis*: Implication in the Induction of DevR Target Genes. **Journal of Bacteriology**. v.190, n.12, p. 4301–4312, 2008.

CHEN, P., RUIZ, R. E., LI, Q., SILVER, R. F.; BISHAI, W. R. Construction and Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* Mutant Lacking the Alternate Sigma Factor Gene *sigF.* **Infection and Immunity**. v. 68, n. 10, p. 5575–5580, 2000.

COLLINS, H. L.; KAUFMANN, S. H. E. The many faces of host responses to tuberculosis. **Immunology**. v.103, p.1-9, 2001.

COULOMBE, F.; DIVANGAHI, M.; VEYRIER, F.; LÉSÉLEUC, L.; GLEASON, J. L.; YANG, Y.; KELLIHER, M. A.; PANDEY, A. K.; SASSETTI, C. M.; REED, M. B.; BEHR, M. A. Increased NOD2-mediated recognition of *N*-glycolyl muramyl dipeptide. **Exp. Med**, v. 206, n.8, p.1709-1716, 2009.

CREVEL, R. V., OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology Reviews**. v.15, n.2, p. 294–309, 2002.

CREVEL, R. V.; OTTENHOFF, T. H. M.; VAN DER MEER, J. W. M. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 294–309, 2002.

CRISAN, T. O.; PLANTINGA, T. S.; VAN DE VEERDONK, F. L.; FARCAS, M. F.; STOFFELS, M.; KULLBERG, B.; VAN DER MEER, J. W. M.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G. Inflammasome-independent modulation of cytokine response by autophagy in human cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

CUNNINGHAM, A. F.; SPREADBURY, C. L. Mycobacterial Stationary Phase Induced by Low Oxygen Tension: Cell Wall Thickening and Localization of the 16-Kilodalton a-Crystallin Homolog. **Journal of Bacteriology.** v. 180, n. 4, p. 801–808, 1998. DAIGNEAULT, M.; PRESTON, J. A.; MARRIOTT, H. M.; WHYTE, M. K. B.; DOCKRELL, D. H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, 2010.

DAS, C.; GHOSH, T. S.; MANDE S. S. Computational analysis of the ESX-1 region of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into the mechanism of type VII secretion system. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

DATTA, P.; DASGUPTA, A.; BHAKTA, S.; BASU, J. Interaction between FtsZ and FtsW of *Mycobacterium tuberculosis*. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 28, p.24983–24987, 2002.

DAVIDOW, A., KANAUJIA, G. V., SHI, L., KAVIAR, J., GUO, X. D., SUNG, N., KAPLAN, G., MENZIES, D.; GENNARO, M. L. Antibody profiles characteristic of *Mycobacterium tuberculosis* infection state. **Infect Immun** v.73, n.10, p. 6846-6851. 2005.

DE MAIO, J., ZHANG, Y., KO, C.; BISHAI, W.R. *Mycobacterium tuberculosis sigF* is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis sigF* and *sigB* operons. **Tuber Lung Dis.** v.78, n.1, p.3-12, 1997.

DEB, C., LEE, C-M., DUBEY, V.S., DANIEL, J., ABOMOELAK, B., et al. A Novel In Vitro Multiple-Stress Dormancy Model for *Mycobacterium tuberculosis* Generates a Lipid-Loaded, Drug-Tolerant, Dormant Pathogen. **PLoS ONE.** v.4, n.6, 2009.

DEMISSIE, A., LEYTEN, E. M. S., ABEBE, M., WASSIE, L., ET AL. Recognition of stage-specific mycobacterial antigens differentiates between acute and latent infections with *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Vaccine Immunol** v.13, n.2, p. 179-186. 2006.

DERETIC, V.; FRATTI, R. A. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. **Molecular Microbiology.** v.31, n.6, p.1603–1609, 1999.

DERETIC, V. Autophagy as an immune defense mechanism. **Current Opinion in Immunology**, v.18, p.375–382, 2006.

DERETIC, V.; DELGADO, M.; VERGNE, I.; MASTER, S.; DE HARO, S.; PONPUAK, M.; SINGH, S. A. Autophagy in immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: a model system to dissect immunological roles of autophagy. **Curr Top Microbiol Immunol**, v.335, p. 169–188, 2009.

DESJARDIN, L. E., HAYES, L. G., SOHASKEY, C. D., WAYNE, L. G.; EISENACH, K. D. Microaerophilic induction of the alpha-crystallin chaperone protein homologue (*hspX*) mRNA of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Bacteriol**. v.183, n.18, p. 5311-5316. 2001.

DHIMAN, R K.; DINADAYALA, P.; RYAN, G. J.; LENAERTS, A. J.; SCHENKEL, A. R.; CRICK, D. C. Lipoarabinomannan localization and abundance during growth of *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology, v.193, n.20, p.5802–5809, 2011.

DIETRICH, J.; DOHERTY, T.M. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with the host: consequences for vaccine development. **APMIS**. v.117, p.440–57, 2009.

DOHERTY, T. M.; ARDITI, M. TB, or not TB: that is the question-does TLR signaling hold the answer? **J. Clin. Invest**. v.114, n.12, p.1699–1703, 2004.

DZIADEK, J.; RUTHERFORD, S. A.; MADIRAJU, M. V.; ATKINSON, M. A. L.; RAJAGOPALAN, M. Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis ftsZ*, an essential cell division gene. **Microbiology**, v.149, p.1593–1603, 2003.

EHRT, S.; SCHNAPPINGER, D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. **Cellular Microbiology.** v.11, n.8, p.1170–1178, 2009.

ERNST, J. D. Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. **Infection and Immunity**. v.66, n.4, p. 1277–1281, 1998.

ETIENNE, G., LAVAL, F., VILLENEUVE, C., DINADAYALA, P., ABOUWARDA, A., ZERBIB, D., GALAMBA, A.; DAFFE, M. The cell envelope structure and properties of *Mycobacterium smegmatis* mc²155: is there a clue for the unique transformability of the strain? **Microbiology**. v.151, p.2075–2086, 2005.

FERWERDA, G.; KRAMER, M.; DE JONG, D.; PICCINI, A.; JOOSTEN, L. A.; DEVESAGINER, I.; GIRARDIN, S. E.; ADEMA, G. J.; VAN DER MEER, J. W. M.; KULLBERG, B.; RUBARTELLI, A.; NETEA, M. G. Engagement of NOD2 has a dual effect on proIL-1b mRNA transcription and secretion of bioactive IL-1b. **Eur. J. Immunol**, v.38, p.184–191, 2008.

FILIPPINI, P., IONA, E., PICCARO, G., PEYRON, P., NEYROLLES, O.; FATTORINI, L. Activity of Drug Combinations against Dormant *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 54, n.6, p. 2712–2715, 2010.

FLORCZYK, M. A., MCCUE, L. A., PURKAYASTHA, A., CURRENTI, E., WOLIN, M. J.; MCDONOUGH, K. A. A Family of *acr*-Coregulated *Mycobacterium tuberculosis* Genes Shares a Common DNA Motif and Requires Rv3133c (*dos*R or *dev*R) for Expression. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 9, p. 5332–5343, 2003.

FONTÁN, P., ARIS, V., GHANNY, S., SOTEROPOULOS, P.; SMITH, I.. Global Transcriptional Profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 Human Macrophage Infection. **Infection and Immunity**. v.76, n.2, p. 717–725, 2008.

FU, X., ZHANG, H., ZHANG, X., CAO, Y., JIAO, W., LIU, C., SONG, Y., ABULIMITI, V; CHANG, Z. A Dual Role for the N-terminal Region of *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3 in Self-oligomerization and Binding Denaturing Substrate Proteins. **The Journal of Biological Chemistry.** v.280, n.8, p. 6337–6348, 2005.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapêutica Racional.** 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

GEIMAN, D. E., KAUSHAL, D., KO, C., TYAGI, S., MANABE, Y. C., SCHROEDER, B. G., FLEISCHMANN, R. D., MORRISON, N. E., CONVERSE, P. J., CHEN, P.; BISHAI, W. R. Attenuation of Late-Stage Disease in Mice Infected by the *Mycobacterium tuberculosis* Mutant Lacking the SigF Alternate Sigma Factor and Identification of SigF-Dependent Genes by Microarray Analysis. Infection and Immunity. v. 72, n. 3, p. 1733–1745, 2004.

GEIMAN, D. E., RAGHUNAND, T. R., AGARWAL, N.; BISHAI, W. R. Differential Gene Expression in Response to Exposure to Antimycobacterial Agents and Other Stress Conditions among Seven *Mycobacterium tuberculosis whiB*-Like Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 8, p.2836–2841, 2006.

GELUK, A.; LIN, M. Y.; MEIJGAARDEN, K. E. V.; LEYTEN, E. M. S.; FRANKEN, K. L. M. C.; OTTENHOFF, T. H. M.; KLEIN, M. R. T-Cell Recognition of the HspX Protein of *Mycobacterium tuberculosis* Correlates with Latent *M. tuberculosis* Infection but Not with *M. bovis* BCG Vaccination. Infection and Immunity, v. 75, n. 6, p. 2914–2921, 2007.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S. H. E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**. p.1–19, 2012.

GHOSH, J., LARSSON, P., SINGH, B., PETTERSSON, B. M. F., ISLAM, N. M., SARKAR, S. N., DASGUPTA, S.; KIRSEBOM, L. A. Sporulation in mycobacteria. **PNAS**, 2009.

GOMEZ, J.E.; BISHAI, W.R. *whm*D is an essential mycobacterial gene required for proper septation and cell division. **PNAS**, v. 97, n. 15, 2000.

GORDILLO, S., GUIRADO, E., GIL, O., DÍAZ, J., AMAT, I., MOLINOS, S., VILAPLANA, C., AUSINA, V.; CARDONA, P. J. Usefulness of acr expression for monitoring latent *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in 'in vitro' and 'in vivo' experimental models. **Scand J Immunol.** v.64, n.1, p. 30-39. 2006.

GOUDE, R.; AMIN, A. G.; CHATTERJEE, D.; PARISH, T. The critical role of *embC* in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of bacteriology**, v.190, n.12, p. 4335–4341, 2008.

GREENDYKE, R.; RAJAGOPALAN, M.; PARISH, T.; MADIRAJU, M. V. V. S. Conditional expression of *Mycobacterium smegmatis dnaA*, an essential DNA replication gene. **Microbiology**, v.148, p.3887–3900, 2002.

GU, S., CHEN, J., DOBOS, K. M., BRADBURY, E. M., BELISLE, J. T.; CHEN, X. Comprehensive Proteomic Profiling of the Membrane Constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* Strain. **Molecular; Cellular Proteomics.** v.2, p.1284–1296, 2003.

GUTIERREZ, M. G.; MASTER, S. S.; SINGH, S. B.; TAYLOR, G. A.; COLOMBO, M. I.; DERETIC, V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. **Cell**, v.119, p.753–766, 2004.

HARDING, C. V.; BOOM, W. H. Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors. **Nat Rev Microbiol.** v.8, n.4, p.296–307, 2010.

HARRIS, J. Autophagy and cytokines. Cytokine, v. 56, p.140–144, 2011.

HARRIS, J.; HARTMAN, M.; ROCHE, C.; ZENG, S. G.; O'SHEA, A.; SHARP, F. A.; LAMBE, E. M.; CREAGH, E. M.; GOLENBOCK, D. T.; TSCHOPP, J.; KORNFELD, H.; FITZGERALD, K. A.; LAVELLE, E. C. Autophagy controls il-1 β secretion by targeting pro-il-1 β for degradation. **Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.9587-9597, 2011.

HATFULL, G.F.; JACOBS JR, W. R. **Molecular Genetics of Mycobacteria**. Washington: American Society for Microbiology, 2000.

HETT, E. C.; RUBIN, E. J. Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 72, n. 1, p. 126–156, 2008.

HOMER, C. R.; KABI, A.; MARINA-GARCÍA, N.; SREEKUMAR, A.; NESVIZHSKII, A. I.; NICKERSON, K. P.; CHINNAIYAN, A. M.; NUÑEZ, G.; MCDONALD, C. Dual role for receptor-interacting Protein Kinase 2 (RIP2) kinase activity in Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2 (NOD2)-dependent autophagy. **The journal of biological chemistry**, v.287, n.30, p.25565–25576, 2012.

HU, Y.; COATES, A. R. M. Transcription of the Stationary-Phase-Associated *hspX* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Is Inversely Related to Synthesis of the 16-Kilodalton Protein. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n.5, p. 1380–1387, 1999.

HU, Y., MOVAHEDZADEH, F., STOKER, N. G.; COATES, A. R. M. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like *hsp*X gene causes increased bacterial growth in vivo. **Infect Immun,** v.74, n.2, p. 861-868, 2006.

JIAO, W., LI, P., ZHANG, J., ZHANG, H.; CHANG, Z. Small heat-shock proteins function in the insoluble protein complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.335, p. 227–231, 2005.

JUAREZ, E.; CARRANZA, C.; HERNANDEZ-SANCHEZ, F.; LEON-CONTRERAS, J. C.; HERNANDEZ-PANDO, R.; ESCOBEDO, D.; TORRES, M.; SADA, E. NOD2 enhances the innate response of alveolar macrophages to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **Eur. J. Immunol,** v.42, p.880–889, 2012.

KANG, P. B., AZAD, A. K., TORRELLES, J. B., KAUFFMAN, T. M., BEHARKA, A., TIBESAR, E., DESJARDIN L. E.; SCHLESINGER, L. S. The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. **JEM.** v. 202, n. 7, 2005.

KAUFMANN, S.H.E. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? **Nature-reviews** | **Immunology**, v. 1, 2001.

KAUFMANN, S.H.E. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and Macrophages. **Ann Rheum Dis.** v.61, (Suppl II)p. ii54–ii58, 2002.

KENNAWAY, C. K., BENESCH, J. L. P., GOHLKE, U., WANG, L., ROBINSON, C. V., ORLOVA, E. V., SAIBI, H. R.; KEEP, N. H. Dodecameric Structure of the Small Heat Shock Protein Acr1 from *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry** v. 280, n. 39, p. 33419–33425, 2005.

KLANN, A. G.; BELANGER, A. E.; ABANES-DE MELLO, A.; LEE, J. Y.; HATFULL, G F. Characterization of the *dnaG* locus in *Mycobacterium smegmatis* reveals linkage of DNA replication and cell division. Journal of bacteriology, v.180, n. 1, p. 65–72, 1998.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L. A. B.; NETEA, M. G.; VAN CREVEL, R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and developmental immunology**, 2011.

KOUL, A., HERGET, T., KLEBL, B.; ULLRICH, A. Interplay Between Mycobacteria and Host Signalling Pathways. **Nature Reviews** | **Microbiology.** v.2, 2004.

KREMER, L., MAUGHAN, W.N., WILSON, R.A., DOVER, L.G. ; BESRA, G.S. The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. Letters in Applied Microbiology. v.34, p.233–237, 2002.

KRITSKI, A.L.; CONDE, M.B.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: Do** ambulatório à Enfermaria. 3.ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

KRUH, N. A.; BORGARO, J. G.; RUZSICSKA, B. P.; XU, H.; TONGE, P. J. Novel interaction linking the FAS-II and Phthiocerol Dimycocerosate (PDIM) biosynthetic pathways. **J Biol Chem**, v.283, n.46, p.31719–31725, 2008. LAVOLLAY, M.; ARTHUR, M.; FOURGEAUD, M.; DUBOST, L.; MARIE, A.; VEZIRIS, N.; BLANOT, D.; GUTMANN, L.; MAINARDI, J. The peptidoglycan of stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis* predominantly contains cross-links generated by L, D-Transpeptidation. **Journal of bacteriology**, v.190, n.12, p. 4360–4366, 2008.

LAZAREVIC, V.; MARTINON, F. Linking Inflammasome Activation and Phagosome Maturation. **Cell host; microbe**, 2008.

LEE, J., HARTMAN, M.; KORNFELD, H. Macrophage Apoptosis in Tuberculosis. **Yonsei Med J.** v.50, n.1, p.1 - 11, 2009.

LEE, J.H., KARAKOUSIS, P. C.; BISHAI, W. R. Roles of SigB and SigF in the *Mycobacterium tuberculosis* Sigma Factor Network. **Journal of Bacteriology.** v. 190, n. 2, p. 699–707, 2008.

LEE, J.; KIM, H. R.;QUINLEY, C.; KIM, J.; GONZALEZ-NAVAJAS, J.; XAVIER, R.; RAZ, E. Autophagy suppresses Interleukin-1β (IL-1β) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.4033-4040, 2011.

LILLEBAEK, T., DIRKSEN, A., BAESS, I., STRUNGE, B., THOMSEN, V.; ANDERSEN, A. B. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. **The Journal of Infectious Diseases.** v.185, n.3, p.401-404. 2002.

LIN, M. Y., GELUK, A., SMITH, S. G., STEWART, A. L. et al. Lack of Immune Responses to *Mycobacterium tuberculosis* DosR Regulon Proteins following *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination. **Infection and Immunity**. v. 75, n. 7, p. 3523–3530, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**. v.25, p.402–408, 2001.

LUCKNER, S.R. Towards the development of high affinity InhA and KasA inhibitors with activity against drug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis.* 2009. 89p. Doctoral thesis (doctoral degree at the Graduate School of Life Sciences) – Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, 2009.

MAITI, D.; BHATTACHARYYA, A.; BASU, J. Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* promotes macrophage survival by phosphorylating Bad through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt pathway. **The journal of biological chemistry**, v. 276, n.1, p. 329–333, 2001.

MALEN, H.; SOFTELAND, T.; WIKER, H. G. Antigen Analysis of Mycobacterium tuberculosis H37Rv Culture Filtrate Proteins. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.67, n. 3, p.245–252, 2007.

MANGANELLI, R., DUBNAU, E., TYAGI, S., KRAMER, F. R.; SMITH, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in Mycobacterium tuberculosis. **Molecular Microbiology**, v.31, n.2, p.715–724, 1999.

MANZANILLO, P. S.; SHILOH, M. U.; PORTNOY, D. A.; COX, J. S. *Mycobacterium tuberculosis* activates the DNA-dependent cytosolic surveillance pathway within macrophages. **Cell host; microbe**, v.11, p.469–480, 2012.

Marques, M. V. **Biolgia Molecular e Genética bacteriana.** Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. **TRENDS in immunology**, v.26 n.8, 2005.

MASTER, S. S.; RAMPINI, S. K.; DAVIS, A. S.; KELLER, C.; EHLERS, S.; SPRINGER, B.; TIMMINS, G. S.; SANDER, P.; DERETIC, V. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. **Cell host; microbe,** v.3, p.224–232, 2008.

MAWUENYEGA, K. G., FORST, C. V., DOBOS, K. M., BELISLE, J. T., CHEN, J., BRADBURY, E. M., BRADBURY, A. R. M.; CHEN, X. *Mycobacterium tuberculosis* Functional Network Analysis by Global Subcellular Protein Profiling. **Molecular Biology of the Cell.** v. 16, p.396–404, 2005.

MAYER-BARBER, K. D.; BARBER, D. L.; SHENDEROV, K.; WHITE, S. D.; WILSON, M.S.; CHEEVER, A.; KUGLER, D.; HIENY, S.; CASPAR, P.; NUNEZ, G.; SCHLUETER, D.; FLAVELL, R. A.; SUTTERWALA, F. S.; SHER, A. Caspase-1 independent il-1b production is critical for host resistance to *Mycobacterium tuberculosis* and does not require TLR signaling in vivo. **The Journal of Immunology**, v.184, p.3326–3330, 2010.

MCLAUGHLIN, B.; CHON, J. S.; MACGURN, J. A.; CARLSSON, F.; CHENG, T. L.; COX, J. S.; BROWN, E. J. A mycobacterium ESX-1–secreted virulence factor with unique requirements for export. **PLoS pathogens** v.3, n.8, 2007.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v.442, 2006.

MISHRA, B. B.; MOURA-ALVES, P.; SONAWANE, A.; HACOHEN, N.; GRIFFITHS, G.; MOITA, L. F.; ANES, E. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. **Cellular microbiology**, v.12, n.8, p. 1046–1063, 2010.

MONAHAN, I. M., BETTS, J., BANERJEE, D. K.; BUTCHER, P. D. Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology. v.*147, p.459–471, 2001.

NGUYEN, L, CHINNAPAPAGARI, S. ; THOMPSON, C.J. FbpA-Dependent Biosynthesis of Trehalose Dimycolate Is Required for the Intrinsic Multidrug Resistance, Cell Wall Structure, and Colonial Morphology of *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 19, p. 6603–6611, 2005.

NÍCHEALLAIGH, C.; KEANE, J.; LAVELLE, E. C.; HOPE, J. C.; HARRIS, J. Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives. **Clinical and Experimental Immunology**, v.164, p.291–300, 2011.

PAI, R. K., PENNINI, M. E., TOBIAN, A. A. R., CANADAY, D. H., BOOM, W. H.; HARDING, C. V. Prolonged Toll-Like Receptor Signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and Its 19-Kilodalton Lipoprotein Inhibits Gamma Interferon-Induced Regulation of Selected Genes in Macrophages. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 11, p. 6603–6614, 2004.

PARISH, T., TURNER, J.; STOKER, N. G. *amiA* is a negative regulator of acetamidase expression in *Mycobacterium smegmatis*. **BMC Microbiology**, v.1, n.19, 2001.

PARK, H-D., GUINN, K. M., HARRELL, M. I., LIAO, R., VOSKUIL, M. I., TOMPA, M., SCHOOLNIK, G. K.; SHERMA, D. R. Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. v.48, n.3, p. 833–843, 2003.

PATEL, D. M.; PATEL, S. D.; JAISWAL, P. S.; BRAHMBHATT, K. J. Drug resistant *Mycobacterium tuberculosis* and new drug development. **International journal of drug development; research,** v.4, n.2, 2012.

PICON, P. D., BASSANESI, S. L., CARAMORI, M. L. A., FERREIRA, R. L. T., JARCZEWSKI, C. A.; VIEIRA, P. R. B. Fatores de risco para a recidiva da tuberculose. **J Bras Pneumol.** v.33, n.5, p.572-578, 2007.

PIETERS, J. *Mycobacterium tuberculosis* and the Macrophage: Maintaining a Balance. **Cell Host; Microbe.** v.3, 2008.

PRENETA, R., PAPAVINASASUNDARAM, K. G., COZZONE, A. J.; DUCLOS, B. Autophosphorylation of the 16 kDa and 70 kDa antigens (Hsp 16.3 and Hsp 70) of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**, v.150, p.2135–2141, 2004.

PUECH, V., GUILHOT, C., PEREZ, E., TROPIS, M., ARMITIGE, L. Y., GICQUEL, B.; DAFFÉ, M. Evidence for a partial redundancy of the fibronectinbinding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology.** v.44, n.4, p.1109–1122, 2002.

RABAHI, M. F., JUNQUEIRA-KIPNIS, A. P., REIS, M. C. G., OELEMANN, W.; CONDE, M. B. Humoral response to HspX and GlcB to previous and recent infection by *Mycobacterium tuberculosis*. **BMC Infect Dis.** v.7, p.148. 2007.

RAFIDINARIVO, E.; LANÉELLE, M.; MONTROZIER, H.; VALERO-GUILLÉN, P.; ASTOLA, J.; LUQUIN, M.; PROMÉ, J.; DAFFÉ, M. Trafficking pathways of mycolic acids: structures, origin, mechanism of formation, and storage form of mycobacteric acids. **Lipid Res**, v.50, p.477–490, 2009.

RAGHUNAND, T.R; BISHAI, W.R. *Mycobacterium smegmatis whm*D and its homologue *Mycobacterium tuberculosis whi*B2 are functionally equivalent. **Microbiology**, v. 152, p.2735–2747, 2006.

RETZLAFF, C.; YAMAMOTO, Y.; HOFFMAN, P. S.; FRIEDMAN, H.; KLEIN, T. W. Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and Interleukin-1 secretion in macrophage cultures. **Infection and immunity**, v.62, n.12, p. 5689-5693, 1994.

RIBEIRO, F.K.C. Avaliação do crescimento de poucas colônias de Mycobacterium tuberculosis em meio de cultura sólido como indicador de contaminação cruzada, utilizando técnicas de tipagem Molecular. 2006. 97p. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Programa de Pósgraduação em Doenças Infecciosa, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

RIDER, P.; CARMI, Y.; GUTTMAN, O.; BRAIMAN, A.; COHEN, I.; VORONOV, E.; WHITE, M. R.; DINARELLO, C. A.; APTE, R. N. IL-1a and IL-1b recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. **The Journal of immunology**, v.184: p.3326–3330, 2011.

ROBERTS, G., MUTTUCUMARU, D. G. N.; PARISH, T. Control of the acetamidase gene of *Mycobacterium smegmatis* by multiple regulators. **FEMS Microbiology Letters**. v.221, p.131-136, 2003.

RODRIGUE, S., PROVVEDI, R., JACQUES, P. GAUDREAU, L.; MANGANELLI, R. The σ factors of *Mycobacterium tuberculosis*. **FEMS Microbiol Rev.** v.30, p.926–941, 2006.

ROY, S.; ANAND, D.; VIJAY, S.; GUPTA, P.; AJITKUMAR, P. The *ftsZ* gene of *Mycobacterium smegmatis* is expressed through multiple transcripts. **The open microbiology journal**, v.5, p.43-53, 2011.

RYFFEL, B.; FREMOND, C.; JACOBS, M.; PARIDA, S.; BOTHA, T.; SCHNYDER, B.; QUESNIAUX, V . Innate immunity to mycobacterial infection in mice: Critical role for toll-like receptors. **Tuberculosis**, v.85, n.5–6, p.395–405, 2005.

SACHDEVA, P., MISRA, R., TYAGI, A. K.; SINGH, Y. The sigma factors of Mycobacterium tuberculosis: regulation of the regulators. **FEBS Journal.** v.277, p.605–626, 2010.

SAINI, D. K., MALHOTRA, V., DEY, D., PANT, N., DAS, T. K.; TYAGI, J. S. DevR–DevS is a bona fide two-component system of Mycobacterium tuberculosis that is hypoxia-responsive in the absence of the DNA-binding domain of DevR. **Microbiology**. v.150, p.865–875, 2004. SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning:** a laboratory manual.

3.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHAEFFER, M. L.; AGNIHOTRI, G.; VOLKER, C.; KALLENDER, H.; BRENNAN, P. J.; LONSDALE, J. T. Purification and biochemical characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* β -Ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB. **The journal of biological chemistry**, v.276, n.50, p.47029–47037, 2001.

SCHLESINGER, L. S., AZAD, A. K., TORRELLES, J. B., ROBERTS, E., VERGNE, I.; DERETIC, V. Determinants of Phagocytosis, Phagosome Biogenesis and Autophagy for *Mycobacterium tuberculosis*. **Handbook of Tuberculosis: Immunology and Cell Biology.** 2008.

SCHNAPPINGER, D., EHRT, S., VOSKUIL, M. I., LIU, Y., MANGAN, J. A., MONAHAN, I. M., DOLGANOV, G., EFRON, B., BUTCHER, P. D., NATHAN, C.; SCHOOLNIK, G. K. Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment. J. **Exp. Med.** v.198, n.5, p.693–704, 2003.

SENOL, G., ERER, O.F., YALCIN, Y.A., COSKUN, M., GUNDUZ, A. T., BICMEN, C., ERTAS, M.; OZKAN, S. A. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. **Eur Respir J.** v.29, n.1, p.143-148. 2007.

SHERMAN, D. R., VOSKUIL, M., SCHNAPPINGER, D., LIAO, R., HARRELL, M. I.; SCHOOLNIK, G. K. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding α -crystallin. **PNAS.** v.98, n.13, p.7534–7539, 2001.

SHI, C., CHE, L., CHEN, Z., ZHANG, Y., ZHOU, Z., LU, J., FU, R., WANG, C., FANG, Z.; FAN, V. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing HspX protein. **Vaccine**, v.28, n.32, p.5237-44, 2010.

SHI, L.; NORTH, R.; GENNARO, M. L. Effect of Growth State on Transcription Levels of Genes Encoding Major Secreted Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in the Mouse Lung. **Infection and Immunity**, v.72, n. 4, p. 2420–2424, Apr. 2004.

SHIA, L.; SOHASKEYB, C. D.; PFEIFFERA, C.; DATTAA, P.; PARKSA, M.; MCFADDENC, J.; NORTHD, R. J.; GENNAROA, M. L. Carbon flux rerouting

during *Mycobacterium tuberculosis* growth arrest. **Mol microbiol**, v.78, n.5, p.1199–1215, 2010.

SHLEEVA, M. O., KUDYKINA, Y. K., VOSTROKNUTOVA, G. N., SUZINA, N. E., MULYUKIN, A. L.; KAPRELYANTS, A. S. Dormant ovoid cells of *Mycobacterium tuberculosis* are formed in response to gradual external acidification. **Tuberculosis.** v.91, p.146-154, 2011.

SINGH, S. B.; DAVIS, A. S.; TAYLOR, G. A.; DERETIC, V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. **Science**, v. 313, 2006.

SINGH, S. B.; ORNATOWSKI, W.; VERGNE, I.; NAYLOR, J.; DELGADO, M.; ROBERTS, E.; PONPUAK, M.; MASTER, S.; PILLI, M.; WHITE, E.; KOMATSU, M.; DERETIC, V. Human IRGM regulates autophagy and cell- autonomous immunity functions through mitochondria. **Nature cell biology**, v.12, n.12, 2010.

SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis*: pathogenesis and molecular determinants of virulence. **Clin Microbiol Rev.** v.16, n.3, p. 463-496. 2003. SONGANE, M.; KLEINNIJENHUIS, J.; NETEA, M. G.; VAN CREVEL, R. The role of autophagy in host defence against *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Tuberculosis**, n. 92, 2012.

SPRATT, J.M.; BRITTON, W.J.; TRICCAS, J.A. In vivo persistence and protective efficacy of the bacille Calmette Guerin vaccine overexpressing the HspX latency antigen. **Bioengineered Bugs**, v.1, n.1, p.61-65, 2010.

STARCK, J.; KALLENIUS, G.; MARKLUND, B.; ANDERSSON, D. I.; AKERLUND, T. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* grown under aerobic and anaerobic conditions. **Microbiology**, v.150, p.3821–3829, 2004.

SWANSON, S.; GOKULAN, K.; SACCHETTINI. J. C. KasA, another brick in the mycobacterial cell wall. **Structure**, n. 17, 2009.

TEODORO, P.H. **Caracterização biológicas das proteínas LipL32 e HlyX de** *Leptospira interrogans* **sorovar** Copenhageni. 2009. 166p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. 2009.

TODA, Y.; TSUKADA, J.; MISAGO, M.; KOMINATO, Y.; AURON, P. E.; TANAKA, Y. Autocrine induction of the human Pro-IL-1b gene promoter by IL-1b in monocytes. **The journal of immunology**, v.168, p.1984–1991, 2002.

TORRELLES, J. B.; DESJARDIN, L. E.; MACNEIL, J.; KAUFMAN, T. M.; KUTZBACH, B.; KNAUP, R.; MCCARTHY, T. R.; GURCHA, S. S.; BESRA, G. S.; CLEGG, S.; SCHLESINGER, L. S. Inactivation of *Mycobacterium tuberculosis* mannosyltransferase *pimB* reduces the cell wall

lipoarabinomannan and lipomannan content and increases the rate of bacterialinduced human macrophage cell death. **Glycobiology**, v.19, n.7, p.743–755, 2009.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia.** 6.ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000.

TRAAGA, B. A., DRIKSB, A., STRAGIERC, P., BITTERD, W., BROUSSARDE, G., HATFULLE, G., CHUF, F., ADAMSF, K. N., RAMAKRISHNANF, L.; LOSICKA, R. Do mycobacteria produce endospores? **PNAS Early Edition**, 2009.

TRAVASSOS, L. H.; CARNEIRO, L. A. M.; RAMJEET, M.; HUSSEY, S.; KIM, Y.; MAGALHÃES, J. G.; YUAN, L.; SOARES, F.; CHEA, E.; BOURHIS, L. L. E.; BONECA, I. G.; ALLAOUI, A.; JONES, N. L.; NUÑEZ, G.; GIRARDIN, S. E.; PHILPOTT, D. J. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. **Nature immunology**, v.11, n.1, 2010.

TUDÓ, G., LAING, K., MITCHISON, D. A., BUTCHER, P. D.; WADDELL, S. J. Examining the basis of isoniazid tolerance in nonreplicating Mycobacterium *tuberculosis* using transcriptional profiling. **Future Med Chem.** v.2, n.8, p.1371-83, 2010.

VALDEZ, M. M., CLARK, J. I., WU, G. J. S.; MUCHOWSKI, P. J. Functional similarities between the small heat shock proteins Mycobacterium tuberculosis HSP 16.3 and human aB-crystallin. **Eur. J. Biochem.** v.269, p.1806-1813, 2002.

VELAYATI, A. A., FARNIA, P., MASJEDI, M. R., ZHAVNERKO, G. K., MERZA, M. A., GHANAVI, J., TABARSI, P., FARNIA, P., POLESCHUYK, N. N.; IGNATYEV, G. Sequential adaptation in latent tuberculosis bacilli: observation by atomic force microscopy (AFM). Int J Clin Exp Med. v.4, n.3, p.193-199, 2011.

VERBON, A., HARTSKEERL, R. A., SCHUITEMA, A., KOLK, A. H. J., YOUNG, V; LATHIGRA, R. The 14,000-Molecular-Weight Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* Is Related to the Alpha-Crystallin Family of Low-Molecular-Weight Heat Shock Proteins. **Journal of Bacteriology**. v.174, n. 4, p. 1352-1359, 1992.

VOLPE, E., CAPPELLI, G., GRASSI, M., MARTINO, A., SERAFINO, A., COLIZZI, V., SANARICO, N.; MARIANI, F. Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with Mycobacterium tuberculosis. **Immunology**. v.118, p. 449–460, 2006.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Global tuberculosis report**, WHO, 2012.

WILKINSON, R. J., WILKINSON, K. A., DE SMET, K. A. L., HASLOV, K., PASVOL, G., SINGH, M., SVARCOVA, I. ; IVANYI, J. Human T- and B-Cell Reactivity to the 16 kDa α-Crystallin Protein of *Mycobacterium tuberculosis. Scand. J. Immunol. v.*48, p.403–409, 1998.

WILLIAMS, E. P., LEE, J-H., BISHAI, W. R., COLANTUONI, C.; KARAKOUSIS, P. C. *Mycobacterium tuberculosis* SigF Regulates Genes Encoding Cell Wall-Associated Proteins and Directly Regulates the Transcriptional Regulatory Gene *phoY1*. Journal of Bacteriology. v. 189, n. 11, p. 4234–4242, 2007.

WU, X., YANG, Y., ZHANG, J., LI, B., LIANG, Y., ZHANG, C.; DONG, M. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis. **Clinica Chimica Acta**. v.411, p.1520–1528, 2010.

YANG, H., HUANG, S., DAI, H. Z., GONG, Y., ZHENG, C.; CHANG, Z. The *Mycobacterium tuberculosis* small heat shock protein Hsp16.3 exposes hydrophobic surfaces at mild conditions: Conformational flexibility and molecular chaperone activity. *Protein Science*, v.8, p.174–179, 1999.

YANG, Y.; YIN, C.; PANDEY, A.; ABBOTT, D.; SASSETTI, C.; KELLIHER, M. A. NOD2 pathway activation by MDP or *Mycobacterium tuberculosis* infection involves the stable polyubiquitination of Rip2. **The journal of biological chemistry**, v.282, n.50, p.36223–36229, 2007.

YUAN, Y., CRANE, D. D.; BARRY, C. E. Stationary Phase-Associated Protein Expression in *Mycobacterium tuberculosis*: Function of the Mycobacterial α-Crystallin Homolog. **Journal of Bacteriology**. v. 178, n. 15, p.4484–4492, 1996.

YUAN, Y., CRANE, D. D., SIMPSON, R. M., ZHU, Y. A., HICKEY, DAVID, M. J., SHERMAN, R.; BARRY, C. E. The 16-kDa α-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. **Microbiology**. v. 95, p. 9578–9583, 1998.

ZHANG, J.; JIANG, R.; TAKAYAMA, H.; TANAKA, Y. 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. Persistent and Dormant Tubercle Bacilli and Latent Tuberculosis. **Frontiers in Bioscience.** v.9, p.1136-1156, 2004.

ZULLO, A. J.; LEE, S. Mycobacterial induction of autophagy varies by species and occurs independently of mTOR inhibition. **The journal of biological chemistry**, v.287, p.12668-12678, 2012.

#ANEXOS
Tabela A1: Valores de expressão do mRNA do gene *ftsZ* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

$\begin{array}{ c c c c c c c c }\hline & Controle (1) & 1 & & & & & & & & & & & & & & & & &$	Tempo pós Indução	р	Média ± Desvio padrão
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $			1 00 + 0 00
$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	Obc	> 0,05	1,00 ± 0,00
$\begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	0113		1 075 + 0 23
Controle (1) 1 1,00 ± 0,00 < 0,05 3hs MS::HspX (1) 0,04 0.27 ± 0.47 < 0,05			1,075 ± 0,25
Shs Controle (2) 1 1,00 ± 0,00 < 0,05 MS::HspX (1) 0,04 0.27 ± 0.47 < 0,05			1 00 + 0 00
MS::HspX (1) 0,04 0.27 ± 0.47	2hc	< 0,05	1,00 ± 0,00
	3115		0.27 ± 0.47
MS::HspX (2) 0,70 0,37 ± 0,47			0,37 ± 0,47
Controle (1) 1 1 00 + 0.00			- 1,00 ± 0,00
Controle (2) 1 1,00 ± 0,00 < 0,05	6bc	< 0,05	
MS::HspX (1) 0,02 0,025 + 0,20	0115		0.005 + 0.00
MS::HspX (2) 0,43 0,225 ± 0,29			0,225 ± 0,29
Controle (1) 1 1 00 + 0.00			1 00 + 0 00
Controle (2) 1 $1,00 \pm 0,00$ < 0.05	04ba	< 0.05	$1,00 \pm 0,00$
MS::HspX (1) 0,15 0.28 + 0.18	24115	1	0.09 ± 0.19
MS::HspX (2) 0,41 0,28 ± 0,18			0,20 ± 0,10
Controle (1) 1 1 00 + 0.00			1.00 ± 0.00
Controle (2) 1 1,00 ± 0,00 < 0.01		< 0,01	$1,00 \pm 0,00$
4011S MS::HspX (1) 0,01 0.025 + 0.04	40115	1	0.025 ± 0.04
MS::HspX (2) 0,06 0,035 ± 0,04			0,030 ± 0,04

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,26	0.49 ± 0.21	> 0,05
	MS::HspX (2)	0,70	0,40 ± 0,31	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	- 0.001
305	MS::HspX (1)	1,87	2,26 ± 0,55	< 0,001
	MS::HspX (2)	2,65		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	> 0,05
6bc	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	0,95	0.74 ± 0.20	
	MS::HspX (2)	0,54	0,74 ± 0,29	
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.01
24115	MS::HspX (1)	0,08	0.06 ± 0.02	< 0,01
	MS::HspX (2)	0,04	$0,06 \pm 0,03$	
10h-	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.01
40115	MS::HspX (1)	0,06	0.04 ± 0.02	< 0,01
	MS::HspX (2)	0,02	$0,04 \pm 0,03$	

Tabela A2: Valores de expressão do mRNA do gene *dnaA* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00		
Obc	Controle (2)	1		< 0.001	
0115	MS::HspX (1)	0,30	0.44 ± 0.20	< 0,001	
	MS::HspX (2)	0,59	0,44 ± 0,20		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	- 0.001	
305	MS::HspX (1)	2,34	2,43 ± 0,13	< 0,001	
	MS::HspX (2)	2,52			
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	- < 0,001	
6ho	Controle (2)	1			
0115	MS::HspX (1)	0,53	0.49 ± 0.07		
	MS::HspX (2)	0,43	0,40 ± 0,07		
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00		
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	- 0.001	
2405	MS::HspX (1)	0,06	0.04 ± 0.02	< 0,001	
	MS::HspX (2)	0,03	0,04 ± 0,02		
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00		
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$.0.001	
40115	MS::HspX (1)	0,05	0.04 ± 0.01	< 0,001	
	MS::HspX (2)	0,04	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	

Tabela A3: Valores de expressão do mRNA do gene *dnaG* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,38	0 60 ± 0 20	>0,05
	MS::HspX (2)	0,81	0,00 ± 0,30	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.05
3115	MS::HspX (1)	1,48	2,02 ± 0,76	<0,05
	MS::HspX (2)	2,56		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	>0,05
6ho	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	0,52	0,36 ± 0,23	
	MS::HspX (2)	0,20		
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05
2405	MS::HspX (1)	0,08	0.06 ± 0.02	<0,05
	MS::HspX (2)	0,05	0,06 ± 0,02	
406-	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05
40115	MS::HspX (1)	0,11	0.06 ± 0.06	<0,00
	MS::HspX (2)	0,02	0,06 ± 0,06	

Tabela A4: Valores de expressão do mRNA do gene *whmD* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		-0.01
0115	MS::HspX (1)	0,11	0.15 ± 0.06	<0,01
	MS::HspX (2)	0,19	0,15 ± 0,00	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$.0.05
3115	MS::HspX (1)	0,63	0.57 + 0.00	>0,05
	MS::HspX (2)	0,51	$0,57 \pm 0,08$	
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	>0,05
6bc	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	1,53	1 12 + 0 57	
	MS::HspX (2)	0,73	1,13 ± 0,57	
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	0.001
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	
2405	MS::HspX (1)	2,47	0.04 ± 0.19	<0,001
	MS::HspX (2)	2,22	2,34 ± 0,10	
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.05
40115	MS::HspX (1)	0,16	0.26 ± 0.14	<0,05
	MS::HspX (2)	0,36	0,26 ± 0,14	: 0,14

Tabela A5: Valores de expressão do mRNA do gene *kasA* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,24	0.38 ± 0.10	>0.05
	MS::HspX (2)	0,51	0,30 ± 0,19	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.001
305	MS::HspX (1)	4,12	4,91 ± 1,12	<0,001
	MS::HspX (2)	5,70		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	- >0.05
Cho	Controle (2)	1		
ons	MS::HspX (1)	0,34	0,63 ± 0,41	
	MS::HspX (2)	0,92		
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	0.05
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	
24115	MS::HspX (1)	1,21	1.00 ± 0.10	>0.05
	MS::HspX (2)	1,38	1,29 ± 0,12	
405 -	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	. 0.05
4805	MS::HspX (1)	0,18	0.17 + 0.01	>0.05
	MS::HspX (2)	0,16	$0,17 \pm 0,01$	

Tabela A6: Valores de expressão do mRNA do gene *kasB* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,49	0.60 ± 0.16	>0,05
	MS::HspX (2)	0,72	$0,00 \pm 0,10$	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.001
305	MS::HspX (1)	2,05	2,32 ± 0,38	<0,001
	MS::HspX (2)	2,59		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	- >0,05
Cho	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	0,64	0,59 ± 0,07	
	MS::HspX (2)	0,54		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	.0.001
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	
24115	MS::HspX (1)	0,08	0.06 ± 0.04	<0,001
	MS::HspX (2)	0,03	0,06 ± 0,04	
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.001
40/IS	MS::HspX (1)	0,08	0.06 ± 0.02	<0,001
	MS::HspX (2)	0,04	$0,06 \pm 0,03$	

Tabela A7: Valores de expressão do mRNA do gene *pbpA* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,33	0.52 ± 0.27	>0,05
	MS::HspX (2)	0,71	0,52 ± 0,27	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.001
305	MS::HspX (1)	2,65	3,48 ± 1,17	<0,001
	MS::HspX (2)	4,31		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	>0,05
6ho	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	0,86	0,58 ± 0,40	
	MS::HspX (2)	0,30		
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05
2405	MS::HspX (1)	0,05	0.025 ± 0.02	>0,05
	MS::HspX (2)	0,02	$0,035 \pm 0,02$	
405-	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.05
40115	MS::HspX (1)	0,11	0.06 ± 0.09	>0,00
	MS::HspX (2)	0,00	$0,06 \pm 0,08$	

Tabela A8: Valores de expressão do mRNA do gene *murB* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	6,42	0.79 ± 4.75	>0,05
	MS::HspX (2)	13,14	9,70 ± 4,75	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.001
3115	MS::HspX (1)	33,94	47 44 + 10 09	<0,001
	MS::HspX (2)	60,93	47,44 ± 19,00	
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	>0,05
Cho	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	7,59	4 00 ± 2 04	
	MS::HspX (2)	2,16	4,00 ± 3,04	
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$.0.05
24NS	MS::HspX (1)	1,72	5.04 ± 4.70	>0,05
	MS::HspX (2)	8,36	5,04 ± 4,70	
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.05
40115	MS::HspX (1)	1,06	0.56 ± 0.70	>0,05
	MS::HspX (2)	0,07	$0,56 \pm 0,70$	

Tabela A9: Valores de expressão do mRNA do gene *murC* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
Obc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05
0115	MS::HspX (1)	4,49	2 99 + 2 29	>0,05
	MS::HspX (2)	1,26	2,00 ± 2,20	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.05
305	MS::HspX (1)	3,18	14,82 ± 13,17	<0,05
	MS::HspX (2)	4,36		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	>0,05
6ho	Controle (2)	1		
0115	MS::HspX (1)	3,18	3,77 ± 0,83	
	MS::HspX (2)	4,36		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	0.05
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	
24115	MS::HspX (1)	1,87	1 00 + 0 01	>0,05
	MS::HspX (2)	1,89	1,00 ± 0,01	
40ha	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.05
40115	MS::HspX (1)	0,46	0.20 ± 0.02	>0,00
	MS::HspX (2)	0,13	$0,30 \pm 0,23$	

Tabela A10: Valores de expressão do mRNA do gene *murE* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00		
Obc	Controle (2)	1		> 0.05	
0115	MS::HspX (1)	1,66	1 99 + 1 55	>0,05	
	MS::HspX (2)	8,09	4,00 ± 4,00		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
She	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.01	
3115	MS::HspX (1)	13,97	26.42 ± 17.61	<0,01	
	MS::HspX (2)	38,87	20,42 ± 17,01		
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	>0.05	
6ho	Controle (2)	1			
0115	MS::HspX (1)	10,97	- 8,98 ± 2,81	20,00	
	MS::HspX (2)	6,99			
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00		
24bc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
24115	MS::HspX (1)	0,40	0.01 + 0.09	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,01	0,21±0,20		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05	
40115	MS::HspX (1)	0,75	0.29 ± 0.52	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,01	$0,38 \pm 0,52$	$0,38 \pm 0,52$	

Tabela A11: Valores de expressão do mRNA do gene *murF* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle (1)	1	- 1,00 ± 0,00	
Obc	Controle (2)	1		> 0.05
0115	MS::HspX (1)	0,36	0.40 ± 0.06	>0,05
	MS::HspX (2)	0,44	0,40 ± 0,00	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00	
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.001
3115	MS::HspX (1)	2,90	2,78 ± 0,17	<0,001
	MS::HspX (2)	2,66		
	Controle (1)	1	1,00 ± 0,00	~0.001
Cho	Controle (2)	1		
ONS	MS::HspX (1)	2,46	3,08 ± 0,88	<0,001
	MS::HspX (2)	3,71		
	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	0.05
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	
24NS	MS::HspX (1)	0,47	0.04 + 0.10	>0,05
	MS::HspX (2)	0,21	$0,34 \pm 0,18$	
405 -	Controle (1)	1	1 00 1 0 00	
	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.05
40115	MS::HspX (1)	0,05	0.00 + 0.00	>0,05
	MS::HspX (2)	0,13	$0,09 \pm 0,06$	j

Tabela A12: Valores de expressão do mRNA do gene *murG* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Obc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,97	1 29 + 0 42	>0,05	
	MS::HspX (2)	1,58	1,20 ± 0,43		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
3115	MS::HspX (1)	0,51	1 00 + 0 70	>0,05	
	MS::HspX (2)	1,50	$1,00 \pm 0,70$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
6ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$.0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,24	0.62 ± 0.54	>0,05	
	MS::HspX (2)	1,00	$0,02 \pm 0,04$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$.0.05	
24115	MS::HspX (1)	2,01	1 74 + 0 29	>0,05	
	MS::HspX (2)	1,48	1,74 ± 0,30		
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00		
10h a	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05	
40115	MS::HspX (1)	0,11	0.12 ± 0.02	>0,00	
	MS::HspX (2)	0,14	U, I Z I U, U Z		

Tabela A13: Valores de expressão do mRNA do gene *embA* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Obs	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	<0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,21	0.22 ± 0.16	<0,05	
	MS::HspX (2)	0,43	0,32 ± 0,10		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
3115	MS::HspX (1)	0,57	0.00 + 0.10	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,79	$0,08 \pm 0,16$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
6ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,20	0.42 ± 0.20	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,63	$0,42 \pm 0,30$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
24115	MS::HspX (1)	0,31	0.65 ± 0.49	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,99	0,00 ± 0,40		
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00	0.01	
401	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$		
4011S	MS::HspX (1)	0,15	0.16 ± 0.01	<0,01	
	MS::HspX (2)	0,16	$0,10\pm0,01$		

Tabela A14: Valores de expressão do mRNA do gene *embB* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Obc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,13	0.20 ± 0.22	<0,05	
	MS::HspX (2)	0,46	0,30 ± 0,23		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05	
3115	MS::HspX (1)	0,66	0.60 ± 0.04	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,72	0,09 ± 0,04		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Cho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$. 0.05	
ONS	MS::HspX (1)	0,21	0.44 ± 0.22	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,68	$0,44 \pm 0,33$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	-0.01	
24115	MS::HspX (1)	2,18	1.96 ± 0.46	<0,01	
	MS::HspX (2)	1,53	1,00 ± 0,40		
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00		
48hs	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.01	
	MS::HspX (1)	0,18	0.16 ± 0.02	<0,01	
	MS::HspX (2)	0,15	$0,16 \pm 0,02$		

Tabela A15: Valores de expressão do mRNA do gene *embC* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra 2- ^{∆∆Ct}		Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Oha	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
0115	MS::HspX (1)	1,75	1 10 + 0 01	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,61	1,10 ± 0,01		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2ho	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
3115	MS::HspX (1)	1,25	1.06 ± 0.09	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,86	1,00 ± 0,20		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
6bc	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,21	0.42 ± 0.20	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,63	$0,42 \pm 0,30$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
04ba	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	× 0.05	
24115	MS::HspX (1)	0,37	0.24 ± 0.04	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,31	$0,34 \pm 0,04$		
	Controle (1)	1	1.00 ± 0.00		
401	Controle (2)	1	$1,00 \pm 0,00$	0.05	
40115	MS::HspX (1)	0,13	0.07 ± 0.02	<0,05	
	MS::HspX (2)	0,01	$0,07 \pm 0,08$		

Tabela A16: Valores de expressão do mRNA do gene *sigF* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Obo	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	>0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,39	0.54 ± 0.22	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,70	0,54 ± 0,22		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
She	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.001	
0115	MS::HspX (1)	3,12	2 96 + 0 26	<0,001	
	MS::HspX (2)	2,61	2,00 ± 0,30		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
6bc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,77	0.46 ± 0.44	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,14	0,40 ± 0,44		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
04ba	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.01	
24115	MS::HspX (1)	0,10	0.06+0.06	<0,01	
	MS::HspX (2)	0,02	0,00±0,00		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
10ha	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.01	
40115	MS::HspX (1)	0,06	0.04 ± 0.02	<0,01	
	MS::HspX (2)	0,02	0,04 ± 0,03		

Tabela A17: Valores de expressão do mRNA do gene *fbpA* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo pós Indução	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
Obc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	>0.05	
0115	MS::HspX (1)	1,74	1 18 + 0 78	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,63	1,10 ± 0,70		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
2hc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	-0.01	
3115	MS::HspX (1)	4,19	6 79 + 2 66	<0,01	
	MS::HspX (2)	9,36	0,70 ± 3,00		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
6bc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
0115	MS::HspX (1)	0,47	0.45 ± 0.02	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,43	0,45 ± 0,05		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
24bc	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	> 0.05	
24115	MS::HspX (1)	0,11	0.00 ± 0.02	>0,05	
	MS::HspX (2)	0,07	$0,09 \pm 0,03$		
	Controle (1)	1	1 00 + 0 00		
10h a	Controle (2)	1	1,00 ± 0,00	0.05	
40115	MS::HspX (1)	0,16	0.09 ±0.11	- >0,05	
	MS::HspX (2)	0,00	0,00 ±0,11		

Tabela A18: Valores de expressão do mRNA do gene *pimB* em *M. smegmatis,* expressando e não expressando a proteína HspX.

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle 1	1			(Controle 1	1			
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0		
	Controle 3	1				Controle 3	1			
	MS 1	0,88		. 0.05		MS 1	1,49		. 0.05	
3hs	MS 2	0,73	0,89 ± 0,17	>0.05	24hs	MS 2	0,63	0,89 ± 0,52	>0.05	
	MS 3	1,07				MS 3	0,55			
	MS::HspX 1	1,17	0,82 ± 0,36	0,82 ± 0,36		MS::HspX 1	1,1	1,12 ± 0,13		
	MS::HspX 2	0,82				MS::HspX 2	1,26			
	MS::HspX 3	0,46				MS::HspX 3	1,0			
	Controle 1	1					Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0		
	Controle 3	1				Controle 3	1			
	MS 1	0,55		. 0.05		MS 1	1,85		. 0.05	
6hs	MS 2	0,63	0,50 ± 0,17	>0.05	48hs	MS 2	1,12	1,23 ± 0,57	>0.05	
	MS 3	0,31	-))			MS 3	0,73	3 5 2 4 1,44 ± 0,46		
-	MS::HspX 1	0,46	0,48 ± 0,18			MS::HspX 1	1,85			
	MS::HspX 2	0,67				MS::HspX 2	1,52			
	MS::HspX 3	0,31				MS::HspX 3	0,94			

Tabela A19: Valores de expressão do mRNA do gene IL10 em macrófagos infectados com M. smegmatis

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,33		.0.05		MS 1	0,55		5 O OF
3hs	MS 2	0,64	$0,78 \pm 0,50$	>0.05	24hs	MS 2	0,35	0,38 ± 0,16	>0.05
	MS 3	0,36				MS 3	0,24		-
	MS::HspX 1	1,84	0,95 ± 0,79			MS::HspX 1	0,72	0,57 ± 0,22	
	MS::HspX 2	0,71				MS::HspX 2	0,67		
	MS::HspX 3	0,31				MS::HspX 3	0,31		
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,18		.0.05		MS 1	0,16	0,21 ± 0,08	5 O OF
6hs	MS 2	0,57	0,70 ± 0,43	>0,05	48hs	MS 2	0,17		>0.05
	MS 3	0,34				MS 3	0,31		
	MS::HspX 1	1,47			N	MS::HspX 1	0,57		1
	MS::HspX 2	0,91	1,05 ± 0,37			MS::HspX 2	0,41	0,38 ± 0,21	
	MS::HspX 3	0,77				MS::HspX 3	0,16		

Tabela A20: Valores de expressão do mRNA do gene TNFA em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	Р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,20				MS 1	1,02		
3hs	MS 2	1,44	1,09 ± 0,41	>0,05	24hs	MS 2	1,44	0,96 ± 0,51	>0,05
	MS 3	0,64				MS 3	0,42	1 1	
	MS::HspX 1	1,4	1,24 ± 0,54			MS::HspX 1	1,24	1,17 ± 0,44	
	MS::HspX 2	1,68				MS::HspX 2	1,56		
	MS::HspX 3	0,64				MS::HspX 3	0,70		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,88				MS 1	1,33		<0.05°
6hs	MS 2	1,80	1,27 ± 0,47	>0,05	48hs	MS 2	1,58	1,44 ± 0,13	<0,05
	MS 3	1,14				MS 3	1,40		<0,001
	MS::HspX 1	1,07	1,47 ± 0,38			MS::HspX 1	2,53	53 35 10 2,33 ± 0,22	
-	MS::HspX 2	1,51				MS::HspX 2	2,35		
	MS::HspX 3	1,83				MS::HspX 3	2,10		

Tabela A21: Valores de expressão do mRNA do gene IL8 em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Legenda: **Controle** = Macrófago não infectado; **MS** = Macrófago infectado com *M. smegmatis* mc²155; **MS::HspX** = Macrófago infectado com *M. smegmatis* contendo o vetor recombinante pFPCA1::hspX. (#) = Tempo pós infecção. ^b = Controle vs MS::HspX ^c = MS vs MS::HspX

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	
	Controle 1	1				Controle 1	1			
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0		
	Controle 3	1				Controle 3	1			
	MS 1	0,83				MS 1	0,82			
3hs	MS 2	0,52	0,61 ± 0,19	>0,05	24hs	MS 2	0,91	0,7 ± 0,29	>0,05	
	MS 3	0,48				MS 3	0,37		-	
	MS::HspX 1	0,75	0,59 ± 0,24			MS::HspX 1	1,21	0,97 ± 0,39		
	MS::HspX 2	0,71				MS::HspX 2	1,17			
	MS::HspX 3	0,32				MS::HspX 3	0,52			
	Controle 1	1					Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0		
	Controle 3	1				Controle 3	1]		
	MS 1	0,66				MS 1	0,71		<0.05 ^b	
6hs	MS 2	0,68	0,6 ± 0,12	>0,05	48hs	MS 2	0,77	0,67 ± 0,12	<0,05	
	MS 3	0,48				MS 3	0,54		<0,01°	
	MS::HspX 1	0,88				MS::HspX 1	2,33			
	MS::HspX 2	1,14	0,93 ± 0,19			MS::HspX 2	1,91	1,67 ± 0,81		
	MS::HspX 3	0,77				MS::HspX 3	0,76			

Tabela A22: Valores de expressão do mRNA do gene IL1B em macrófagos infectados com M. smegmatis

Legenda: **Controle** = Macrófago não infectado; **MS** = Macrófago infectado com *M. smegmatis* mc²155; **MS::HspX** = Macrófago infectado com *M. smegmatis* contendo o vetor recombinante pFPCA1::hspX. (#) = Tempo pós infecção. ^b = Controle vs MS::HspX ^c = MS vs MS::HspX

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,86		. 0.05		MS 1	1,29		. 0.05
3hs	MS 2	0,67	0,91 ± 0,27	>0.05	24hs	MS 2	1,53	1,29 ± 0,24	>0.05
	MS 3	1,20		1,05 ± 0,23		MS 3	1,06		
	MS::HspX 1	1,12	1,05 ± 0,23			MS::HspX 1	1,41	1,53 ± 0,33	
	MS::HspX 2	0,79				MS::HspX 2	1,28		
	MS::HspX 3	1,23				MS::HspX 3	1,90		
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,92		.0.05		MS 1	1,01		5 0 0F
6hs	MS 2	1,28	1,24 ± 0,31	>0.05	48hs	MS 2	1,11	1,51 ± 0,78	>0.05
	MS 3	1,53				MS 3	2,40		
	MS::HspX 1	1,04			1	MS::HspX 1	1,14		1
	MS::HspX 2	1,03	1,11 ± 0,12			MS::HspX 2	1,80	1,69 ± 0,51	
	MS::HspX 3	1,25				MS::HspX 3	2,14		

Tabela A23: Valores de expressão do mRNA do gene MCL1 em macrófagos infectados com M. smegmatis

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р		
	Controle 1	1				Controle 1	1				
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0			
	Controle 3	1				Controle 3	1				
	MS 1	1,60		. 0.05	0.05	MS 1	1,12		. 0.05		
3hs	MS 2	1,20	1,27 ± 0,31	>0.05	24hs	MS 2	0,65	0,77 ± 0,31	>0.05		
	MS 3	1,00		9		MS 3	0,53				
	MS::HspX 1	1,20	1,00 ± 0,29			MS::HspX 1	0,72	0,66 ± 0,12			
	MS::HspX 2	1,13				MS::HspX 2	0,73				
	MS::HspX 3	0,67				MS::HspX 3	0,52				
	Controle 1	1						Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0			
	Controle 3	1				Controle 3	1				
	MS 1	1,16		. 0.05		MS 1	0,97		. 0.05		
6hs	MS 2	1,26	1,00 ± 0,36	>0.05	48hs	MS 2	1,03	$0,84 \pm 0,28$	>0.05		
	MS 3	0,59				MS 3	0,52				
	MS::HspX 1	0,97				MS::HspX 1	0,99	,			
	MS::HspX 2	1,01	0,84 ± 0,27			MS::HspX 2	0,84	0,82 ± 0,18			
	MS::HspX 3	0,53			MS::HspX 3	0,64					

Tabela A24: Valores de expressão do mRNA do gene BAX em macrófagos infectados com M. smegmatis

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	2,29		. 0.05		MS 1	1,02	0,72 ± 0,34	.0.05
3hs	MS 2	1,11	1,42 ± 0,77	>0.05	24hs	MS 2	0,79		>0.05
	MS 3	0,85	1,16 ± 0,54			MS 3	0,36		
-	MS::HspX 1	1,68				MS::HspX 1	0,78		
	MS::HspX 2	1,19				MS::HspX 2	1,01	0,71 ± 0,34	
	MS::HspX 3	0,61				MS::HspX 3	0,34		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,16		. 0 0E		MS 1	1,22		. 0.05
6hs	MS 2	0,58	0,76 ± 0,34	>0.05	48hs	MS 2	1,02	$0,88 \pm 0,43$	>0.05
-	MS 3	0,55				MS 3	0,39		-
	MS::HspX 1	1,73				MS::HspX 1	1,26	0,95 ± 0,29	
	MS::HspX 2	1,17	1,25 ± 0,45		-	MS::HspX 2	0,89		
	MS::HspX 3	0,84				MS::HspX 3	0,69		

Tabela A25: Valores de expressão do mRNA do gene BCL2L1 em macrófagos infectados com M. smegmatis

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1	0,49 ± 0,17 0,27 ± 0,14	
	MS 1	1,45			24hs	MS 1	0,67		.0 01a
3hs	MS 2	1,22	1,31 ± 0,12	<0,05 ^c		MS 2	0,33		<0,01
	MS 3	1,25				MS 3	0,47		<0,001
	MS::HspX 1	0,91	0,85 ± 0,12			MS::HspX 1	0,42		
	MS::HspX 2	0,93				MS::HspX 2	0,24		
	MS::HspX 3	0,72				MS::HspX 3	0,15		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,42				MS 1	0,45		-0 05ª
6hs	MS 2	0,65	$0,90 \pm 0,45$	>0,05	48hs	MS 2	0,60	0,61 ± 0,17	<0,05
	MS 3	0,62				MS 3	0,79	0,40 ± 0,11	<0,01
-	MS::HspX 1	1,25				MS::HspX 1	0,42		
	MS::HspX 2	0,96	1,05 ± 0,18			MS::HspX 2	0,50		
	MS::HspX 3	0,93				MS::HspX 3	0,29		

Tabela A26: Valores de expressão do mRNA do gene **BCL2** em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

^a = Controle vs MS.
 ^b = Controle vs MS::HspX
 ^c = MS vs MS::HspX

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1	0,79 ± 0,26 0,84 ± 0,11	
	MS 1	1,40		.0.05	24hs	MS 1	1,03		5 O OF
3hs	MS 2	0,74	$0,99 \pm 0,36$	>0.05		MS 2	0,82		>0.05
	MS 3	0,82				MS 3	0,52		
-	MS::HspX 1	1,17	0,92 ± 0,22			MS::HspX 1	0,92		
	MS::HspX 2	0,84				MS::HspX 2	0,89		
	MS::HspX 3	0,74				MS::HspX 3	0,71		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,00			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,86	0.01 + 0.00	. 0.05		MS 1	0,85		. 0.05
6hs	MS 2	1,07	0,01 ± 0,20	>0.05	48hs	MS 2	0,72	0,81 ± 0,08	>0.05
-	MS 3	0,51				MS 3	0,85	0,71 ± 0,12	
	MS::HspX 1	1,11				MS::HspX 1	0,85		
	MS::HspX 2	0,93	$0,89 \pm 0,25$			MS::HspX 2	0,61		
	MS::HspX 3	0,62			Me Me	MS::HspX 3	0,67		

Tabela A27: Valores de expressão do mRNA do gene CASP3 em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,06		. 0.05	24hs	MS 1	1,32	1,34 ± 0,31	. 0.05
3hs	MS 2	0,77	1,06 ± 0,30 0,88 ± 0,14	>0.05		MS 2	1,66		>0.05
	MS 3	1,36				MS 3	1,04		
-	MS::HspX 1	0,80				MS::HspX 1	1,16		
	MS::HspX 2	0,80				MS::HspX 2	1,89		
	MS::HspX 3	1,05				MS::HspX 3	1,09		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,03		. 0.05		MS 1	1,85		. 0.05
6hs	MS 2	1,45	1,16 ± 0,25	>0.05	48hs	MS 2	1,49	1,32 ± 0,63	>0.05
	MS 3	1,00				MS 3	0,63		-
- -	MS::HspX 1	1,16	1,28 ± 0,26			MS::HspX 1	1,27	1,45 ± 0,35	
	MS::HspX 2	1,89		i		MS::HspX 2	1,87		
	MS::HspX 3	1,09				MS::HspX 3	1,2		

Tabela A28: Valores de expressão do mRNA do gene TLR1 em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0 1,55 ± 1,08 1,57 ± 0,45	
	Controle 3	1			24hs	Controle 3	1		
	MS 1	1,49		<u> </u>		MS 1	1,58		.0.05
3hs	MS 2	0,77	1,09 ± 0,37	>0.05		MS 2	2,62		>0.05
-	MS 3	1,00	0,92 ± 0,37			MS 3	0,45		
	MS::HspX 1	1,34				MS::HspX 1	1,15		
	MS::HspX 2	0,73				MS::HspX 2	2,04		
	MS::HspX 3	0,68				MS::HspX 3	1,51		
	Controle 1	1				Controle 1	1	$ \begin{array}{c} 1 \pm 0,0 \\ 1,28 \pm 0,80 \\ 1,92 \pm 0,86 \\ \end{array} $	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,88		. 0.05		MS 1	0,99		. 0.05
6hs	MS 2	1,41	0,96 ± 0,42	>0.05	48hs	MS 2	2,18		>0.05
-	MS 3	0,59				MS 3	0,66		-
	MS::HspX 1	0,61				MS::HspX 1	2,06		
	MS::HspX 2	0,86	0,68 ± 0,16		M	MS::HspX 2	2,71		
	MS::HspX 3	0,57				MS::HspX 3	1,00		

Tabela A29: Valores de expressão do mRNA do gene TLR2 em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	$ \begin{array}{c} 1 \pm 0,0 \\ 1,07 \pm 0,30 \\ 0,95 \pm 0,25 \\ \end{array} $	
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,26		. 0.05	24hs	MS 1	1,06		. 0.05
3hs	MS 2	0,91	1,09 ± 0,18	>0.05		MS 2	1,37		>0.05
	MS 3	1,09				MS 3	0,78		-
	MS::HspX 1	1,04				MS::HspX 1	0,91		
	MS::HspX 2	0,94	0,95 ± 0,08			MS::HspX 2	1,21		
	MS::HspX 3	0,88				MS::HspX 3	0,72		
	Controle 1	1				Controle 1	1	$ \begin{array}{c} 1 \pm 0,0 \\ 0,95 \pm 0,37 \\ 1,00 \pm 0,24 \end{array} $	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,03		. 0.05		MS 1	1,16		. 0.05
6hs	MS 2	0,93	0,88 ± 0,18	>0.05	48hs	MS 2	1,17		>0.05
-	MS 3	0,68				MS 3	0,52		
	MS::HspX 1	1,07				MS::HspX 1	1,21		
	MS::HspX 2	0,92	0,94 ± 0,12			MS::HspX 2	1,06		
	MS::HspX 3	0,83				MS::HspX 3	0,74		

Tabela A30: Valores de expressão do mRNA do gene TLR6 em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	1 ± 0,0	
	Controle 3	1				Controle 3	1	$1,24 \pm 0,18$ $1,13 \pm 0,66$ $1 \pm 0,0$	
	MS 1	1,23		.0.05	24hs	MS 1	1,38		.0.05
3hs	MS 2	1,17	1,31 ± 0,20	>0.05		MS 2	1,31		>0.05
-	MS 3	1,54				MS 3	1,03		
	MS::HspX 1	0,75				MS::HspX 1	0,69		
	MS::HspX 2	0,78	0,81 ± 0,08			MS::HspX 2	1,89		
	MS::HspX 3	0,90				MS::HspX 3	0,80		
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	1,39		. 0.05		MS 1	1,58		. 0.05
6hs	MS 2	0,87	1,18 ± 0,28	>0.05	48hs	MS 2	0,83	$1,07 \pm 0,44$	>0.05
	MS 3	1,29				MS 3	0,79	1,05 ± 0,41	_
	MS::HspX 1	1,86				MS::HspX 1	1,06		
	MS::HspX 2	1,11	1,62 ± 0,44			MS::HspX 2	1,45		
	MS::HspX 3	1,88				MS::HspX 3	0,63		

Tabela A31: Valores de ex	oressão do mRNA do gen	e NOS2 em macrófagos	infectados com <i>M. smeamatis</i>
	aprocede de minar de gem		in ootaaoo oon nii on ognatio

Tempo (#)	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р	Тетро	Amostra	2- ^{∆∆Ct}	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	1				Controle 1	1		
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1	$1 \pm 0,0$ $2,53 \pm 1,24$ $1,12 \pm 0,12$	
	Controle 3	1			24hs	Controle 3	1		
	MS 1	1,06				MS 1	1,59		-0.05°
3hs	MS 2	1,58	1,17 ± 0,37	>0,05		MS 2	3,94		<0,05° <0,01 ^a
	MS 3	0,86				MS 3	2,07		
	MS::HspX 1	1,15	0,89 ± 0,25			MS::HspX 1	1,00		
	MS::HspX 2	0,87				MS::HspX 2	1,25		
	MS::HspX 3	0,66				MS::HspX 3	1,12		
	Controle 1	1				Controle 1	1	1 ± 0,0	
	Controle 2	1	1 ± 0,0			Controle 2	1		
	Controle 3	1				Controle 3	1		
	MS 1	0,81				MS 1	2,18		<0.05°
6hs	MS 2	1,98	1,16 ± 0,72	>0,05	48hs	MS 2	3,64	2,57 ± 0,94	<0,05
	MS 3	0,68				MS 3	1,89	1,18 ± 0,06	<0,01"
	MS::HspX 1	0,65				MS::HspX 1	1,18		
	MS::HspX 2	0,60	$0,66 \pm 0,08$			MS::HspX 2	1,12		
	MS::HspX 3	0,75				MS::HspX 3	1,24		

Tabela A32: Valores de expressão do mRNA do gene IRGM em macrófagos infectados com *M. smegmatis*

^a = Controle vs MS. ^c = MS vs MS::HspX

Tempo (#)	Amostra	[] pg/mL	Média ± Desvio padrão	р	Tempo	Amostra	[] pg/mL	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	8,90				Controle 1	24,64		
	Controle 2	9,01	8,90 ± 0,10			Controle 2	25,19	22,08 ± 4,92	
	Controle 3	8,81				Controle 3	16,41		
	MS 1	7,51			24hs	MS 1	29,40	123,80 ± 82,49 191,67 ± 72,62	<0,05 ^a
3hs	MS 2	7,01	7,14 ± 0,33	>0,05		MS 2	160,00		<0,01°
	MS 3	6,89	6,25 ± 0,86			MS 3	182,00		<0,001 ^b
-	MS::HspX 1	7,35				MS::HspX 1	110,00		
	MS::HspX 2	6,20				MS::HspX 2	249,00		
	MS::HspX 3	5,19				MS::HspX 3	216,00		
	Controle 1	7,61				Controle 1	34,18	24,97 ± 8,03	
	Controle 2	12,79	10,42 ± 2,62			Controle 2	21,36		
	Controle 3	10,86				Controle 3	19,38		
	MS 1	9,95				MS 1	37,95		-0.01°
6hs	MS 2	13,87	11,76 ± 1,98	>0,05	48hs	MS 2	159,00	117,98 ± 69,32	<0,01 <0.001 ^b
	MS 3	11,45				MS 3	157,00		<0,001°
-	MS::HspX 1	8,49				MS::HspX 1	126,00) 254,33 ± 116,08	
	MS::HspX 2	9,42	$8,5 \pm 0,96$			MS::HspX 2	352,00		
	MS::HspX 3	7,50				MS::HspX 3	285,00		

Tabela A33: Valores da concentração da IL-1b no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *M. smegmatis*.

^a = Controle vs MS.
 ^b = Controle vs MS::HspX
 ^c = MS vs MS::HspX

Tempo (#)	Amostra	[] pg/mL	Média ± Desvio padrão	Ρ	Tempo	Amostra	[] pg/mL	Média ± Desvio padrão	р
	Controle 1	4573				Controle 1	4262		
	Controle 2	3257	3093,07 ±			Controle 2	3525	3995,00 ±	
	Controle 3	3257	759,79			Controle 3	4198	400,29	
	MS 1	3147				MS 1	2845	3717,67 ± 796,34	
3hs	MS 2	3147	3147,00 ± 0,0	>0,05	24hs	MS 2	4405		>0,05
	MS 3	3147				MS 3	3903		
	MS::HspX 1	2420	2420,00 ± 0,0			MS::HspX 1	2935	3772 67 +	
	MS::HspX 2	2420				MS::HspX 2	3854	3/72,07 ±	
	MS::HspX 3	2420				MS::HspX 3	4529	000,11	
	Controle 1	3667	0000.00.1			Controle 1	2973	2800, 33 ±	
	Controle 2	3802	3922,33 ±			Controle 2	2790		
	Controle 3	4298	332,20			Controle 3	2638	107,74	
	MS 1	2551	2519.00 +			MS 1	4280	4014 67 +	
6hs	MS 2	3798	3010,00 ±	>0,05	48hs	MS 2	4384	4314,07 ±	<0,05 ^a
-	MS 3	4205	001,02			MS 3	4280	60,04 4460,33 ± 62,93	_
	MS::HspX 1	3437	- 3542,33 ±			MS::HspX 1	4424		
	MS::HspX 2	3513				MS::HspX 2	4533		
	MS::HspX 3	3677	122,00			MS::HspX 3	4424		

Tabela A34: Valores da concentração da IL-8 no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *M. smegmatis.*

^a = Controle vs MS.