

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

Perfil transcriptômico comparativo de macrófagos em cultura, infectados com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de resistência a quimioterápicos

Gabriela Guimarães Sousa Leite

Tese para a obtenção do grau de
DOUTOR.

Orientador:
Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata

São Paulo
2014

Gabriela Guimarães Sousa Leite

Perfil transcriptômico comparativo de macrófagos em cultura, infectados com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de resistência a quimioterápicos

Versão corrigida

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Tit. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/presidente

1° examinador

1° examinador

1° examinador

1° examinador

São Paulo, _____ de _____.

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.

Leite, Gabriela Guimarães Sousa
L533p Perfil transcriptômico comparativo de macrófagos em cultura, infectados com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de resistência a quimioterápicos / Gabriela Guimarães Sousa Leite. -- São Paulo, 2014.
140p.

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

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Imunidade : Medicina 2. *Mycobacterium tuberculosis*
3. Macrófagos 4. Expressão gênica 5. Sequenciamento genético
I. T. III. Hirata, Mario Hiroyuki, orientador.

616.079 CDD

Dedico este trabalho a todos que fizeram parte dele direta ou indiretamente. Absolutamente nada seria possível sem a ajuda e apoio de vocês. Refiro-me aos meus queridos amigos e familiares, companheiros de estudo e experimentação! Todos vocês são partes integrantes fundamentais na realização deste todo.

O fim de uma caminhada significa, sobretudo, o início de uma nova jornada!

Agradeço a todos que estiveram comigo nesta longa e difícil caminhada, me apoiando, me dando forças e acima de tudo compreendendo o momento que tão logo passaria... Agradeço pela paciência e sobretudo pelo amor, carinho e respeito que sempre tiveram por mim!! Especialmente agradeço aos meus pais e irmãos que me mantiveram sempre em pé e que me levantaram quando eu caí. Agradeço ao meu orientador pela confiança e paciência e tão importante quanto, agradeço pela orientação, pois muitas vezes quase me perdi. Agradeço aos amigos pelo ombro, pelo sorriso, pela paciência, pelas palavras e pela companhia quando nenhuma frase poderia ser dita... Agradeço aos companheiros de trabalho pela amizade, pela ajuda em todas as fases de realização desta pesquisa e SIM, NÓS CONSEGUIMOS!! E embora por último, mas sempre em primeiro lugar, agradeço a Deus, meu Pai, meu Criador, sem Ti, nada seria possível.

Agradeço também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e auxílio financeiro, disponibilizados para o desenvolvimento desta pesquisa.

*"Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o
coração, dedicar-se a ele."*

Siddharta Gautama - Buda

RESUMO

LEITE, G.G.S. **Perfil transcriptômico comparativo de macrófagos em cultura, infectados com isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* com diferentes perfis de resistência a quimioterápicos.** 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Farmácia – área de análises clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A tuberculose ainda é pontuada como uma doença de impacto mundial, sendo considerada desde 1993 um problema de saúde pública global. Uma das grandes preocupações é a contínua prevalência de cepas da *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistentes, especialmente o genótipo hipervirulento W-Beijing. Acredita-se que este genótipo apresenta alguma vantagem seletiva em relação a outros genótipos da *M. tuberculosis*, além de estar associado à falha terapêutica, tuberculose extrapulmonar, resistência à vacinação pela BCG e acentuada capacidade de disseminação. Estas cepas apresentam variável capacidade de sobrevivência dentro de macrófagos e do granuloma, modulando vias metabólicas específicas que culminam no escape do sistema imunológico e sucesso na infecção. Buscando entender esta vantagem seletiva e capacidade de persistência na infecção, este estudo teve como objetivo analisar e comparar o perfil transcriptômico de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e H37Rv. Os RNAs mensageiros dos macrófagos infectados foram sequenciados em plataforma *HiScan Genome Analyzer Illumina*. Foram gerados aproximadamente 30 milhões de sequências por amostra, em leituras *single reads*, com mais de 70% de sequências com valores de *score Q* de qualidade superior ou igual a 30. Foram mapeados e analisados 35.581 transcritos. Em média, 63% dos genes não apresentaram diferenças nos valores de expressões, 19% tiveram suas expressões reduzidas e 18% dos genes foram classificados como mais expressos, para todas as amostras de macrófagos sequenciadas. Após as análises terciárias e validação por PCR em tempo real, as amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471 apresentaram um aumento nas expressões de IFNs da classe I ($p < 0,001$) e aumento exacerbado de TNF-alfa ($p < 0,001$), comparativamente ao controle e as amostras infectadas com a cepa padrão H37Rv. Aditivamente foi observado um aumento nas expressões de duas quinases, RIPK1 e RIPK3 e de moléculas envolvidas na indução e controle de espécies reativas de oxigênio (ROS), que em infecções por bactérias intracelulares, estão correlacionadas com a morte de macrófagos por necroptose. A cepa hipervirulenta da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471, apresentou reduzida persistência intramacrofágica e induziu morte precoce dos macrófagos ao quinto dia de infecção. A morte observada nos macrófagos foi associada a ativação de IFNs da classe I/TNF- α /RIPK1/RIPK3 e ROS, indicando necroptose. Ainda, foi observado um aumento na expressão do receptor TLR3 nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing, comparativamente as amostras controles e infectadas com a cepa H37Rv. É provável que a ativação inicial dos IFNs da classe I tenha ocorrido via TLR3 através do reconhecimento de dsRNAs da *M. tuberculosis*.

Palavras-chave: Imunidade. *Mycobacterium tuberculosis*. Macrófagos. Expressão Gênica. RNA-Seq

ABSTRACT

LEITE, G.G.S. **Comparative transcriptomics profile of macrophages in culture, infected with clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* with different profiles of resistance to chemotherapeutic.** 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Farmácia – área de análises clínicas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Since 1993 the tuberculosis is considered as a disease of worldwide impact and a problem of public health. A major concern is the continuing prevalence of multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains, especially the hypervirulent W - Beijing genotype. It is believed that this genotype has a selective advantage over other genotypes of *M. tuberculosis* and has been associated with treatment failure, extrapulmonary tuberculosis, resistance to BCG vaccination and marked ability to spread. These strains have varying ability to survive within macrophages and granuloma, modulating specific metabolic pathways that culminate in the escape of the immune system response. To understand this selective advantage and ability to persist in infection, this study aimed to analyze and compare the transcriptomic profile of macrophages infected with strains of *M. tuberculosis* W - Beijing 1471 and H37Rv. The mRNAs of infected macrophages were sequenced in HiScan Illumina Genome Analyzer platform. Were generated approximately 30 million sequences per sample, in single-reads readings. More than 70 % of sequences had values of Q score superior or equal to 30. Were mapped and analyzed 35,581 transcripts. On average, 63% of the genes showed no differences in the expressions, 19% were downregulated and 18% were upregulated, for all samples sequenced macrophages. After tertiary analysis and validation by real-time PCR, samples infected with the strain W -Beijing in 1471 showed an increase in expression of IFN class I ($p < 0.001$) and exacerbated increase of TNF- α ($p < 0.001$) when compared to the control samples and those infected with standard strain H37Rv. Additionally was observed an increase in expressions of the two kinases RIPK1 and RIPK3 and molecules involved in the induction and control of reactive oxygen species (ROS). In infections by intracellular bacteria, activation of RIPK1, RIPK3, ROS and TNF- α , are correlated with death of macrophages by necroptosis. The hypervirulent *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 strain showed reduced persistence inside macrophage and induced early death of macrophages in the fifth day of infection. The death observed in macrophages was associated with activation of IFNs class I/TNF- α /RIPK1/RIPK3 and ROS, indicating necroptosis. Also was observed an increase in the expression of TLR3 receptor in infected samples with W-Beijing 1471 strain compared to controls and those infected with H37Rv strain. Probably the initial activation of IFNs class I occurred by TLR3 through the recognition of *M. tuberculosis* dsRNAs.

Keywords: Immunity. *Mycobacterium tuberculosis*. Macrophage. Gene Expression. RNA-Seq.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE GRÁFICOS.....	12
LISTA DE FIGURAS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. VISÃO GERAL.....	16
1.2 EPIDEMIOLOGIA DA TB – Um breve resumo do cenário mundial.....	17
1.2.1 TB versus HIV.....	21
1.2.2 TB versus <i>M. tuberculosis</i> resistentes versus Genótipo W-Beijing.....	23
1.3 RESISTÊNCIA VERSUS QUIMIOTERAPIA.....	27
1.4 IMUNOLOGIA DA TB.....	30
1.4.1 Resposta Imunológica versus Granuloma.....	30
1.4.2 Resposta Imune Inata versus TB.....	33
1.4.3 Resposta Imune Adaptativa versus TB.....	35
1.4.4 Inibição da Resposta Imune versus TB.....	37
2. PROBLEMÁTICA VERSUS JUSTIFICATIVA.....	42
3. OBJETIVOS.....	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	44
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
4. RESULTADOS ESPERADOS.....	44
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
5.1 FLUXOGRAMA DA METODOLOGIA UTILIZADA.....	46
5.2 CULTIVO DAS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i>	47
5.3 TRANSFORMAÇÃO DE THP1 EM MACRÓFAGOS E INFECÇÃO COM A <i>M. tuberculosis</i>	47
5.4 INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS.....	48
5.5 ANÁLISES DOS TRANSCRIPTOMAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM AS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i> W-BEIJING 1471 E H37RV.....	49
5.5.1 Extração de RNA dos macrófagos infectados.....	49
5.5.2 Preparo da biblioteca de RNA para sequenciamento.....	50
5.5.3 Validação das bibliotecas por qPCR em tempo real e enriquecimento das amostras.....	51
5.5.4 Sequenciamento.....	52
5.6 ANÁLISE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO SEQUENCIAMENTO.....	52
5.7 ANÁLISE TERCIÁRIA DO SEQUENCIAMENTO.....	53
5.8 VALIDAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES PELA PCR EM TEMPO REAL.....	55
5.9 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS.....	56
6. RESULTADOS.....	58
6.1 FLUXOGRAMA DOS RESULTADOS APRESENTADOS.....	58

6.2 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS THP1 EM MACRÓFAGOS, INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E INFECCÃO.....	59
6.3 EXTRAÇÃO DE RNA DE MACRÓFAGOS E DEPLEÇÃO DE rRNA	59
6.4 CONSTRUÇÃO, VALIDAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS PELA <i>M. tuberculosis</i> E CONTROLES	60
6.5 SEQUENCIAMENTO	63
6.6 ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO	63
6.6.1 Análises primárias e secundárias	63
6.6.1.1 BIBLIOTECAS DE RNA DE MACRÓFAGOS APÓS INFECCÃO PELAS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i> H37RV E W-BEIJING 1471 E CONTROLES NÃO INFECTADOS	63
6.6.1.2 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DAS SEQUÊNCIAS GERADAS	66
6.6.1.3 MAPEAMENTO (RNA SEQ) E NORMALIZAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA.....	68
6.6.2 Análises terciárias.....	70
6.6.2.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM A <i>M. tuberculosis</i> W-BEIJING 1471 E H37RV.....	70
6.6.2.2 ANÁLISE DAS ROTAS METABÓLICAS	73
6.6.2.3 VALIDAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES PELA PCR EM TEMPO REAL E DOSAGENS DE PROTEÍNAS.....	85
7. DISCUSSÃO	93
7.1 CULTIVO DE MACRÓFAGOS, INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS, INFECCÃO COM AS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i> H37RV E W-BEIJING 1471 E EXTRAÇÃO RNA TOTAL DOS MACRÓFAGOS E CONTROLES.....	93
7.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS MACRÓFAGOS INFECTADOS PELA <i>M. tuberculosis</i> , DEPLEÇÃO DOS RRNAS E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE CDNA PARA SEQUENCIAMENTO.....	97
7.3 ANÁLISES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS DAS AMOSTRAS MACRÓFAGOS INFECTADAS COM AS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i> CEPA H37RV E W-BEIJING 1471 E CONTROLES, APÓS SEQUENCIAMENTO	99
7.4 ANÁLISES TERCIÁRIAS DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM AS CEPAS DA <i>M. tuberculosis</i> H37RV E W-BEIJING 1471.....	102
7.4.1 Análise da expressão gênica global diferencial	102
7.4.2 Análise das rotas metabólicas alteradas durante a infecção de macrófagos pelas cepas da <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e W-Beijing 1471.....	104
7.4.3 Ativação dos Interferons da classe I versus <i>M. tuberculosis</i>	108
7.4.4 TNF- α versus IFN1 versus <i>M. tuberculosis</i>	113
7.4.5 Necrose programada versus <i>M. tuberculosis</i>	115
7.4.6 Ativação dos IFNs da classe I nos estágios iniciais da infecção – provável rota metabólica	119
7.4.7 TLR3 versus IFNs da classe I versus TNF- α versus necroptose versus <i>M. tuberculosis</i> – provável relação	122
8. IMPACTO DO ESTUDO	126
9. CONCLUSÕES.....	128

10. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	128
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129
12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130

LISTA DE ABREVIATURAS

DCs: Células dendríticas

EMB: Etambutol

INH: Isoniazida

MDR: *Mycobacterium tuberculosis* multidroga resistente

NB-3: Laboratório de nível de biossegurança nível 3

NGS: *Next Generation Sequencing*

PZA: Pirazinamida

RIN: Índice de integridade do RNA

RMP: Rifampicina

TB: Tuberculose

VA: Vitaminas A

VD: Vitamina D

WHO: Organização Mundial da Saúde

XDR: *Mycobacterium tuberculosis* extensivamente resistente

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Coeficientes da incidência da TB, mortalidade associadas a TB e coeficiente de TB-HIV das unidades federativas do Brasil no ano de 2013	21
Tabela 02 – Relação de estudos que apresentaram diferentes resultados quanto ao perfil de expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias de infecções pela W-Beijing em comparação a cepas não-Beijing.....	27
Tabela 03 – Relação dos fatores de virulência da <i>M. tuberculosis</i> associados a modulação da resposta imune celular de macrófagos e outros tipos celulares.....	39
Tabela 04 – Descrição das amostras de RNA de macrófagos que foram realizados os preparos das bibliotecas e sequenciamento.....	50

LISTA DE QUADROS

Tabela 05 – Mapeamento de parte das sequências geradas da biblioteca de macrófagos não infectados (controle) com as bases de dados provenientes do <i>Ensembl Genome Browser</i> (cDNA), <i>RefSeq</i> e <i>Genome</i> do <i>NCBI Reference Sequence Database</i>	67
Tabela 06 – Mapeamento da biblioteca de macrófagos controles contra o genoma de referência de <i>Homo Sapiens</i> GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta <i>RNA-Seq Analysis</i> do software <i>CLC Bio Genomics Workbench</i> (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). <i>Total fragments</i> : total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. <i>Counted Fragments</i> : total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de <i>Homo Sapiens</i> . <i>Uncounted fragments</i> : total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.....	68
Tabela 07 – Mapeamento da biblioteca de macrófagos infectados com a <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por 24 horas, contra o genoma de referência de <i>Homo Sapiens</i> GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta <i>RNA-Seq Analysis</i> do software <i>CLC Bio Genomics Workbench</i> (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). <i>Total fragments</i> : total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. <i>Counted Fragments</i> : total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de <i>Homo Sapiens</i> . <i>Uncounted fragments</i> : total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.....	69
Tabela 08 – Mapeamento da biblioteca de macrófagos infectados com a <i>M. tuberculosis</i> W-Beijing 1471 por 96 horas, contra o genoma de referência de <i>Homo Sapiens</i> GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta <i>RNA-Seq Analysis</i> do software <i>CLC Bio Genomics Workbench</i> (CLC Bio,	

	Katrinebjerg, Denmark). <i>Total fragments</i> : total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. <i>Counted Fragments</i> : total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de <i>Homo Sapiens</i> . <i>Uncounted fragments</i> : total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.....	69
Tabela 09	– Total de genes classificados de acordo com a diferença de expressão, após comparação dos transcriptomas de macrófagos infectados com as cepa da <i>M. tuberculosis</i> , H37Rv e W-Beijing 1471 e macrófagos controles, após avaliação por meio da ferramenta <i>Set Up Experiment</i> do software <i>CLC Bio Genomics Workbench</i>	72
Tabela 10	– Classificação hierárquica de reguladores gênicos que estão relacionados com a ativação das principais vias metabólicas envolvidas na infecção de macrófagos pelas cepas da <i>M. tuberculosis</i> , H37Rv e W-Beijing 1471. Da direita para a esquerda: coluna H 96 – macrófagos infectados com a cepa H37Rv por 96 horas; coluna B 96 – macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471 por 96 horas e assim consecutivamente.....	78
Tabela 11	– <i>Networks</i> : Redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da <i>M. tuberculosis</i> , H37Rv nos tempos de infecção de 24 a 96 horas.....	79
Tabela 12	– <i>Networks</i> : Redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da <i>M. tuberculosis</i> , W-Beijing 1471 nos tempos de infecção de 24 a 96 horas.....	80
Tabela 13	– Relação das vias metabólicas de morte celular associadas as moléculas ativadas, de macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, no tempo de 96 h.....	84
Tabela 14	– Relação das moléculas ativadas nas vias de morte celular e necrose de macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, no tempo de 96 h.....	85
Tabela 15	– Resultados dos testes estatísticos para avaliação da expressão gênica dos genes <i>BAX</i> , <i>BCL2</i> , <i>BCL2L1</i> , <i>CASP3</i> , <i>ICAM1</i> , <i>L10</i> , <i>IL8</i> , <i>MCL1</i> , <i>NFKB</i> e <i>IL1B</i> , das amostras de macrófagos infectados com a <i>M. tuberculosis</i> cepa W-Beijing 1471 e H37Rv e dosagem das proteínas IL8 e IL1B.....	87
Tabela 16	– Resultados dos testes estatísticos para avaliação da expressão proteica de IL1A, IL1RA, IL2, IL4, IL6, MCP1, MIP1A e MIP1B, das amostras de macrófagos infectados com a <i>M. tuberculosis</i> cepa W-Beijing 1471 e H37Rv.....	92

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01 – Perfil da expressão gênica global das amostras de macrófagos infectadas com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471 comparadas ao controle não infectado. 63% dos genes tiveram diferença de expressão igual a um (cinza), 19% tiveram diferença de expressão menor do que um (vermelho) e 18% tiveram diferença de expressão maior do que um (azul).....**72**
- Gráfico 02 – Representação gráfica do total de genes classificados de acordo com o nível de expressão após comparação dos transcriptomas das amostras de macrófagos controles com as infectadas com a cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Para as análises estatísticas foram aplicados o teste *two-way* ANOVA e pós teste de Bonferroni, realizados em *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significantes e estão representados graficamente com o símbolo asterisco.....**73**
- Gráfico 03 – Descrição das principais vias metabólicas alteradas após infecção pela cepa da *M. tuberculosis*, H37Rv, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.....**75**
- Gráfico 04 – Descrição das principais vias metabólicas alteradas após infecção pela cepa da *M. tuberculosis*, H37Rv, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.....**76**
- Gráfico 05 – Comparação das principais vias metabólicas relevantes dentro do contexto da infecção de macrófagos pelas cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471.....**78**
- Gráfico 06 – Resultado da análise da expressão gênica do gene IFNA1 em macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e H37Rv.....**88**
- Gráfico 07 – Resultado da análise da expressão gênica do gene que codifica para a IL12B de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e cepa W-Beijing 1471.....**89**
- Gráfico 08 – Resultado da análise da expressão gênica do gene que codifica para TNFa de macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* H37Rv e cepa W-Beijing 1471.....**90**
- Gráfico 09 – Resultado da análise da expressão proteica de TNFa de macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* H37Rv e cepa W-Beijing 1471.....**91**

LISTA DE FIGURAS

- Figura 01 – Estimativa da incidência da TB mundial.....**19**
- Figura 02 – Prevalência de HIV em novos casos de TB mundialmente, no ano de 2012.....**22**
- Figura 03 – Distribuição das cepas da *M. tuberculosis* W-Beijing associadas a resistência antimicrobiana. Círculo azul: casos onde não houve relação entre as cepas W-Beijing e resistência. Círculo vermelho: casos onde houve relação entre as cepas W-Beijing e resistência antimicrobiana. O tamanho do círculo de diz respeito a percentagem de cepas W-Beijing isoladas. Quanto maior o círculo, maior a percentagem.....**25**
- Figura 04 – Representação do granuloma em infecções pela *M. tuberculosis*. No centro do granuloma estão localizados os bacilos e macrófagos infectados já em processo de necrose. Em volta há um infiltrado celular contendo outros macrófagos e DCs na região mais interna, sendo alguns deles já em processo de apoptose. Externamente há um acúmulo de células T e B. Alguns macrófagos geralmente se unem centralmente para a formação de células gigantes multinucleadas e eventualmente podem se diferenciar em células espumosas, caracterizadas pelo alto conteúdo lipídico.....**31**
- Figura 05 – Relação das mortes celulares no interior do granuloma versus replicação da *M. tuberculosis*. **a** - apoptose: na morte celular programada por apoptose há um crescimento intracelular de bacilos da *M. tuberculosis* controlado. **b** - necrose: na morte celular por necrose, programada ou acidental, há multiplicação bacilar extracelular excessiva, benéfica para a manutenção e disseminação da micobactéria.....**33**
- Figura 06 – Representação da resposta imune adaptativa frente a infecções pela *M. tuberculosis*. Peptídeos micobacterianos são apresentados a células T CD4 via MHC da classe II. A ativação de células T CD8 ocorre pela apresentação de antígenos presentes no citosol ou corpos apoptóticos contendo peptídeos micobacterianos via MHC da classe I. As células T CD4 se diferenciam em quatro populações Th1, Th2, Th17 e Treg. Th1 induz a produção de citocinas pro-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL2 que ativam outros macrófagos e células T, levando a formação do granuloma sólido e controle da infecção. Th17 ativa células polimorfonucleadas (PMN) e Th1. Células Th2 e Treg produzem citocinas anti-inflamatórias IL4, IL10 e TGF β que contra-balanceiam a resposta Th1 e podem levar a supressão da resposta inflamatória e formação do granuloma caseoso com conseqüente disseminação do bacilo. As células T CD8 citotóxicas ativam a apoptose de outros macrófagos infectados pela *M. tuberculosis*.....**37**
- Figura 07 – Parâmetros utilizados para normalização e expressão gênica global das bibliotecas de cDNA de macrófagos infectados com a *M. tubeculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv e controles. *Expression column*: modelo de normalização por RPKM. *References*: base de dados de referência do genoma anotado de *Homo Sapiens* GRCh37.74 *Minimum similarity fraction*: similaridade mínima das sequências em relação a sequência de referência.....**54**

- Figura 08 – THP1 tratadas com VA e VD (1 μ M), infectadas com a cepa padrão da *M. tuberculosis*, H37Rv, com taxa de infecção de 10 bacilos para cada célula (A) e taxa de três bacilos para cada célula (B), durante seis dias. Presença de grupamento de células característico de células gigantes multinucleadas.....**59**
- Figura 09 – Qualidade das bibliotecas de cDNA produzidas e prontas para serem utilizadas para sequenciamento. A. Corrida eletroforética apresentando fragmentos de cDNA em cerca de 260 pb. B e C. Representação gráfica dos eletroferogramas das amostras de RNA das cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471, após 6h de infecção respectivamente, com o padrão inferior (15 pb), padrão superior (1500pb) e a região central contendo os fragmentos para sequenciamento de cerca de 260 pb.....**62**
- Figura 10 – Distribuição da média da qualidade das sequências da amostra de macrófago não infectado (controle). A qualidade das sequências é calculada pela média aritmética da contagem realizada pelo PHRED (eixo x) e do número de sequências com qualidade, normalizadas com o número total de sequências (eixo y).....**65**
- Figura 11 – Distribuição de bases CG por sequência gerada de macrófagos não infectados (controle). Porcentagem de sequências no eixo x e porcentagem de base C e G no eixo y.....**66**
- Figura 12 – Análise da expressão diferencial dos transcriptomas de macrófagos controles em comparação aos transcriptomas de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471. *Control*: denominação das amostras de macrófagos não infectadas; *MH*: denominação das amostras de macrófagos infectadas com a cepa de referência H37Rv da *M. tuberculosis*; *MB*: denominação das amostras de macrófagos infectadas com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471; *Feature ID*: genes avaliados quanto a expressão diferencial; *Fold Change (Fold Cha...)*: valor da diferença de expressão gênica global. Análise realizada em software *CLC Bio Genomics Workbench*.....**71**
- Figura 13 – *Overlapping*: Sobreposição das redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 nos tempos de infecção de 24 a 96 horas.....**81**
- Figura 14 – Rede gênica associada ao processo de infecção de macrófagos pela cepa da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471. A coloração e intensidade desta de cada gene refere-se ao nível de expressão após o ultrassequenciamento. Em vermelho: genes com expressão aumentada. Em verde: genes com expressão reduzida.....**82**
- Figura 15 – Rede gênica associada ao processo de infecção de macrófagos pela cepa da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e associação com afecções associadas a eles. A coloração e intensidade desta de cada gene refere-se ao nível de expressão após o ultrassequenciamento. Em vermelho: genes com expressão aumentada. Em verde: genes com expressão

- reduzida. Em cinza: prováveis moléculas reguladoras com expressão aumentada.....**83**
- Figura 16 – Cascata metabólica de ativação de JAK/STAT via IFNs da classe I e II.....**110**
- Figura 17 – Cascata metabólica de ativação de receptores TLR3, via dsRNAs.....**121**
- Figura 18 – Descrição das rotas metabólicas e suas moléculas assessórias ativadas durante o processo de infecção de macrófagos pela *M. tuberculosis* W-Beijing 1471. As interconexões entre as vias foram sugeridas de acordo com os dados de expressões obtidos no ultra sequenciamento e relação com dados presentes na literatura. As moléculas com coloração em rosa tiveram sua expressão aumentada quando comparadas ao controle e as amostras infectadas pela cepa padrão H37Rv.....**125**

1. INTRODUÇÃO

1.1. VISÃO GERAL

Desde o ano de 1993 até o presente momento a tuberculose (TB) é apontada como um problema de saúde pública global, sendo considerada em pleno século 21, um dos maiores desafios terapêuticos a ser vencido, devido ao baixo número de fármacos disponíveis para tratamento, aumento de cepas da bactéria *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (MDR) e disseminação de genótipos hipervirulentos. Um genótipo fortemente associado a resistência farmacológica é o W-Beijing, que devido a sua alta virulência parece apresentar uma vantagem seletiva sobre os outros genótipos, além de estar associado à falha terapêutica, TB extrapulmonar e resistência à vacinação pela BCG (ZUMLA *et al.*, 2014; PARWATI *et al.*, 2010).

Os perfis de virulência das diferentes cepas da *M. tuberculosis* associados a resposta imunológica do hospedeiro determinam o curso da infecção e desfecho para cura ou não do paciente. E diferentes genótipos da *M. tuberculosis* levam a distintas respostas imune celulares e esta relação bactéria/hospedeiro tem sido extensivamente estudada (LÓPEZ *et al.*, 2003).

A não progressão da doença requer uma resposta imunológica competente dos indivíduos infectados, mediada principalmente por células T auxiliares tipo 1 (Th1). Após uma ativação inicial de macrófagos e células dendríticas (DCs) infectados no pulmão, ocorre uma intensa resposta inflamatória local e recrutamento de outros fagócitos ao sítio da infecção, com consequente formação de um granuloma na tentativa de conter o bacilo (MARINO & KIRSCHNER, 2004).

Aproximadamente 90% dos pacientes infectados conseguem desencadear uma resposta inflamatória protectora, no entanto, genótipos com diferentes perfis de virulência conseguem modular rotas metabólicas do próprio hospedeiro para seu benefício, causando disseminação da doença e muitas vezes morte do paciente (MARINO & KIRSCHNER, 2004; ERNST, 2012).

Genótipos hipervirulentos W-Beijing são capazes de inibir a resposta pro-inflamatória de macrófagos, levando a uma rápida disseminação da bactéria e morte dos indivíduos infectados, como ocorreu em Houston, no estado do Texas nos EUA, em um surto entre os anos de 1995 e 1998 (NICOL & WILKINSON, 2008).

Contrariamente, genótipos menos virulentos, tal como o Canetti, induzem resposta pro-inflamatória eficiente, com conseqüente controle da multiplicação bacilar, levando a uma estabilização do granuloma e eliminação do bacilo (LOPÉZ *et al.*, 2003).

A compreensão das principais diferenças na modulação das rotas metabólicas macrofágicas em resposta a infecção por cepas da *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulência podem trazer informações úteis para a seleção de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos fármacos adjuvantes no tratamento da TB.

1.2. EPIDEMIOLOGIA DA TB – Um breve resumo do cenário mundial...

A TB é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *M. tuberculosis*, identificado por Robert Koch em 1882. A doença é disseminada na sua maioria pelo ar, quando pacientes doentes expõem o bacilo, principalmente no ato de tossir. Por

esse motivo tipicamente afeta os pulmões (TB pulmonar), podendo eventualmente atingir outros sítios (TB extrapulmonar) (WHO, 2013).

Embora mais comum em homens em idade economicamente produtiva, pessoas imunologicamente deprimidas, especialmente as infectadas pelo vírus HIV, inclusive mulheres, apresentam taxas de desenvolvimento da doença muito maiores. Geralmente apenas uma pequena parcela da população infectada pelo bacilo desenvolve a doença propriamente dita e aproximadamente 90% dos doentes conseguem eliminar o bacilo, quando medicados apropriadamente. Ainda, analisando-se o curso natural da TB sem interferência terapêutica, 70% dos pacientes HIV-negativos com TB pulmonar/escarro positivo, morrem em aproximadamente 10 anos, sendo que esta porcentagem reduz para 20%, em casos de cultura positiva/escarro negativo. (KOUL *et al.*, 2011; WHO, 2013).

Há mais de um milênio a TB assombra a humanidade e até hoje é capaz de causar mortes em todo o mundo. No ano de 2012 foram notificados 6,8 milhões de novos casos e 1,3 milhões de mortes devido a TB, chegando a 0,3 milhões em pacientes HIV-positivos. Aproximadamente 0,6 milhões das mortes foram causadas por genótipos da *M. tuberculosis* MDR ou extensivamente resistentes (XDR) (WHO, 2013).

O sudeste da Ásia e a região ocidental do Pacífico concentram 58% dos casos de TB mundiais, sendo 26% e 12% na Índia e China respectivamente. A África apresenta as maiores taxas relativas de mortalidade, aproximadamente 255 mil mortes/ano, mais que o dobro do que a média global, que é de 122 (**figura 01**) (WHO, 2013).

O Brasil ainda continua entre os 22 países que concentram 80% dos casos de TB mundial, com uma estimativa de incidência no ano de 2012 de 92 mil casos (taxa

de 46/100.000 habitantes), posicionando-se no 16º neste ranking e é considerado um dos países com maior incidência de MDR-TB. Em 2011 o Brasil ocupava a 19ª posição com uma incidência de aproximadamente 89 mil casos/ano. No mesmo ano, o Brasil ainda não havia alcançado as metas globais de detecção de novos casos e sucesso no tratamento. Em 2012 o Brasil esteve entre os cinco países com as menores taxas de sucesso terapêutico, chegando a apenas 70,6% de cura nos casos bacilíferos. A Organização Mundial da Saúde (WHO) recomenda uma cura de no mínimo 85% nos mesmos casos (WHO, 2012, 2013).

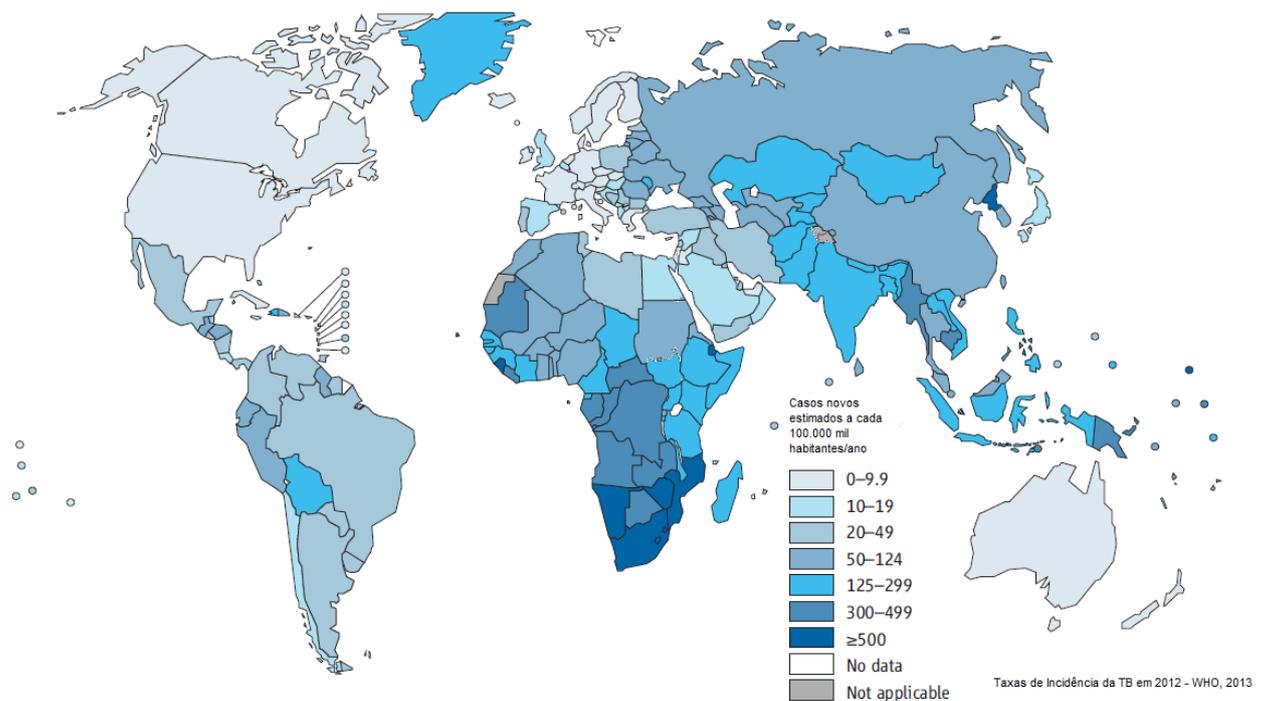


Figura 01. Estimativa da incidência da TB mundial. Figura adaptada de WHO (2013).

Embora a estimativa de incidência no Brasil para o ano de 2012 tenha sido de 92 mil casos, foram notificados 82.755 novos casos no mesmo ano, sendo

aproximadamente 10 mil considerados como TB extrapulmonar. Ainda, dos casos notificados, 50% em média, apresentaram escarro positivo (WHO,2013).

De acordo com o Ministério da Saúde, no ano de 2013 foram notificados 71.123 novos casos de TB no Brasil, com um coeficiente de incidência de 35,4/100.000 habitantes. Mais de 85% dos novos casos foram classificados como TB pulmonar e aproximadamente 65% foram considerados bacilíferos. As regiões Norte, Sudeste e Nordeste apresentaram os maiores valores de coeficientes de incidência, sendo 45,2, 37,1 e 34,7/100.000 habitantes, respectivamente. Os estados federativos Rio de Janeiro, Pernambuco e Amazonas apresentaram os maiores coeficientes de mortalidade, chegando a 4,8, 4,2 e 3,5/100.000 habitantes no ano de 2012 (**tabela 01**) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Tabela 01. Coeficientes de incidência da TB, mortalidade associadas a TB e coeficiente da TB-HIV das unidades federativas do Brasil no ano de 2013. Tabela adaptada de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2014).

Unidade da Federação	Coeficiente de incidência ¹	Coeficiente de mortalidade ^{1,2}	% realização de cultura de escarro de retratamento	% realização de testagem para HIV	% de coinfeção TB-HIV	% de cura de casos novos de tuberculose BK+ ²	% de abandono do tratamento de casos novos de tuberculose BK+ ²
Rondônia	32,2	1,4	20,3	67,9	8,3	68,8	13,8
Acre	41,6	1,1	19,4	67,2	2,2	90,4	3,2
Amazonas	70,6	3,5	26,4	51,7	14,0	71,2	15,0
Roraima	29,7	1,5	33,3	69,0	14,5	80,6	6,0
Para	44,8	2,7	22,0	47,2	7,6	69,6	9,4
Amapá	24,6	2,0	60,0	72,4	6,6	80,9	13,5
Tocantins	14,5	0,6	10,0	49,8	7,0	69,3	4,4
Região Norte	45,2	2,4	24,3	52,2	9,8	71,7	10,9
Maranhão	28,8	2,1	13,8	58,6	7,0	71,2	10,2
Piauí	23,4	1,8	7,9	50,5	5,1	65,7	5,3
Ceará	38,9	2,5	18,9	48,9	7,2	70,3	9,8
Rio Grande do Norte	32,2	2,1	7,8	47,8	11,1	57,0	7,4
Paraíba	28,2	1,9	18,8	56,0	7,3	64,6	13,0
Pernambuco	49,3	4,2	9,8	44,7	11,6	65,8	9,4
Alagoas	32,4	3,0	20,2	40,7	8,9	66,6	10,6
Sergipe	28,2	1,9	25,4	58,5	5,7	74,9	13,3
Bahia	32,1	2,5	14,1	38,8	6,1	61,9	8,1
Região Nordeste	34,7	2,6	14,4	46,6	8,1	65,9	9,3
Minas Gerais	17,9	1,4	14,4	47,1	10,1	64,2	9,1
Espirito Santo	31,1	2,1	45,8	70,8	7,5	77,1	10,1
Rio de Janeiro	61,7	4,8	12,1	51,0	8,3	65,5	12,3
São Paulo	37,5	2,0	54,5	79,0	9,1	82,4	9,8
Região Sudeste	37,1	2,4	37,8	65,9	8,9	74,2	10,6
Paraná	21,0	0,9	33,8	72,6	11,4	76,7	10,6
Santa Catarina	28,2	0,7	58,0	75,5	19,2	74,8	11,6
Rio Grande do Sul	43,2	2,1	33,1	72,2	19,3	63,2	15,1
Região Sul	31,3	1,3	37,3	73,0	17,3	68,7	12,8
Mato Grosso do Sul	32,8	2,5	41,9	51,0	9,3	59,0	7,8
Mato Grosso	50,6	2,6	11,1	40,6	5,3	68,7	8,5
Goiás	14,3	1,2	37,4	57,4	8,2	67,0	11,5
Distrito Federal	10,8	0,5	25,0	63,2	13,2	71,1	6,6
Região Centro-Oeste	24,6	1,6	29,2	49,0	7,6	66,1	9,0
Brasil	35,4	2,3	30,8	59,2	9,8	70,6	10,5

Fontes: Sistema Nacional de Agravos de Notificação/ Secretarias Estaduais de Saúde e Sistema de Informação sobre Mortalidade/SVS-MS

¹ Por 100.000 habitantes

² Dados referentes ao ano de 2012

*Dados provisórios, sujeitos à revisão

1.2.1. TB versus HIV

A coinfeção TB/HIV tem sido uma das maiores preocupações mundiais. A pandemia do HIV/doença modificou não apenas a tendência epidemiológica da TB e

infecções causadas por outras micobactérias, mas também a apresentação clínica da doença, duração do tratamento, resistência às drogas antituberculosas, intolerância medicamentosa e possivelmente a susceptibilidade dos comunicantes (PINTO, 1998; PAVAN, 2009).

Estima-se que 13% dos novos casos de TB mundial, sejam em pessoas HIV-positivas, chegando a 37% na África (**figura 02**). Em 2012, foram observadas 0,3 milhões de mortes devido a coinfeção TB/HIV, porém acredita-se que esses números estejam subestimados, uma vez que muitos óbitos são classificados apenas como morte por HIV, excluindo-se coinfeção com TB (WHO, 2013).

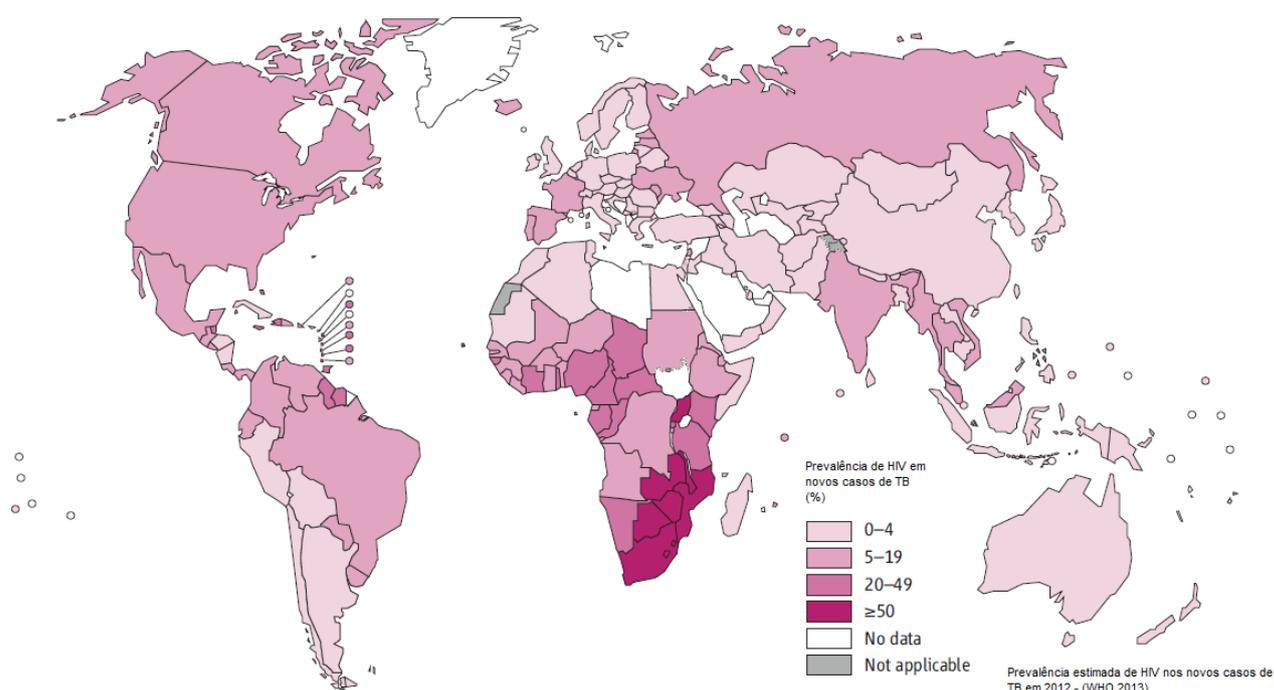


Figura 02. Prevalência de HIV em novos casos de TB mundialmente, no ano de 2012. Gráfico adaptado de WHO (2013).

No Brasil, no ano de 2013, 59,2% dos casos novos de TB realizaram o teste para verificar coinfeção com HIV, valor considerado acima da média mundial quando comparado ao ano de 2012, que foi de 46%. Porém a maior taxa de teste foi

observada na região da África, onde 74% dos novos casos de TB foram testados para verificar coinfeção pelo HIV (MINSITÉRIO DA SAÚDE, 2014; WHO, 2013).

Ainda em 2013, foi observado um coeficiente de TB/HIV de 9,8/100.000 habitantes, em todo o Brasil. A capital de Florianópolis apresentou os maiores índices de coinfeção, seguida de Porto Alegre e Manaus, com coeficientes iguais a 31,5, 26,0 e 18,0/100.000 habitantes respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

1.2.2. TB versus *M. tuberculosis* resistentes versus genótipo W-Beijing

Outra preocupação é a contínua incidência de casos de TB causados por cepas da *M. tuberculosis* resistentes a antibioticoterapia, em especial as classificadas com MDR. A situação da MDR-TB, que se caracteriza pela resistência pelo menos aos fármacos isoniazida (INH) e rifampicina (RMP), preocupa as autoridades sanitárias do mundo inteiro, com níveis de cura menores (variando entre 50 a 70%) do que linhagens susceptíveis (até 95%) (KOUL *et al.* 2011).

Foram estimados no ano de 2012, 450 mil novos casos de TB causada por cepas MDR. Desses, 9,6% foram diagnosticados mais tarde como sendo XDR. No mesmo ano foram relatados casos de XDR-TB em 92 países. Na África estão concentrados os maiores índices, em 2009 foram notificados 467 casos e em 2012, 1.596 casos. As cepas XDR são consideradas resistentes as drogas INH, RMP, a uma fluoroquinolona e a qualquer droga anti-TB de segunda linha injetável. (WHO, 2013; MATTEELLI *et al.*, 2011).

Dentro desse contexto emerge a preocupação com genótipos da *M. tuberculosis* mais frequentemente associados a resistência terapêutica, tal como o W-Beijing.

No ano de 1995, na China, o genótipo Beijing foi pela primeira vez descrito e considerado um dos genótipos da *M. tuberculosis* mais eficiente em causar epidemias. No entanto, cinco anos antes uma cepa multirresistente isolada em Nova Iorque foi nomeada como “W” pela alta capacidade de causar surtos e mortes, que mais tarde, por genotipagem foi caracterizada como pertencente ao genótipo Beijing, denominadas então W-Beijing. Cepas Beijing e W-Beijing exibem perfis moleculares de IS6110 muito semelhantes e ambas estão relacionadas a surtos e grande capacidade de causar morte rápida. No geral o genótipo W-Beijing/Beijing está relacionado à resistência a terapia anti-TB e vacinação pela BCG, mas ainda há controvérsias (PARWATI *et al.*, 2010; GLYNN *et al.*, 2002).

Em um estudo de genotipagem com mais de 39.295 cepas da *M. tuberculosis* de 141 países, observou-se que aproximadamente 50% dos isolados do leste Asiático eram do genótipo W-Beijing. No mundo, aproximadamente 13% dos isolados são do genótipo W-Beijing. A maior associação com resistências aos antimicrobianos foi observada na Rússia e na Estônia, com casos onde o paciente infectado nunca havia recebido tratamento antes (**figura 03**) (ANÔNIMO, 2006).

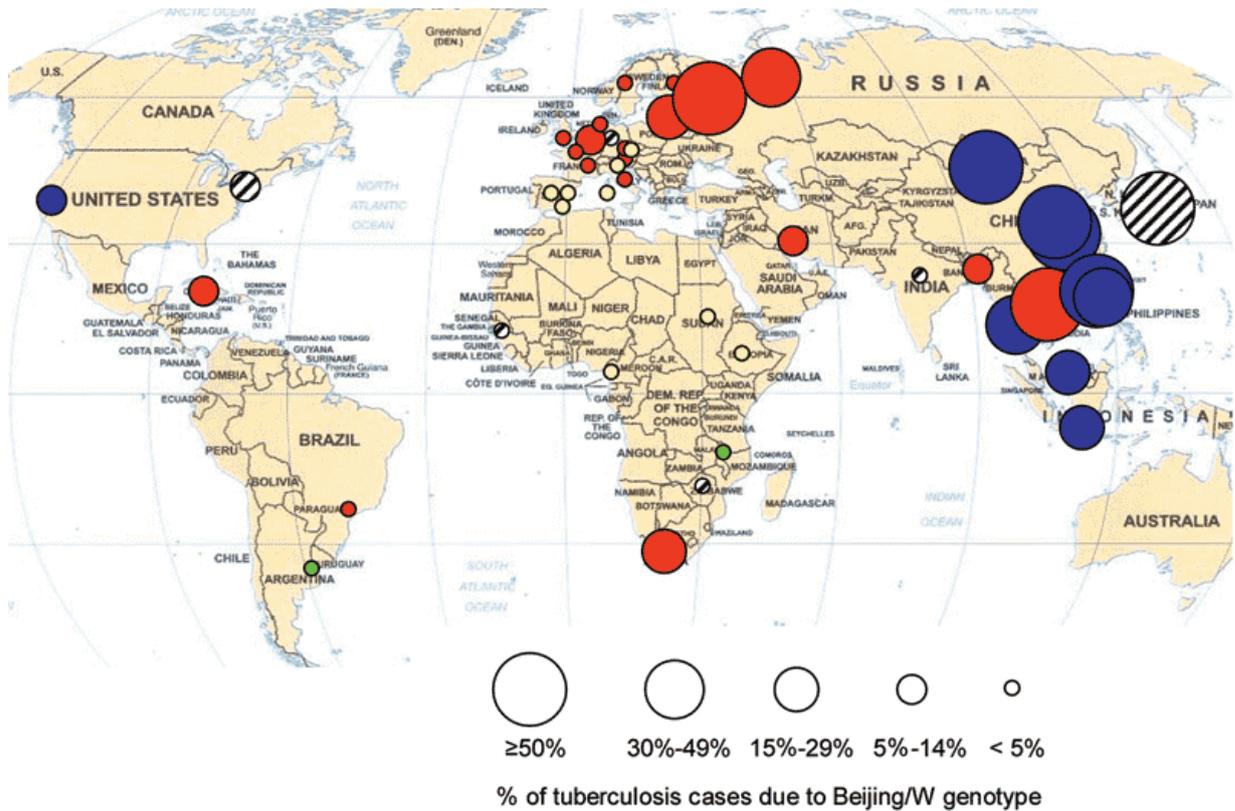


Figura 03. Distribuição das cepas da *M. tuberculosis* W-Beijing associadas a resistência antimicrobiana. Círculo azul: casos onde não houve relação entre as cepas W-Beijing e resistência. Círculo vermelho: casos onde houve relação entre as cepas W-Beijing e resistência antimicrobiana. O tamanho do círculo de diz respeito a percentagem de cepas W-Beijing isoladas. Quanto maior o círculo, maior a percentagem. Figura adaptada de ANÔNIMO (2006).

Genotipicamente as cepas W-Beijing apresentam regiões mais conservadas e intactas quando comparadas aos outros genótipos da *M. tuberculosis*, além de mutações frequentes em genes que conferem resistência as principais drogas anti-TB. Já foram escritas mutações no gene *katG*, *rpoB* e *embB*, que estão relacionadas à resistência a INH, RMP e etambutol (EMB) respectivamente (PARWATI *et al.*, 2010).

Fenotipicamente esse genótipo é mais virulento, capaz de causar TB ativa na maioria das infecções, além de rápida progressão, com altas taxas de mortalidade e cronicidade. As cepas W-Beijing apresentam alta imunogenicidade, induzem intensa

resposta pro-inflamatória e necrose, além da capacidade adaptativa (co-evolução) aos genes de resposta imune, garantindo seu sucesso na infecção (PARWATI *et al.*, 2010).

Além disso, a virulência das cepas W-Beijing confere a estas micobactérias uma acentuada persistência na infecção, levando a uma falha terapêutica e um prolongado período de exposição dos pacientes às drogas antituberculosas. Esta cascata de eventos aumenta a probabilidade de aquisição de resistência antimicrobiana por pressão ambiental, ocasionando um aumento da prevalência/manutenção dessas cepas (HANEKOM *et al.*, 2007).

A acentuada persistência está correlacionada com a capacidade das cepas W-Beijing de modular as respostas imuno-celulares dos hospedeiros. Porém os mecanismos moleculares envolvidos nesta regulação ainda não foram completamente esclarecidos e até hoje apresentam divergências quanto ao perfil de expressão de proteínas pro e anti-inflamatórias em infecções pela W-Beijing (HANEKOM *et al.*, 2011).

Zhang e colaboradores (1999) não observaram diferenças no perfil de citocinas pro e anti-inflamatórias (TNF- α , IL12, IL6 e IL10) em infecções causadas por cepa W-Beijing em comparação a uma não W-Beijing. Em contrapartida outros estudos tem mostrado resultados divergentes (**tabela 02**) (HANEKOM *et al.*, 2011).

Tabela 02. Relação de estudos que apresentaram diferentes resultados quanto ao perfil de expressão de citocinas pro e anti-inflamatórias de infecções pela W-Beijing em comparação a cepas não-Beijing. Tabela adaptada de Hanekom e colaboradores (2011)

Diferença na expressão de citocinas de infecções com diferentes genótipos de *M. tuberculosis*

Publicações	Cepas genótipo Beijing	Cepas Não-Beijing
Zhang et al., 1999	TNF- α , IL-6, IL-10	e IL-12 igualmente induzidos
Manca et al., 2001	↓ TNF- α , IL-12, IL-6, IFN- γ	↑ TNF- α , IL-12, IL-6, IFN- γ
Engele et al., 2002	↑ TNF- α	↓ TNF- α
Manca et al., 2004	↓ TNF- α , IL-12 ↑ IL-4, IL-13	↑ TNF- α ↓ IL-4, IL-13
Chacón-Salinas et al., 2005	↑ TNF- α , IL-12, IL-1 β ↓ IL-10	↓ TNF- α , IL-12, IL-1 β ↑ IL-10
Wong et al., 2007	Não determinado	↓ TNF- α
Rocha-Ramirez et al., 2008	↑ TNF- α , IL-10	↓ TNF- α , IL-10
Tanveer et al., 2009	↓ TNF- α , IFN- γ	↑ TNF- α , IFN- γ
Wang et al., 2010	↓ IL-6, IL-10, TNF- α , GRO- α	↑ IL-6, IL-10, TNF- α , GRO- α

1.3. RESISTÊNCIA VERSUS QUIMIOTERAPIA

O tratamento da TB consiste basicamente no uso de quatro principais medicamentos, a INH, RMP, pirazinamida (PZA) e EMB ou uma estreptomicina, por um período de seis a nove meses. Em casos de MDR-TB há a adição de quatro drogas de segunda linha, que podem ser uma fluoroquinolona, um injetável (canamicina, amicacina, capreomicina ou viomicina), uma tioamida (etionamida ou protionamida), e uma cicloserina ou teridizona, com duração de tratamento de no mínimo 20 meses (CRUZ-KNIGHT & BLAKE-GUMBS, 2013).

No Brasil os casos novos de TB em adultos ou adolescentes, pulmonar ou não (com exceção da forma meningoencefálica), infectados ou não pelo HIV são

tratados com um regime de quatro drogas combinadas e doses de acordo com o peso. Por dois meses o paciente recebe diariamente de 2 a 4 comprimidos (20 – 50kg) composto pelas quatro drogas INH (75mg), RMP (150mg), PZA (400mg) e EMB (275mg) em dose fixa combinada. Em seguida é realizado um período de quatro meses de manutenção e o paciente recebe diariamente de 1 a 2 comprimidos ou cápsulas (20 – 50kg) composto por RMP (150 – 300mg) e INH (100 – 200mg) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Embora a RMP e a INH sejam ainda os fármacos de primeira linha mais potentes para eliminar a *M. tuberculosis*, o tratamento da TB tem se tornado cada vez mais difícil, em decorrência do aumento dos casos de resistência e pelo fato do arsenal de fármacos disponíveis no mercado ser pequeno (PINTO, 1998; ZUMLA *et al.*, 2014).

Mais de 17% dos isolados da *M. tuberculosis* estão associados a mono ou multirresistência às drogas de primeira linha e a INH é a droga mais comumente associada a resistência seguida da RMP. A seleção de clones resistentes da *M. tuberculosis* se dá principalmente por mutação espontânea e pressão ambiental, devido a antibioticoterapia, principalmente pela longa duração do tratamento e falta de aderência. A própria vacinação pela BCG pode selecionar clones resistentes principalmente em casos de cepas W-Beijing (CRUZ-KNIGHT & BLAKE-GUMBS, 2013; PARWATI *et al.*, 2010).

Muitas resistências descritas na literatura estão relacionadas com mutações em genes específicos da *M. tuberculosis*. Zhang & Yew (2009) descreveram algumas das principais mutações associadas a mono ou multirresistência. Foram observadas mutações localizadas nos genes *katG*, *inhA*, *rpoB*, *pncA*, *embB*, *rpsL*,

ahpC, *inhA*, *thyA*, dentre outras relacionadas com a resistência as drogas de primeira linha anti-TB.

As próprias características constitutivas das micobactérias determinam resistências intrínsecas aos antibióticos de amplo espectro e aos fármacos utilizados no tratamento da TB. A principal característica é a constituição da sua parede celular, de alto conteúdo lipídico, que dificulta a entrada dos antibióticos no interior do bacilo. Além disso já foram descritos receptores e enzimas micobacterianas que impedem a ação de fármacos, como os beta-lactâmicos e aminoglicosídeos (BARRERA, 1994).

Outra característica que determina o sucesso do bacilo e progressão da TB é a capacidade da *M. tuberculosis* de sobreviver no interior de macrófagos, sendo capaz de modular vias metabólicas específicas que culminam na evasão do sistema imunológico. A persistência intramacrofágica dos bacilos pode levar a uma tolerância a ação dos fármacos comumente utilizados no tratamento da TB, como a INH e RMP, principalmente pelo aumento na expressão de proteínas de efluxo, como a MtbRv1258c. Além disso, o ambiente intramacrofágico é de difícil acesso aos fármacos, que muitas vezes apresentam boa atividade bactericida *in vitro* mas não conseguem refletir o mesmo resultado em macrófagos infectados (ADAMS *et al.*, 2011).

Dentro dos macrófagos e no interior do granuloma, a *M. tuberculosis* pode ainda entrar em um estado metabólico reduzido, caracterizado pela dormência/latência, que além de dificultar a ação das drogas, consegue sobrepujar os mecanismos imuno celulares de reconhecimento e eliminação do bacilo (GOMEZ E MCKINNEY, 2004).

A persistência intra e extramacrofágica das cepas da *M. tuberculosis* além de estar associada a fatores de virulência, tem sido considerada fundamental para o sucesso da *M. tuberculosis* na humanidade e, sugerida, como um dos importantes mecanismos relacionados ao desenvolvimento de resistência as drogas (GOMES E MACKINNEY, 2004; PARWATI *et al.*, 2010).

1.4. IMUNOLOGIA DA TB

1.4.1. Resposta Imunológica versus Granuloma

As manifestações clínicas da TB decorrem de complexas interações entre o bacilo e a resposta imunológica dos indivíduos infectados e embora a *M. tuberculosis* seja capaz de parasitar, crescer e sobreviver dentro de macrófagos, apenas uma minoria de indivíduos infectados desenvolvem a doença propriamente dita (MARINO & KIRSCHNER, 2004).

O curso da doença depende de uma série de fatores, a começar pela carga inicial de infecção, que está diretamente relacionada com o tempo e a intensidade de exposição aos indivíduos infectados. Outro fator se diz respeito a virulência da cepa da *M. tuberculosis* e estado imunológico do hospedeiro (DHEDA *et al.*, 2010).

Ao inspirar se infectar pelo bacilo, ocorre o início de uma lesão inicial e formação de um tubérculo ou granuloma primário constituído principalmente de macrófagos residentes (alveolares) ou DCs infectados em regiões subpleurais do pulmão (CRUZ-KNIGHT & BLAKE-GUMBS, 2013).

Macrófagos alveolares ou DCs infectados com o bacilo induzem uma intensa resposta inflamatória local, ativando vias do sistema imune inato e adaptativo,

principalmente via células Th1. Estas respostas levam ao recrutamento e acúmulo de outros macrófagos, linfócitos e DCs ao local da infecção. Ocorre ainda uma alteração morfológica e funcional das células imunológicas, bem como um remodelamento tecidual para a formação de um granuloma maduro, a assinatura histopatológica da TB (**figura 04**) (BRIGHENTI & ANDERSSON, 2012).

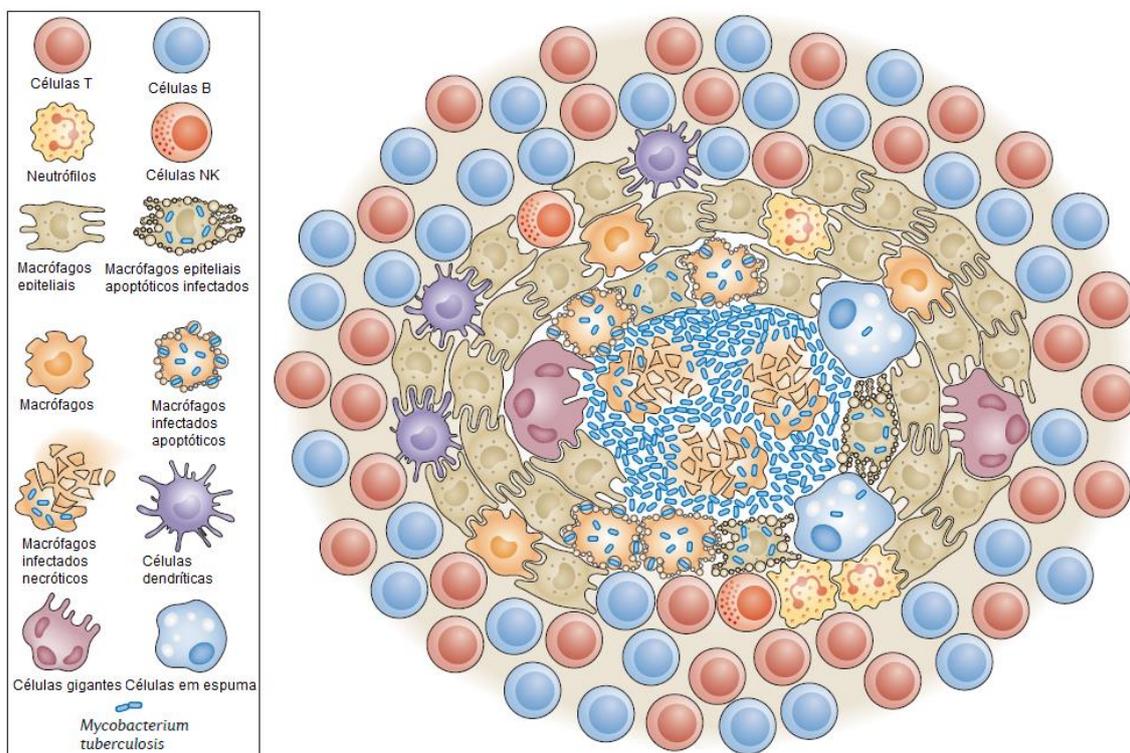


Figura 04. Representação do granuloma em infecções pela *M. tuberculosis*. No centro do granuloma estão localizados os bacilos e macrófagos infectados já em processo de necrose. Em volta há um infiltrado celular contendo outros macrófagos e DCs na região mais interna, sendo alguns deles já em processo de apoptose. Externamente há um acúmulo de células T e B. Alguns macrófagos geralmente se unem centralmente para a formação de células gigantes multinucleadas e eventualmente podem se diferenciar em células espumosas, caracterizadas pelo alto conteúdo lipídico. Figura adaptada de Ramakrishnan (2012).

A estabilização da infecção e manutenção do granuloma requer um delicado equilíbrio entre uma resposta pro e anti-inflamatória, mediadas principalmente pela

ativação do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e Interferon gama (IFN- γ) e pela ativação da Interleucina 10 (IL10), seus contra-reguladores (MIRANDA *et al.*, 2012).

Embora o granuloma seja suficiente para conter a infecção e prevenir a ativação da doença, este não é capaz de erradicar a infecção, podendo mantê-la em um estado latente, com indivíduos assintomáticos, que podem vir a desenvolver a doença pela reativação do bacilo (ESTRELLA *et al.*, 2011; MARINO & KIRSCHNER, 2004).

Ainda, estudos correlacionam a formação do granuloma primário com o sucesso do bacilo e manutenção da infecção, com maiores taxas de multiplicação da *M. tuberculosis* e disseminação nesta fase (DAVIS & RAMAKRISHNAN, 2011).

A função do granuloma é de, em tese, conter o bacilo, porém algumas cepas, geralmente mais virulentas, fazem uso de mecanismos adaptativos e de modulação da resposta imune celular dos macrófagos infectados, aproveitando o infiltrado celular para o seu benefício. Algumas cepas da *M. tuberculosis* são capazes de causar morte excessiva dos macrófagos, por necrose (granuloma caseoso), criando um meio extracelular favorável para seu rápido crescimento e disseminação (**figura 05**) (RAMAKRISHNAN, 2012).

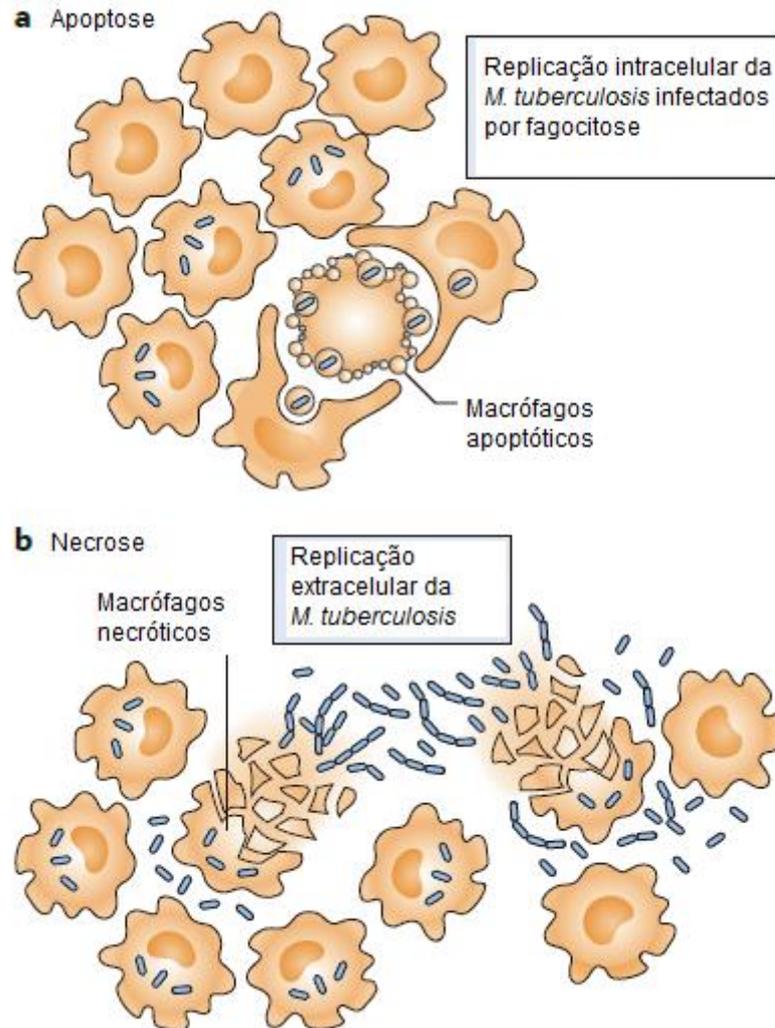


Figura 05. Relação das mortes celulares no interior do granuloma versus replicação da *M. tuberculosis*. **a** - apoptose: na morte celular programada por apoptose há um crescimento intracelular de bacilos da *M. tuberculosis* controlado. **b** - necrose: na morte celular por necrose, programada ou acidental, há multiplicação bacilar extracelular excessiva, benéfica para a manutenção e disseminação da micobactéria. Figura adaptada de Ramakrishnan (2012).

1.4.2. Resposta Imune Inata versus TB

Após a entrada do bacilo no pulmão, por meio de aerossóis, ocorre primeiramente o reconhecimento da *M. tuberculosis* através de receptores contidos principalmente nas membranas de macrófagos e DCs (DHEDA *et al.*, 2010).

O reconhecimento inicial dos bacilos pelos macrófagos é mediado por receptores principalmente do tipo *Toll-Like* (TLR), complemento, manose, *scavenger*, NOD2 e DC-SIGN. Esses receptores reconhecem, na sua maioria, lipoproteínas, lipoarabinomananas, fosfatidilinositol manosídeo, dentre outras moléculas da micobactéria (DHEDA *et al.*, 2010).

Após o reconhecimento, especialmente pelos receptores TLR2 e TLR4, é iniciada a cascata de ativação metabólica imunológica, principalmente pelo aumento da expressão do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) que induz a transcrição de genes que codificam para citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL1 β , IL12, IL18) e quimiocinas. Além disso, a ativação via TLR2 induz a cascata de metabolização da vitamina D (VD), aumentando a expressão de receptores da VD (VDR) e da enzima D-1-hidroxilase, que converte a VD na sua forma ativa (LIU *et al.*, 2006 *apud* DHEDA *et al.*, 2010)

A VD também determina um papel importante na resposta imune frente a infecção pela *M. tuberculosis*. Durante a infecção, macrófagos aumentam a expressão de VDRs, promovendo quimiotaxia, aumento fagocitose, processamento de antígeno, produção superóxidos e produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL1-beta e TNF- α , para eliminar a infecção. Além da VD, outras vitaminas determinam papel importante na TB. Estudos demonstram que macrófagos expostos a vitamina A (ácido retinóico – VA) antes e após a infecção pela *M. tuberculosis* são capazes de sobreviver mais tempo por impedirem a excessiva multiplicação intramacrofágica dos bacilos (ESTRELLA *et al.*, 2011).

Além da produção de citocinas pro-inflamatórias e quimiocinas, os macrófagos e DCs secretam moléculas antimicrobianas, que induzem a produção de catelicidinas e β -defencinas. Aditivamente há uma ativação de células NK, $\gamma\delta$ T e T

CD1⁻, que induzem a produção de IFN- γ , responsável pela ativação de mais macrófagos e produção de mais TNF- α , além de radicais reativos de nitrogênio (NOS) (FLYNN *et al.*, 2001 *apud* DHEDA *et al.*, 2010)

Paralelamente ocorre uma indução da autofagia via IFN- γ , como um mecanismo complementar antimicrobiano. Conseqüentemente ocorre uma maturação e acidificação do fagossoma, eliminando a micobactéria contida nele (GUTIERREZ *et al.*, 2004).

1.4.3. Resposta Imune Adaptativa versus TB

A intercorrelação entre a resposta imune celular inata e a resposta adaptativa ocorre basicamente via apresentação de antígenos por macrófagos e DCs infectados pela *M. tuberculosis* às células T (incluindo T CD4 e T CD8) e B, juntamente a produção de citocinas pro inflamatórias, TNF- α e IL12 principalmente (DHEDA *et al.*, 2010).

Peptídeos micobacterianos são apresentados a células T CD4 via MHC da classe II, enquanto que a ativação de células T CD8 ocorre pela apresentação de antígenos presentes no citosol ou corpos apoptóticos contendo peptídeos micobacterianos via MHC da classe I (KAUFMANN *et al.*, 2010).

As células T CD4 podem se polarizar em quatro populações: Th1, Th2, Th17 e Treg, dependendo dos estímulos recebidos e um balanço entre essas populações determina um controle mais eficiente da TB e sucesso em eliminar o bacilo (MOSMANN & SAD, 1996; KORN *et al.*, 2009; BELKAID & TARDELL, 2009).

O IFN- γ e a IL12 induzem uma resposta protectora via Th1, enquanto que a resposta Th2 é ativada via IL4 e IL10. Em tese, a resposta mediada via Th1 leva a

um controle da infecção e manutenção do granuloma. As respostas via Th2 e Treg fazem o contrabalanço da resposta Th1, principalmente pela liberação de citocinas anti-inflamatórias IL4 e IL10 e estão associadas a formação do granuloma caseoso e disseminação da micobactéria (**figura 06**) (KAUFMANN *et al.*, 2010; O'GARRA *et al.*, 2013).

A resposta protectora relacionada com a activação de Th1 e a participação das citocinas pro-inflamatórias TNF- α , INF- γ , IL12, IL1 β está associada a maturação e acidificação do fagolisossomo, indução da apoptose, produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de NOS, que apresentam actividade bactericida contra a *M. tuberculosis*. Além disso, é necessário um contrabalanço desta resposta pela activação de citocinas anti-inflamatórias IL4, IL10 e TG β , para que não haja uma exacerbação da resposta inflamatória (O'GARRA *et al.*, 2013).

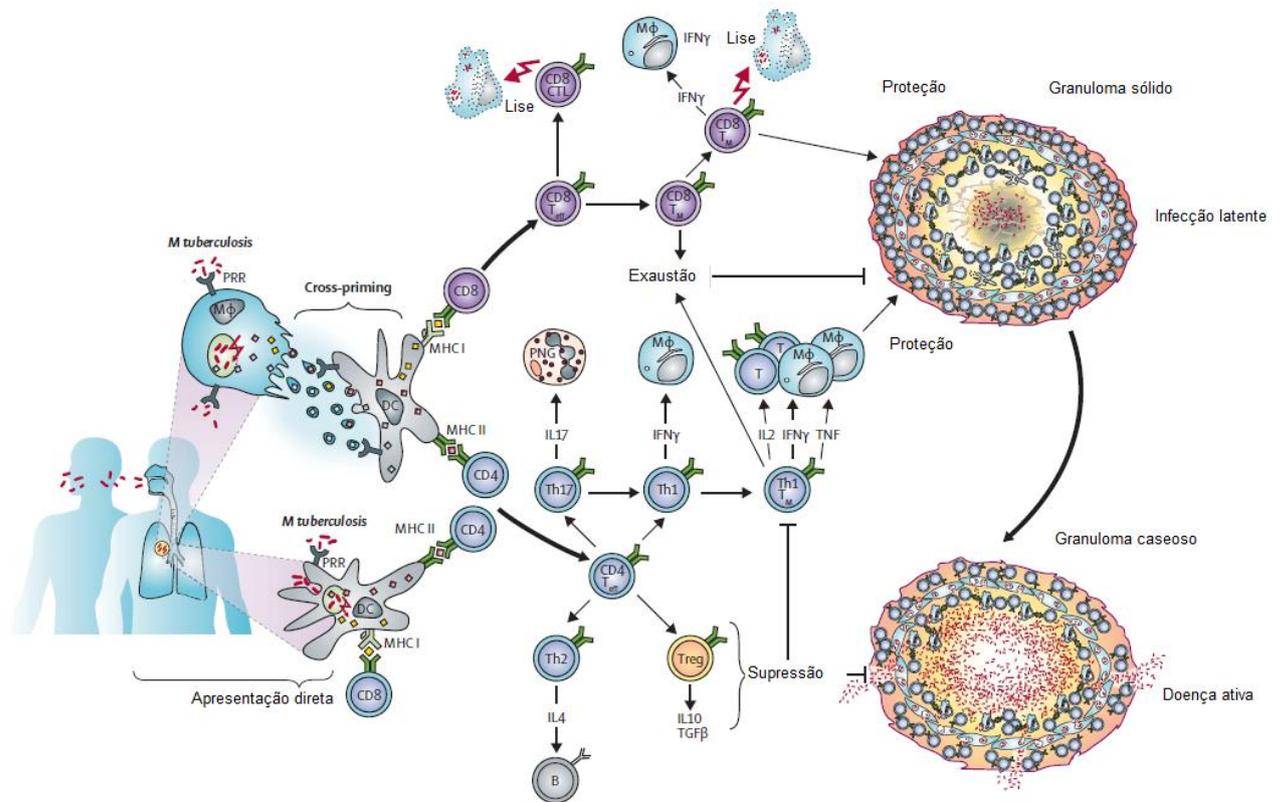


Figura 06. Representação da resposta imune adaptativa frente a infecções pela *M. tuberculosis*. Peptídeos micobacterianos são apresentados a células T CD4 via MHC da classe II. A ativação de células T CD8 ocorre pela apresentação de antígenos presentes no citosol ou corpos apoptóticos contendo peptídeos micobacterianos via MHC da classe I. As células T CD4 se diferenciam em quatro populações Th1, Th2, Th17 e Treg. Th1 induz a produção de citocinas pro-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL2 que ativam outros macrófagos e células T, levando a formação do granuloma sólido e controle da infecção. Th17 ativa células polimorfonucleadas (PMN) e Th1. Células Th2 e Treg produzem citocinas anti-inflamatórias IL4, IL10 e TGF β que contra-balanceiam a resposta Th1 e podem levar a supressão da resposta inflamatória e formação do granuloma caseoso com conseqüente disseminação do bacilo. As células T CD8 citotóxicas ativam a apoptose de outros macrófagos infectados pela *M. tuberculosis*. Figura adaptada de Kaufmann e colaboradores (2010).

1.4.4. Inibição da Resposta Imune versus TB

Algumas cepas da *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulência são capazes de evadir dos mecanismos imune celulares, principalmente dos macrófagos, pela modulação de vias metabólicas de ativação dessas respostas ou

ainda pela produção de proteínas protetoras, resultando em uma maior persistência/sucesso do bacilo na infecção (SAKAMOTO, 2012).

O sucesso na infecção está diretamente relacionado com a capacidade do bacilo em permanecer viável dentro do macrófago. Cepas da *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulências, incluindo a cepa W-Beijing, apresentam padrões distintos de persistência intramacrofágica. Estas diferenças se dão pela expressão de genes específicos entre as cepas, que codificam proteínas capazes de interferir na modulação de rotas metabólicas/imunológicas dos macrófagos, culminando na evasão dos bacilos (**tabela 03**) (MEENA E RAJNI, 2010; SAKAMOTO, 2012).

Tabela 03. Relação dos fatores de virulência da *M. tuberculosis* associados a modulação da resposta imune celular de macrófagos e outros tipos celulares

Fator	Mecanismos
Proteínas/Gene	Imunomodulação
ESAT-6 (<i>esxA</i>) e CFP-10 (<i>esxB</i>)	Estimulação de células T, eliciação de DTH, redução na produção de ROS em macrófagos, Bloqueio da sinalização via TLR2, formação de poros, apoptose, citólise
α -cristalina (<i>acr</i>)	Antigênico, ativação da latência
Antígeno 85 - complexo (<i>fbpA</i> , <i>fbpB</i> , <i>fbpC</i>)	Antigênico, mediadores de ataque a macrófagos, sobrevivência intracelular/metabolismo
Erp (<i>erp</i>)	Crescimento intracelular
Transportador de Colesterol (Mce4)	Captador de colesterol, importante para sobrevivência em fases crônicas
Suporte de Enzimas e lipídeos (<i>igr locus</i>)	Crescimento bacteriano - metabolismo do colesterol
Isocitrato liase (<i>icIL</i>)	Importante em fases crônicas, persistência - utilização de lipídeos como fonte de carbono
Catalase-peroxidase-peroxinitrase (<i>katG</i>)	Proteção contra ROS e NOS
Alquil-hidroperóxido redutase (<i>ahpC</i>)	Proteção contra ROS e NOS
Superoxido dismutase (<i>sodA</i> , <i>sodC</i>)	Proteção contra ROS e NOS
Oxido Nítrico redutase (<i>noxR3</i>)	Proteção contra ROS e NOS
Componentes da Parede celular	
Lipoarabinomanana	Inibição da maturação de DCs e indução de IL10
ManLAM	Inibição da maturação do fagolisossomo, proteção contra ROS, bloqueio da transcrição de genes induzíveis por IFN- γ
Ácidos micólicos	Formação do granuloma, ativação de macrófagos, sobrevivência da micobactéria, formação de biofilme
Glicopeptideolipídeos	Formação de biofilme
Dimicolate de trealose	Formação do granuloma, ação pró-inflamatória, caquexia, redução de NAD, danos a membranas celulares do hospedeiro, indução de apoptose, inibição da junção do lisossomo com o fagossomo
Glicolipídeos fenólicos	Imunossupressão
Sulfolipídeos	Aumento da infectividade de macrófagos, inibição da maturação do fagossomo, bloqueio de IFN- γ

O macrófago é considerado um importante efetor na resposta imune contra a *M. tuberculosis*. Após serem ativados, estes aumentam de diâmetro e o número de vacúolos fundidos com os fagolisossomas distribuídos no citoplasma. No seu interior o ambiente torna hostil para os bacilos, principalmente pelo pH muito baixo, baixa tensão de oxigênio (hipóxia), e pela alta quantidade de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e óxido nítrico (NO), que na maioria das vezes é suficiente para matar as micobactérias (KIRSCHNER & MARINO, 2004).

Porém já foram descritos mecanismos neutralização desses eventos pelas *M. tuberculosis*, tanto pelo aumento da expressão de proteínas protetoras, como catalases e peroxidases (*katG*, *ahpC*, *soda*, *sodC*, *noxR3*), como pela produção de amônias que alcalinizam o meio, dentre outros (**tabela 03**) (MANCA *et al.*, 1999; SHERMAN *et al.*, 1996; DUSSURGET *et al.*, 2001; RUAN *et al.*, 1999).

Além disso, estudos demonstram a participação de pequenos RNAs não codificadores (sRNA) no processo de persistência micobacteriana intramacrofágica (DICHIARA *et al.*, 2010; ROSEMBERG, 2001).

No processo de persistência da *M. tuberculosis* é necessária a expressão coordenada de genes que determinam a virulência bacteriana, inclusive aqueles envolvidos no metabolismo primário e secundário, assim como genes de processamento de parede celular. Os ácidos graxos são a principal fonte de carbono e energia para cepas da *M. tuberculosis* persistentes, e em momentos onde a geração de piruvato a partir da glicólise é drasticamente reduzida, o carbono é obtido por β -oxidação. Genes como o *icl* e *gcvB*, codificam proteínas essenciais para estas vias e portanto para a manutenção da persistência micobacteriana. Estudos demonstram que bacilos mutantes para o gene *icl* são marcadamente atenuados em

macrófagos ativos. Outros genes relacionados ao metabolismo celular, como os *narGHJI*, *nark2*, *narX*, também estão descritos como essenciais para manutenção da persistência da *M. tuberculosis*, por atuarem em vias de adaptação a hipóxia (XIAOZHEN *et al.*, 2011).

Genes relacionados com a síntese da parede micobacteriana também foram descritos como essenciais para o processo de persistência do bacilo. O gene *pcaA*, que codifica uma enzima requerida na síntese de ácidos micólicos e do fator corda, parece estar relacionado com a resistência a ação das ROS e NOS. Outros genes, tais como, *mprA*, *doS*, *rel_{mtb}*, *hspX*, *hsp70*, *katG* e da família *sigma*, relacionados às vias de transdução de sinal e as respostas ao estresse bacteriano também já foram descritos como essenciais para a manutenção da persistência da *M. tuberculosis* (XIAOZHEN *et al.*, 2011; DUBNAU & SMITH, 2003).

Um dos mecanismos bem conhecido utilizado pela *M. tuberculosis* para evadir das defesas dos macrófagos, é o bloqueio da indução de maturação do fagossoma em fagolisossoma. Neste processo há a participação direta do gene *treS* que codifica um dissacarídeo, a trealose, que além de atuar como protetor contra estresse provocado por choque térmico, desidratação e hipóxia em *M. tuberculosis* não replicantes, protege o bacilo da ação bactericida do macrófago, por impedir a fusão do fagossomo com o lisossomo (**tabela 03**) (XIAOZHEN *et al.*, 2011; BERMUDEZ *et al.*, 2006).

Bermudez e colaboradores (2006) também descreveram a presença de um *operon* em cepas da *M. tuberculosis* que inibe a apoptose em macrófagos. Eles descrevem mais de sete genes que codificam proteínas trans-membranas, proteínas de secreção, dentre outras, que parecem interferir nas vias de apoptose do macrófago, aumentando a persistência do bacilo dentro desta célula. A morte

programada de macrófagos representa um importante mecanismo na resposta imunológica contra patógenos intracelulares, e cepas virulentas da *M. tuberculosis*, apresentam fortes mecanismos anti-apoptóticos (expressão do gene *nuoG*) que levam a uma maior persistência intramacrofágica (VELMURUGAN *et al.*, 2007).

2. PROBLEMÁTICA VERSUS JUSTIFICATIVA

Muitos autores têm avaliado a interação micobactéria-macrófago, porém ainda existem lacunas a serem preenchidas, principalmente no que se diz respeito aos mecanismos de evasão das *M. tuberculosis* hipervirulentas, tais como as cepas W-Beijing. Até o presente momento não foi possível determinar um perfil imunomodulatório associado especificamente a estas cepas e muitos dos resultados disponíveis, ainda são contraditórios (**tabela 02**).

Aditivamente não existem estudos mais amplos que descrevem sistematicamente todas as variações nas respostas dos macrófagos frente a infecções por cepas da *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulência, incluindo a cepa W-Beijing, por sequenciamento maciço em larga escala.

A compreensão dos mecanismos pelos quais alguns bacilos conseguem permanecer viáveis dentro do granuloma ou dentro de macrófagos é necessária para o conhecimento da doença TB e o entendimento das vias metabólicas envolvidas na interação bacilo-macrófago podem trazer informações úteis para a seleção de novos alvos terapêuticos e desenvolvimento de novos fármacos pelas indústrias farmacêuticas.

Dentro desse contexto, a análise da expressão global de genes (RNA-seq/transcriptoma) realizada por sequenciamento maciço em plataformas de última

geração, tem facilitado a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de persistência intramacrofágica de cepas da *M. tuberculosis* (LAMICHHANE, 2010).

De acordo com Waddell (2010), a caracterização das mudanças fisiológicas de macrófagos infectados com diferentes cepas da *M. tuberculosis* ajudará na elucidação dos mecanismos que influenciam a patogenicidade das micobactérias. Essas mudanças metabólicas que estão associadas à virulência, patogenicidade e perfil de resistência de diferentes cepas da *M. tuberculosis*, são essenciais para a sobrevivência do bacilo em ambientes propícios ou não ao seu crescimento.

Uma melhor compreensão de todas as vias metabólicas/imunológicas moduladas durante o sucesso de bacilo em evadir das defesa do macrófago pode trazer novas informações importantes quanto as principais moléculas envolvidas nestes processos, que futuramente poderiam ser utilizadas como protótipos/alvos para novos medicamentos adjuvantes às drogas anti-TB já disponíveis no mercado.

Tendo conhecimento dos nichos relativos a interação bacilo-macrófago, da situação da TB mundialmente e da necessidade de seleção de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou adjuvantes bactericidas ou que bloqueiem a persistência bacilar, o presente trabalho justifica-se ao comprometer-se trazer informações importantes pertinentes quanto aos mecanismos envolvidos na evasão bacilar dos macrófagos de cepas da *M. tuberculosis* hipervirulentas, em termos moleculares.

Para isso, foram realizados estudos *in vitro* com linhagem celular THP1 diferenciada em macrófagos, infectadas com diferentes cepas da *M. tuberculosis*, incluindo uma cepa W-Beijing e a cepa padrão H37Rv, para a avaliação da persistência intramacrofágica, tendo como ponto de vista a análise global da expressão de genes dos macrófagos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Comparar os transcriptomas de macrófagos infectados pelas cepas da *M. tuberculosis* com variado perfil de virulência, por sequenciamento de alto desempenho em plataforma *HiScan Genome Analyzer* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil transcriptômico de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv;
- Avaliar as diferenças nos perfis de persistência intramacrofágica de cepas da *M. tuberculosis*, incluindo cepa W-Beijing 1471 e cepa padrão H37Rv, pela análise comparativa dos transcriptomas;
- Avaliar as possíveis interferências nas rotas metabólicas dos macrófagos infectados procurando possíveis mecanismos de que estejam envolvidos na evasão do bacilo das defesas do macrófago, utilizando ferramentas de bioinformática como Ingenuity™.

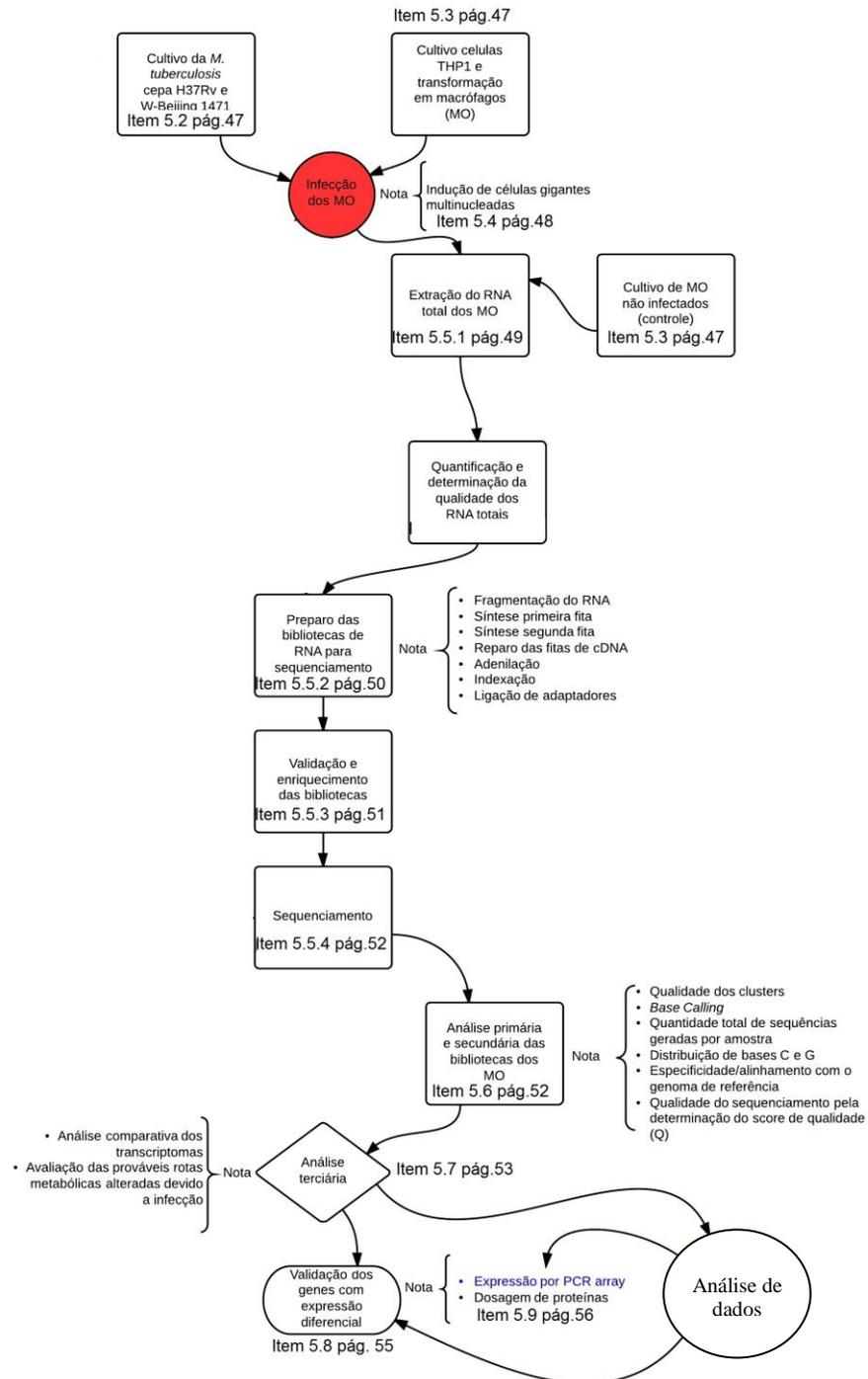
4. RESULTADOS ESPERADOS

Espera-se que com este estudo seja possível determinar os mecanismos moleculares envolvidos na evasão bacilar relacionado com a persistência

intramacrofágica de cepas da *M. tuberculosis*, utilizando ferramenta de NGS. O entendimento permitirá estabelecer mecanismos de resposta entre bacilo-macrófago e, definir especificamente as moléculas envolvidas na adaptação de ambos no processo de persistência do bacilo e sobrevivência do macrófago infectado.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL



5.2. CULTIVO DAS CEPAS DA *M. tuberculosis*

Foram utilizadas uma cepa de referência da *M. tuberculosis* H37Rv ATCC 27294 (*American Type Collection Culture*), proveniente da micobacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao Diagnóstico, sob coordenação do Prof. Mário Hiroyuki Hirata, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e uma cepa W-Beijing Moderna 1471 isolada na Rússia e cedida pela Prof^a Elena Lassounskaia da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil.

Após descongelamento, as cepas foram inicialmente cultivadas em meio líquido Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, USA) acrescido de 10% de suplemento OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) à 35°C por 20 dias. Em seguida, foi realizado um repique em meio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, USA) acrescido de 10% de suplemento OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e 0,05% de *tween* 20 à 35°C por aproximadamente 15 dias.

Todas as etapas de manipulação desses microrganismos foram realizadas em laboratório de Biossegurança Nível 3 (NB-3), utilizando cabine de segurança biológica classe II B2.

5.3. TRANSFORMAÇÃO DE THP1 EM MACRÓFAGOS E INFECÇÃO COM A *M. tuberculosis*

Foi utilizada a linhagem celular de leucemia monocítica de sangue periférico - THP1 (ATCC® TIB-202) para obtenção dos macrófagos. As células THP1 foram mantidas a 37°C a 5% CO₂ em meio RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO,

EUA) com 10% de SFB inativado, 50 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de penicilina. Para transformação em macrófagos, as células foram incubadas por 24h com 30 ng/ml de *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) e distribuídas em placas de cultura de seis poços TPP (Techno Plastic Products, AG, Trasadingen, Switzerland), contendo $1,0 \times 10^6$ células/poço. Em seguida foi adicionado um µM de VA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e VD (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 72h.

Para infecção, uma suspensão micobacteriana foi centrifugada a 500 rotações por minuto (rpm) por dois minutos e o sobrenadante, contendo as células individuais foi utilizado para quantificação pela determinação da Densidade Ótica (D.O.) por espectrometria. 1×10^6 de macrófagos/mL foram infectados separadamente com as cepas W-Beijing 1471 e H37Rv de *M. tuberculosis* em uma relação de 10 bactérias para uma célula (MOI 10) durante um a 12 dias, á 37°C e 5% CO₂ (Sanio, Osaka, Japão). Após 24 horas de infecção, as células foram lavadas três vezes com RPMI estéril para remoção dos bacilos não fagocitados. A cada 48 horas o meio de cultura foi trocado e a cada cinco dias novas células THP1 previamente ativadas com VA e VD foram adicionadas, de forma que houve manutenção da cultura por longos períodos (ESTRELLA *et al.*, 2011).

5.4. INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS

A indução de células gigantes multinucleadas foi efetuada de acordo com os procedimentos descritos por Estrella e colaboradores (2011), exceto que o meio de cultura das células previamente infectadas, foi substituído a cada 48 h, por novo meio RPMI suplementado com as VA e VD. Ainda, a cada cinco dias, novas células THP1 ativadas (1µM de VA e VD, por 72 horas), mas não infectadas, foram

adicionadas ao meio para uma concentração final de 10^6 células/mL. As novas células adicionadas ao meio sofreram fusão com as células já aderidas a placa para formação de células gigantes multinucleadas. Desta forma, o cultivo pôde ser mantido e estudado por até 12 dias (ESTRELLA *et al.*, 2011).

Todos os procedimentos de cultura e infecção foram efetuados com trocas de informações com o Prof. Chinnaswamy Jagannath, da Universidade do Texas, EUA, o qual desenvolveu a técnica de formação e manutenção de células gigantes multinucleadas.

5.5. ANÁLISES DOS TRANSCRIPTOMAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM AS CEPAS DA *M. tuberculosis* W-BEIJING 1471 E H37RV

5.5.1. Extração de RNA dos macrófagos infectados

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. A extração do RNA total dos macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* foi realizada no tempo zero e no decorrer de 12 dias de infecção, com o *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Gathersburg, MD, EUA) conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Para remoção dos RNA ribossomais (rRNA), um equivalente a 10 μ g de RNA total foram purificados com o *RibominusTM Transcriptome Isolation Kit (Human and Mouse)* (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA). Foram realizadas hibridizações do RNA total com sondas específicas para as porções 28 e 18S ribossomais. Estas sondas contém na sua região 5' uma molécula de biotina, que promoveu a depleção do rRNA pela complexação com as *RiboMinusTM Magnetic Beads* (microesferas) contendo streptavidina fornecidas pelo fabricante. Em seguida, para remoção do

DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase I (Invitrogen by Life Technologies, CA, USA) de acordo com especificações do fabricante. Todo procedimento envolvendo RNA foi realizado em condições livre de RNases.

5.5.2. Preparo da biblioteca de RNA para sequenciamento

Nesta etapa consta a descrição do preparo das bibliotecas de cDNA das amostras de mRNA de macrófagos controles e infectados com a cepa W-Beijing 1471 e a cepa padrão H37Rv, nos tempos descritos na **tabela 04** abaixo:

Tabela 04. Descrição das amostras de RNA de macrófagos infectados pela *M. tuberculosis* que foram realizados os preparos das bibliotecas e sequenciamento.

Macrófagos não infectados (controles)	Macrófagos infectados com <i>M. tuberculosis</i>	
24 horas	Tempos pós infecção com a cepa W-Beijing 1471	Tempos pós infecção com a cepa padrão H37Rv
	24, 48, 72 e 96 horas	24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas

O RNA total extraídos foram quantificados no *Qubit* (Qiagen, Gathersburg, MD, EUA) e por espectrofotometria em *NanoDrop ND-1000* (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A avaliação da qualidade dos RNA foi verificada pela determinação do índice de integridade (RIN) em *Agilent Bioanalyzer 2100®* (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) antes da depleção dos rRNA. Apenas RNA com RIN maior ou igual a oito foram preparados para sequenciamento.

A fragmentação do RNA, a síntese da primeira e segunda fita de cDNA, reparo das fitas de cDNA, adenilação, *indexação* e ligação de adaptadores foram realizadas com o *TruSeqTM RNA sample preparation Kit v2* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) segundo o protocolo do fabricante.

5.5.3. Validação das bibliotecas pela qPCR em tempo real e enriquecimento das amostras.

Para enriquecimento das bibliotecas pela PCR foi realizado primeiramente, a quantificação absoluta do cDNA em cada amostra, pela qPCR em tempo real. A quantificação foi realizada com o *Kapa Sybr Fast qPCR Kit Master Mix (2X) Universal* (Kapa Biosystems, Boston, MA, EUA) em triplicata, de acordo com as recomendações do fabricante em *Light Cycler 480* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) e *ABI Prism 7500 Fast* (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, USA). O número máximo de ciclos da PCR necessários para obtenção da máxima concentração de cDNA sem perda da proporção original dos diferentes fragmentos de cDNA foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: $V_{\text{library}}: N = A - \log_2\{(V_{\text{library}}[\mu\text{l}] / V_{\text{amp}}[\mu\text{l}]) / (0.5\mu\text{l} / 20\mu\text{l})\}$ onde, V_{library} , volume da biblioteca utilizado na qPCR, V_{amp} , volume final da reação e N = número ideal de ciclos da PCR para a biblioteca (Borodina *et al.*, 2011).

O enriquecimento das amostras de cDNA foi realizado pela PCR em tempo real utilizando um coquetel de iniciadores e os reagentes fornecidos no *TruSeqTM RNA sample preparation Kit v2* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) obedecendo ao número de ciclos previamente obtidos no item anterior. As amostras enriquecidas

foram utilizadas para formação de grupos no *Illumina Cluster Station* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA).

5.5.4. Sequenciamento

O sequenciamento de todas as amostras foi realizado em plataforma de alto desempenho *HiScan Genome Analyzer* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) em lâminas *single read*, 100 ciclos, de acordo o protocolo fornecido pelo fabricante, no laboratório do Professor Luiz Lehmann Coutinho da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) e no laboratório do Professor Jesus Aparecido Ferro da UNESP de Jaboticabal.

5.6. ANÁLISE PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA DO SEQUENCIAMENTO

As análises primárias foram realizadas no próprio sequenciador *HiScan Genome Analyzer* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA), pelo software Casava v1.8.1 (*Consensus Assessment of Sequence and Variation*) (Illumina Inc, San Diego, CA, USA). Após a avaliação das densidades, homogeneidade e qualidade dos *clusters* formados foi realizado o *Base Calling* apenas das sequências geradas a partir dos *clusters* que passaram pela análise de qualidade. Neste processo, as sequências dos adaptadores e *index* foram retiradas, as amostras foram separadas de acordo com o *index* e convertidas em arquivos *fastq*. Essas análises foram realizadas pelo próprio grupo que sequenciou as amostras.

As análises secundárias do sequenciamento foram realizadas em nosso laboratório. Foi avaliada a quantidade total de sequências geradas por amostra,

distribuição de bases C e G, especificidade/alinhamento com o genoma de referência e a qualidade do sequenciamento pela determinação do *score* de qualidade (Q). Todos os procedimentos foram realizados em *software CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark).

5.7. ANÁLISE TERCIÁRIA DO SEQUENCIAMENTO

A normalização das bibliotecas e determinação da expressão gênica global foi realizada pelo método do RPKM (*reads per kilobase per million* – número de sequências por quilobase por milhão de sequências). Os parâmetros utilizados para a análise das bibliotecas de cDNA proveniente dos macrófagos controle e infectados estão descritos na **figura 07**.

```

Version: CLC Genomics Workbench 6.5.1
User: LBMAD
Parameters:
    Sample view = Genes
    Expression column = Read Per Kilobase of exon Model value
Comments: Edit
No Comment
RNA-Seq (Wed Oct 16 16:55:47 BRT 2013)
Version: CLC Genomics Workbench 6.0.5
User: LBMAD
Parameters:
    Use annotations for gene and transcript identification = Yes
    References = NC_000001, NC_000002, NC_000003, NC_000004, NC_000005, NC_000006, NC_000007, NC_000008,
    NC_000009, NC_000010, NC_000011, NC_000012, NC_000013, NC_000014, NC_000015, NC_000016, NC_000017, NC_000018,
    NC_000019, NC_000020, NC_000021, NC_000022, NC_000023_X, NC_000024_Y
    Additional upstream bases = 0
    Additional downstream bases = 0
    Maximum number of mismatches allowed (applies to short reads) = 1
    Minimum length fraction (long reads) = 0,9
    Minimum similarity fraction = 0,8
    Unspecific match limit = 30

```

Figura 07. Parâmetros utilizados para normalização e expressão gênica global das bibliotecas de cDNA de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv e controles. *Expression column*: modelo de normalização por RPKM. *References*: base de dados de referência do genoma anotado de *Homo Sapiens* GRCh37.74 *Minimum similarity fraction*: similaridade mínima das sequências em relação a sequência de referência (disponível em Ensembl - <http://www.ensembl.org>).

Em seguida, a expressão gênica global diferencial foi determinada comparando-se as bibliotecas, já normalizadas, das amostras de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* em relação as amostras controles não infectadas.

Ambas as análises foram realizadas por meio da ferramenta *Transcriptomics Analysis* disponibilizado pelo software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark).

Para avaliar as possíveis interferências nas rotas metabólicas dos macrófagos, decorrentes da infecção pela *M. tuberculosis*, foi feita uma *core* análise da expressão gênica global diferencial após comparação dos transcriptomas, em plataforma *IPA Ingenuity™* (Qiagen, Gathersburg, MD, EUA).

5.8. VALIDAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES PELA PCR EM TEMPO REAL

Além da análise da expressão gênica global por sequenciamento, foram estudadas as expressões relativas de genes candidatos de macrófagos após infecção com a *M. tuberculosis*, para avaliação das prováveis vias metabólicas que poderiam estar alteradas decorrentes da interação bacilo-macrófago. As vias foram selecionadas de acordo com dados já descritos na literatura, que correlacionam genes expressos pela *M. tuberculosis* e modulação de vias metabólicas nos macrófagos, dentre outros.

Os dados obtidos neste experimento foram também utilizados como validação de alguns genes diferencialmente expressos observados durante o sequenciamento.

A expressão dos mRNA dos genes selecionados (*BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP3*, *ICAM1*, *IL10*, *IL8*, *MCL1*, *NFKB*, *IL1B*, *IL12*, *IFNA1* e *TNF*) foi realizada pela quantificação e reação de transcrição reversa seguida de amplificação pela PCR quantitativa em tempo real (RT-PCRq), em placas de 96 poços pré-preparadas *RT2 Profiler PCR Array* (Qiagen, Gathersburg, MD, EUA) (disponível em: http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-148Z.html) contendo iniciadores que amplificaram o mRNA dos genes relacionados com as vias escolhidas.

A síntese do cDNA foi realizada com o kit *RT2 First Strand* (Qiagen, Gathersburg, MD, EUA) de acordo com especificações do fabricante. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C . Todas as reações foram realizadas em triplicata e para cada placa de reação foram realizados controles negativos, de avaliação da eficiência da enzima e de contaminação por DNA genômico. Os ensaios de amplificação foram realizados com o kit *RT2 SYBR Green ROX qPCR Mastermix*

(Qiagen, Gathersburg, MD, EUA) de acordo com especificações do fabricante, em equipamento *ABI Prism 7500 Fast* (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, EUA).

Para a quantificação relativa da expressão gênica foi utilizado o método comparativo de CT descrito por Livak & Schmittgen, (2001). Para avaliação das variações na quantidade de mRNA dos macrófagos após infecção, foi utilizada a seguinte fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Onde $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ médio da amostra exposta – ΔCT médio da amostra controle (utilizada como calibrador).

As análises estatísticas e construção de gráficos foi realizada no GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Os resultados foram originados após análise da triplicata biológica pelo método estatístico two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni.

5.9. DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Para confirmar a expressão proteica de alguns genes avaliados pela PCR *array*, sequenciamento e outras relacionadas com a resposta imunológica de macrófagos frente à infecção pela *M. tuberculosis*, foram quantificadas as proteínas relacionadas com estas vias, utilizando-se o kit *Human Fluorokine MAP Multiplex 16 plex* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) em sistema de detecção Luminex®100™ (Luminex Corporation, Austin, TX, USA).

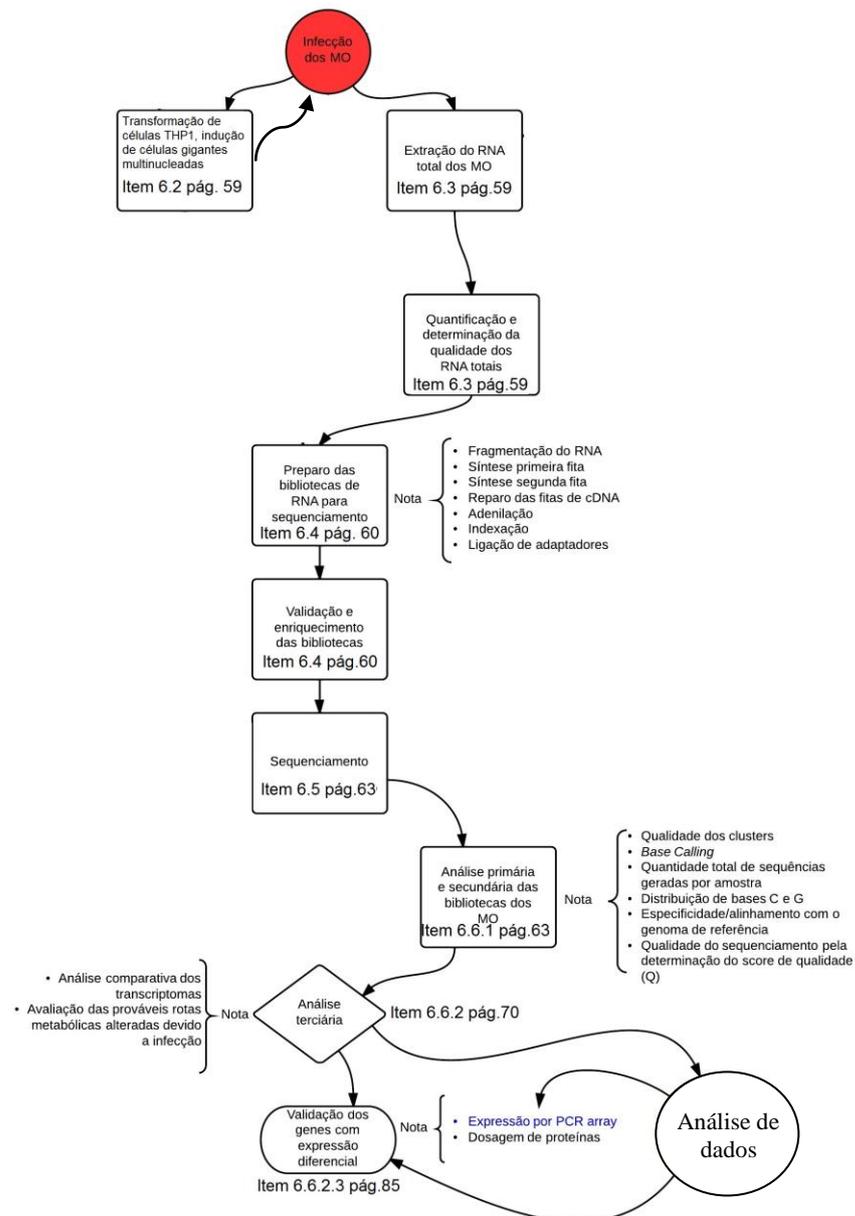
Proteínas:

- ◆ CCL2/MCP-1
- ◆ CCL3/MIP-1 alpha
- ◆ CCL4/MIP-1 beta
- ◆ CXCL8/IL-8
- ◆ GM-CSF
- ◆ IFN-gamma
- ◆ IL-1 alpha
- ◆ IL-1 ra
- ◆ IL-1 beta
- ◆ IL-2
- ◆ IL-4
- ◆ IL-5
- ◆ IL-10
- ◆ IL-6
- ◆ IL-17A
- ◆ TNF-alpha

Foram quantificadas também a IL-12 e o IFN-alfa com o *Human IL-12 p70 Quantikine ELISA Kit* e *Human IFN-alpha ELISA Kit* (R&D Systems, Minneapolis, USA), respectivamente, de acordo com especificações do fabricante.

6. RESULTADOS

6.1. FLUXOGRAMA DOS RESULTADOS APRESENTADOS



6.2. TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS THP1 EM MACRÓFAGOS, INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS E INFECÇÃO

O cultivo das células THP1 e transformação em macrófagos foi inicialmente realizado apenas na presença das VA e VD, na concentração de 1 μ M, por 72 h. Ao quinto dia de infecção, com uma taxa de infectividade de 10 bacilos para cada célula, foram observado grupamentos celulares, característico do início da formação de células gigantes multinucleadas (**figura 08**).

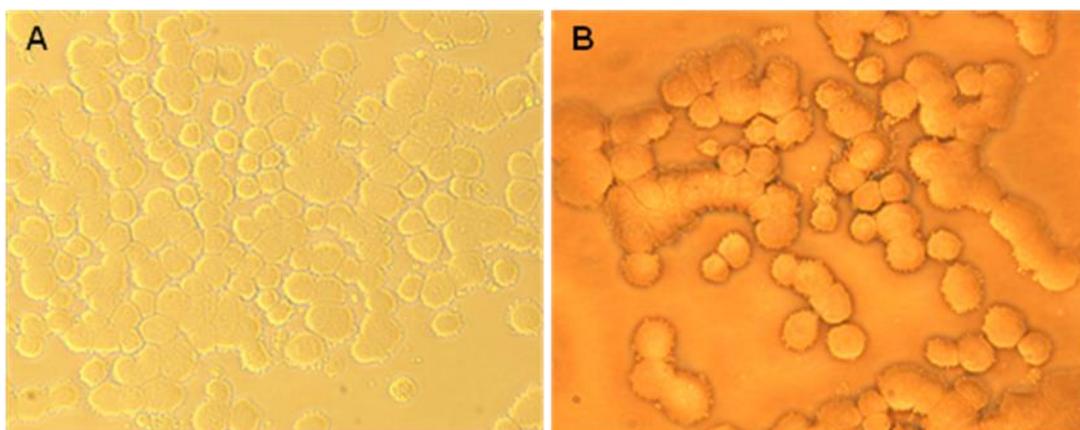


Figura 08. THP1 tratadas com VA e VD (1 μ M), infectadas com a cepa padrão da *M. tuberculosis*, H37Rv, com taxa de infecção de 10 bacilos para cada célula (A) e taxa de três bacilos para cada célula (B), durante seis dias. Presença de grupamento de células característico de células gigantes multinucleadas

6.3. EXTRAÇÃO DE RNA DE MACRÓFAGOS E DEPLEÇÃO DE rRNA

Após cultura dos macrófagos e infecção pelas cepas da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv em um período corrido de 12 dias, a extração de RNA total dos macrófagos antes e após a infecção foi realizada de acordo com o protocolo anteriormente descrito. A média da quantificação de RNA total foi de dois μ g, com

pureza adequada para a maioria das amostras, com razão 260/280nm de aproximadamente dois.

Todas as amostras obtiveram RIN entre 8,5-10 antes da depleção do rRNA, consideradas adequadas para sequenciamento em plataforma *HiScan Genome Analyzer* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA) e posterior análise da expressão gênica global (dados não demonstrados).

Inicialmente as amostras de RNA total proveniente dos macrófagos foram depletadas dos rRNA 28S e 18S, para uma otimização/enriquecimento do processo de sequenciamento e captura de todos os mRNA provenientes da amostra, assim como transportadores, dentre outros. O *TruSeqTM RNA sample preparation Kit* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA), utilizado no preparo das amostras, permite a construção de bibliotecas de RNA total depletadas de rRNA. Porém, no processo de validação das bibliotecas resultantes das amostras livres de rRNA, observou-se perda substancial de RNA mensageiro além de uma alta heterogeneidade dos fragmentos, o que poderia comprometer o sequenciamento.

Frente a isto, foram construídas apenas bibliotecas de mRNA e o processo de depleção ribossomal para as amostras de RNA total proveniente de macrófagos foi temporariamente excluído.

6.4. CONSTRUÇÃO, VALIDAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS PELA *M. tuberculosis* E CONTROLES

As bibliotecas de cDNA provenientes das amostras de RNA total de macrófagos foram construídas pela captação de mRNA, com o *TruSeqTM RNA*

sample preparation Kit (Illumina Inc, San Diego, CA, USA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após enriquecimento pela PCR com 12 ciclos em média de amplificação, foi observada uma ótima qualidade e pureza dos fragmentos de aproximadamente 260pb. As amostras foram consideradas como adequadas para sequenciamento (**figura 09**).

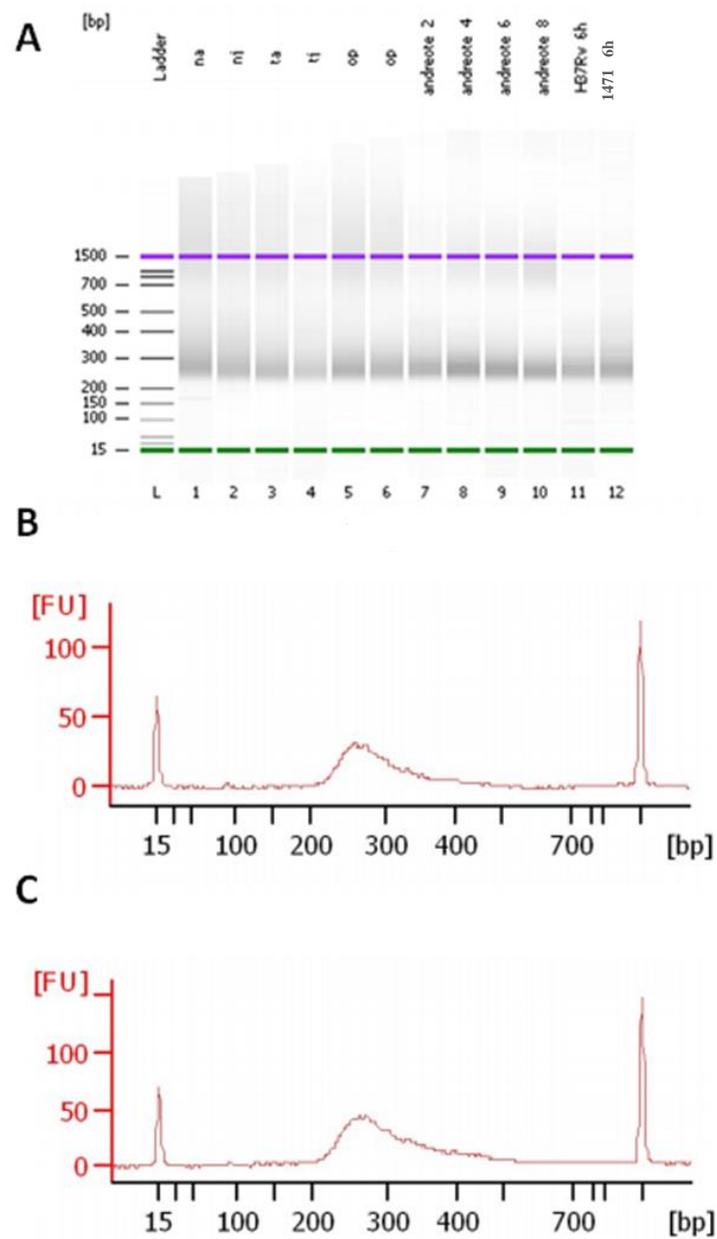


Figura 09. Qualidade das bibliotecas de cDNA produzidas e prontas para serem utilizadas para sequenciamento (gráfico obtido pelo Sistema Agilent 2100). A. Corrida eletroforética apresentando fragmentos de cDNA em cerca de 260 pb. B e C. Representação gráfica dos eletroferogramas das amostras de RNA das cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471 após 6h de infecção respectivamente, com o padrão inferior (15 pb), padrão superior (1500pb) e a região central contendo os fragmentos para sequenciamento de cerca de 260 pb.

6.5. SEQUENCIAMENTO

Todas as amostras foram sequenciadas em plataforma *HiScan Genome Analyzer* (Illumina Inc, San Diego, CA, USA), em lâminas *single sequência*, variando entre 50 a 100 ciclos. No total, foram sequenciadas 12 amostras de macrófagos incluindo controles, conforme descrição da **tabela 04**.

As amostras foram dispostas em duas a duas nas *lanes* totalizando aproximadamente 40 milhões de sequências geradas para cada uma. Foram gerados aproximadamente três terabytes de dados de sequências de DNA.

6.6. ANÁLISE DE DADOS DO SEQUENCIAMENTO

6.6.1. Análises primárias e secundárias

6.6.1.1. BIBLIOTECAS DE RNA DE MACRÓFAGOS APÓS INFECÇÃO PELAS CEPAS DA *M. tuberculosis*, H37RV E W-BEIJING 1471, E CONTROLES NÃO INFECTADOS.

Parte das análises primárias e secundárias foram realizadas no próprio sequenciador pelo software CASAVA v1.8.1 e a interface gráfica para plataforma Windows utilizada para controle do CASAVA foi o AVC (*Analysis Visual Controller*). Foram analisadas as qualidades dos clusters formados e do sequenciamento como um todo. Nesta primeira fase a qualidade de cada cluster é mensurada já nos cinco primeiros ciclos, levando-se em consideração a qualidade da fluorescência das bases nucleotídicas adicionadas a cada ciclo do sequenciamento e diversidade,

assim como homogeneidade e quantidade dos clusters. Após estas análises, apenas as sequências dos clusters considerados ótimos são selecionadas para conversão em arquivos *fastq* durante o *base calling*. Durante ainda este processo, é realizado simultaneamente a separação das sequências de acordo com o index adicionado durante o preparo das bibliotecas.

Em média, cada *lane* de cada *flow cell* gerou aproximadamente 90 milhões de sequências, sendo 45 milhões para cada amostra, atingindo a capacidade máxima da plataforma, indicando ótimo rendimento e qualidade das bibliotecas, bem como excelente performance da plataforma. Porém, após a separação das amostras durante o *base calling*, muitas foram alocadas como “não alinhadas”, indicando ausência de index. Em algumas amostras, principalmente as dos tempos de infecção de 120 horas em diante, foram perdidas mais de 60% das sequências, em média, por falta de indexação. Por este motivo foram consideradas para as análises terciárias apenas o sequenciamento das amostras até 96 horas de infecção e que passassem pelas análises secundárias de qualidade.

Em relação às amostras controles e aquelas infectadas com a cepa H37Rv e W-Beijing 1471 até o tempo de 96 horas, após análise da quantidade de sequências corretamente indexadas, foi dada continuidade as análises secundárias de qualidade.

Verificou-se nestas amostras que mais de 90% das sequências geradas apresentaram um score de qualidade acima de 30, indicando alta qualidade das bibliotecas e sequenciamento (**figura 10**) e distribuição de bases CG característico de *Homo Sapiens* (**figura 11**) Além disso, após mapeamento com o genoma de referência de *Homo Sapiens*, mais de 83% das sequências foram corretamente alinhadas, indicando ausência de contaminação. Para confirmar este fato, os 17%

não mapeados foram submetidos a um alinhamento global com a ferramenta BLAST do NCBI (disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), cujos resultados não foram apresentados. A maioria das sequências alinhou com partes do genoma de *Homo Sapiens*, dentre outras que não foram encontradas na base de dados do NCBI, indicando a princípio, erro de sequenciamento. Portanto, não foram encontradas contaminações que pudessem comprometer as análises seguintes. Levando-se em consideração esses fatores, foi dada continuidade as análises terciárias destas amostras.

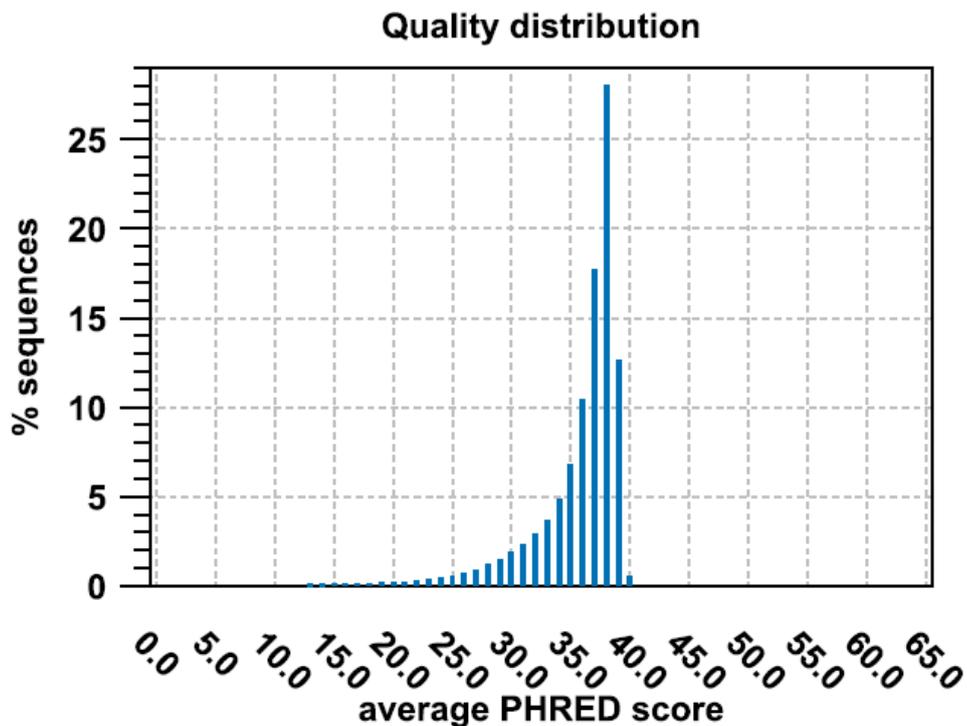


Figura 10. Distribuição da média da qualidade das sequências da amostra de macrófago não infectado (controle). A qualidade das sequências é calculada pela média aritmética da contagem realizada pelo PHRED (eixo x) e do número de sequências com qualidade, normalizadas com o número total de sequências (eixo y).

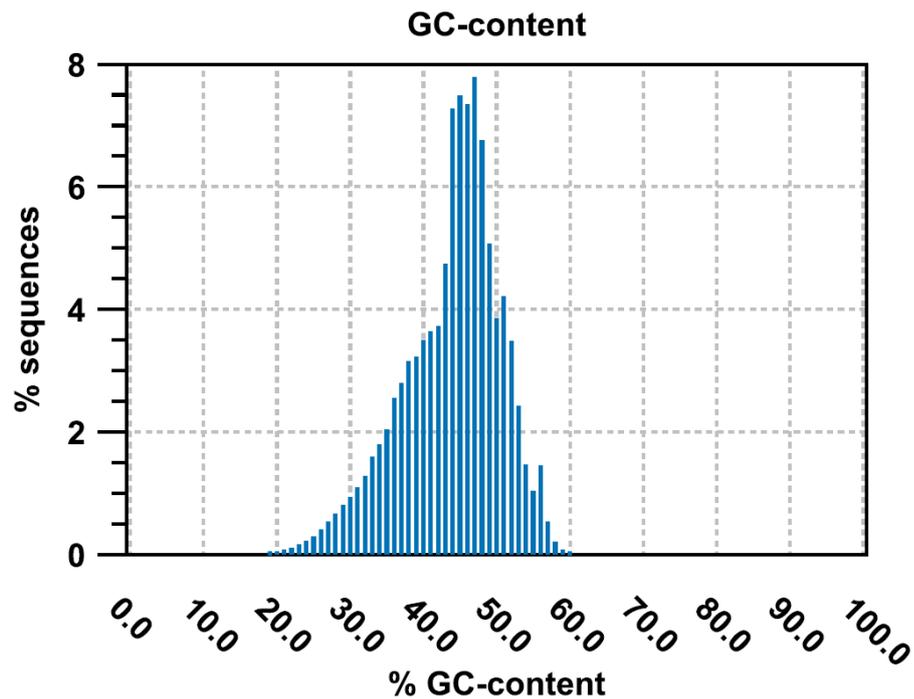


Figura 11. Distribuição das bases CG por sequência gerada de macrófagos não infectados (controle). Porcentagem de seqüências no eixo x e porcentagem de base C e G no eixo y.

6.6.1.2. ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE DAS SEQUÊNCIAS GERADAS

Para garantir a especificidade das seqüências e garantir que não houve contaminação com outros RNA ou DNA, foi realizado um mapeamento das seqüências geradas com as bases de dados de referência disponíveis para *Homo Sapiens*. Foram obtidas três diferentes bases de dados anotadas ou não, provenientes do *Ensembl Genome Browser* (cDNA), *RefSeq* e *Genome* do *NCBI Reference Sequence Database* (**tabela 05**)

Para aumentar a velocidade do processamento dos dados, foi realizado um mapeamento parcial (3.790.976 seqüências) do sequenciamento da amostra de macrófago não infectada (controle). Na **tabela 05** observou-se uma heterogeneidade do mapeamento, dependendo da base de dados utilizada, com maior especificidade

com a base de dados/genoma de referência de *Homo Sapiens* proveniente do *NCBI Reference Sequence Database*.

Além disso, foi realizado também um mapeamento com o genoma referência de *Homo Sapiens GRCh37/hg19* proveniente do *Ensembl Genome Browser*, com porcentagem de alinhamento compatível com os resultados obtidos com a base de dados do *NCBI Reference Sequence Database* (resultados não demonstrados).

Quadro 01. Mapeamento de parte das sequências geradas da biblioteca de macrófagos não infectados (controle) com as bases de dados provenientes do *Ensembl Genome Browser* (cDNA), *RefSeq* e *Genome* do *NCBI Reference Sequence Database*.

Database: cDNA

	Single	Paired	Total
Counted fragments	2.070.553	0	2.070.553
- uniquely	1.005.106	0	1.005.106
- non-specifically	1.065.447	0	1.065.447
Uncounted fragments	1.720.423	0	1.720.423
Total fragments	3.790.976	0	3.790.976

Database: DNA genômico

	Single	Paired	Total
Counted fragments	3.166.023	0	3.166.023
- uniquely	2.964.385	0	2.964.385
- non-specifically	201.638	0	201.638
Uncounted fragments	624.953	0	624.953
Total fragments	3.790.976	0	3.790.976

Database: RefSeq

	Single	Paired	Total
Counted fragments	1.573.496	0	1.573.496
- uniquely	1.167.641	0	1.167.641
- non-specifically	405.855	0	405.855
Uncounted fragments	2.217.480	0	2.217.480
Total fragments	3.790.976	0	3.790.976

6.6.1.3. MAPEAMENTO (RNA-SEQ) E NORMALIZAÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE cDNA.

Em média 90% dos *reads* das bibliotecas provenientes de macrófagos controles, infectados com a *M. tuberculosis* H37Rv por 24 horas e W-Beijing 1471 por 96 horas, foram mapeados contra o genoma de referência de *Homo Sapiens* (**tabela 06, 07 e 08**). Resultados similares foram observados para as demais amostras.

Tabela 06. Mapeamento da biblioteca de macrófagos controles contra o genoma de referência de *Homo Sapiens* GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta *RNA-Seq Analysis* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). *Total fragments*: total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. *Counted Fragments*: total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de *Homo Sapiens*. *Uncounted fragments*: total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.

	Single	% of Total	Paired	% of Total
Counted fragments	35.590.527	100,00	0	0,00
- uniquely	27.475.411	100,00	0	0,00
- non-specifically	8.115.116	100,00	0	0,00
Uncounted fragments	5.160.789	100,00	0	0,00
Total fragments	40.751.316	100,00	0	0,00

Total	% of Total Fragments
35.590.527	87,34
27.475.411	67,42
8.115.116	19,91
5.160.789	12,66
40.751.316	100,00

Tabela 07. Mapeamento da biblioteca de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* H37Rv por 24 horas, contra o genoma de referência de *Homo Sapiens* GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta *RNA-Seq Analysis* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). *Total fragments*: total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. *Counted Fragments*: total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de *Homo Sapiens*. *Uncounted fragments*: total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.

	Single	% of Total	Paired	% of Total
Counted fragments	45.417.717	100,00	0	0,00
- uniquely	34.492.637	100,00	0	0,00
- non-specifically	10.925.080	100,00	0	0,00
Uncounted fragments	8.152.324	100,00	0	0,00
Total fragments	53.570.039	100,00	0	0,00

Total	% of Total Fragments
45.417.717	84,78
34.492.637	64,39
10.925.080	20,39
8.152.324	15,22
53.570.039	100,00

Tabela 08. Mapeamento da biblioteca de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 por 96 horas, contra o genoma de referência de *Homo Sapiens* GRCh37.74, realizado por meio da ferramenta *RNA-Seq Analysis* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). *Total fragments*: total de sequências geradas no sequenciamento após análise primária e secundária. *Counted Fragments*: total de sequências que foram mapeadas contra as sequências de referência de *Homo Sapiens*. *Uncounted fragments*: total de sequências que foram descartadas no processo de mapeamento.

	Single	% of Total	Paired	% of Total
Counted fragments	38.937.192	100,00	0	0,00
- uniquely	30.371.123	100,00	0	0,00
- non-specifically	8.566.069	100,00	0	0,00
Uncounted fragments	5.299.511	100,00	0	0,00
Total fragments	44.236.702	100,00	0	0,00

Total	% of Total Fragments
38.937.192	88,02
30.371.123	68,66
8.566.069	19,36
5.299.511	11,98
44.236.702	100,00

6.6.2. Análises terciárias

6.6.2.1. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM A *M. tuberculosis* W-BEIJING 1471 E H37RV

Durante a normalização das bibliotecas foram determinados valores de expressão gênica global de cada amostra separadamente, baseado no valor do RPKM. Neste processo foi utilizada a ferramenta *RNA-Seq Analysis* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). Inicialmente foi realizado um mapeamento contra o genoma de referência anotado de *Homo Sapiens* GRCh37.74 (disponível em Ensembl - <http://www.ensembl.org>), contendo 35.581 genes anotados e aproximadamente 32.554 transcritos.

Após normalização, foi realizado um estudo comparativo entre os transcriptomas de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv e os transcriptomas dos controles, para determinação da diferença da expressão gênica global (*fold change*) entre eles. Neste processo foi utilizada a ferramenta *Set Up Experiment* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark). Nesta ferramenta os genes foram classificados de acordo com a diferença de expressão (*fold change*) após comparação dos valores de RPKM (bibliotecas normalizadas) (**figura 12**).

Feature ID	Experiment				Cluster
	Range (origi...	IQR (original values)	Difference (...	Fold Cha...	
ZP1	0,01	0,01	0,01	∞	4
ZSCAN5D	0,03	0,03	0,03	∞	4
PTGES2	0,86	0,86	0,86	75,23	4
PGLS	1,61	1,61	1,61	60,34	4
ARHGEF1	0,99	0,99	0,99	59,56	4
GUK1	1,23	1,23	1,23	57,20	4
BRMS1	1,08	1,08	1,08	56,42	4
RPS15	8,51	8,51	8,51	54,59	4
ZMAT5	1,34	1,34	1,34	50,15	4
KIAA0664	0,26	0,26	0,26	48,58	4
C9orf89	1,38	1,38	1,38	45,45	4
RBM42	0,73	0,73	0,73	43,88	4
IKZF1 (NC_0...	3,42	3,42	3,42	39,96	4
NDUFA3	5,75	5,75	5,75	37,22	4
HIST1H4B	2,82	2,82	2,82	36,83	4
AIP	2,45	2,45	2,45	36,83	4
ANKRD13D	0,47	0,47	0,47	36,83	4
PYCARD	3,76	3,76	3,76	35,52	4
HIST3H2BB	8,52	8,52	8,52	35,26	4
LMAN2	3,12	3,12	3,12	34,87	4
ARRDC1	0,56	0,56	0,56	32,91	4
TMEM222	1,10	1,10	1,10	32,52	4
MMP9	2,14	2,14	2,14	30,69	4
IDH3G	1,93	1,93	1,93	30,56	4
TYMP	1,75	1,75	1,75	29,97	4
DNAJC4	0,63	0,63	0,63	29,78	4
SBNO2	0,15	0,15	0,15	28,99	4
ROGDI	0,45	0,45	0,45	28,99	4
SI C25A1	1,21	1,21	1,21	28,47	4

Figura 12. Análise da expressão diferencial dos transcriptomas de macrófagos controles em comparação aos transcriptomas de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471. *Control*: denominação das amostras de macrófagos não infectadas; *MH*: denominação das amostras de macrófagos infectadas com a cepa de referência H37Rv da *M. tuberculosis*; *MB*: denominação das amostras de macrófagos infectadas com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471; *Feature ID*: genes avaliados quanto a expressão diferencial; *Fold Change (Fold Cha...)*: valor da diferença de expressão gênica global. Análise realizada em software CLC Bio Genomics Workbench (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark).

Valores de expressão iguais a um significam que não houve diferença de expressão entre as amostras, valores maiores do que um (incluindo $\infty+$) significam um aumento no nível de expressão e valores menores do que um (incluindo $\infty-$) significam uma redução no nível de expressão. Os genes classificados como $\infty +/-$ são aqueles onde foram mapeadas sequências em apenas uma das amostras.

Foram mapeados um total de 35.581 genes, de acordo com a base de dados anotada de *Homo Sapiens* GRCh37.74, distribuídos de acordo com o nível de expressão após comparação com o transcriptoma das amostras de macrófagos controle (**tabela 09**).

Após análise do perfil global de expressão gênica das amostras de macrófagos infectadas com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471 em comparação com a amostra de macrófago controle, observou-se em média que 63% dos genes não tiveram diferença de expressão, com valor igual a um, 19% tiveram expressão reduzida, com valores menores do que um e 18% tiveram aumento na expressão com valores maiores do que um (**gráfico 01**).

Tabela 09. Total de genes classificados de acordo com a diferença de expressão, após comparação dos transcriptomas de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471 e macrófagos controles, após avaliação por meio da ferramenta *Set Up Experiment* do software *CLC Bio Genomics Workbench* (CLC Bio, Katrinebjerg, Denmark).

Diferença de expressão	MO infectados com <i>M. tuberculosis</i> H37Rv				MO infectados com <i>M. tuberculosis</i> W-Beijing 1471			
	Tempo de infecção				Tempo de infecção			
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h
$\infty +$	1.154	425	415	162	68	200	195	710
> 1	5.925	6.242	6.529	4.646	6.566	4.943	6.082	3.781
= 1	21.897	22.641	22.653	22.879	22.984	22.849	22.853	22.351
< 1	6.186	4.956	4.626	5.151	2.655	5.441	4.045	7.906
$\infty -$	419	1.317	1.358	2.743	3.308	2.148	2.406	833
Total	35.581	35.581	35.581	35.581	35.581	35.581	35.581	35.581

Expressão Gênica Global

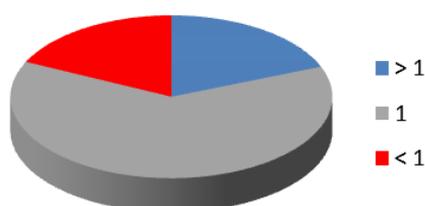


Gráfico 01. Perfil da expressão gênica global das amostras de macrófagos infectadas com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471 comparadas ao controle não infectado. 63% dos genes tiveram diferença de expressão igual a um (cinza), 19% tiveram diferença de expressão menor do que um (vermelho) e 18% tiveram diferença de expressão maior do que um (azul).

Após análise estatística por two-way ANOVA e pós-teste de Bonferroni de cada amostra separadamente e comparativamente em relação aos tempos de infecção, observou-se um aumento do número de genes com expressão reduzida ($p < 0,01$) nas amostras de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* cepa W-Beijing 1471 após 96 horas de infecção quando comparada ao tempo de 24 horas (gráfico 02).

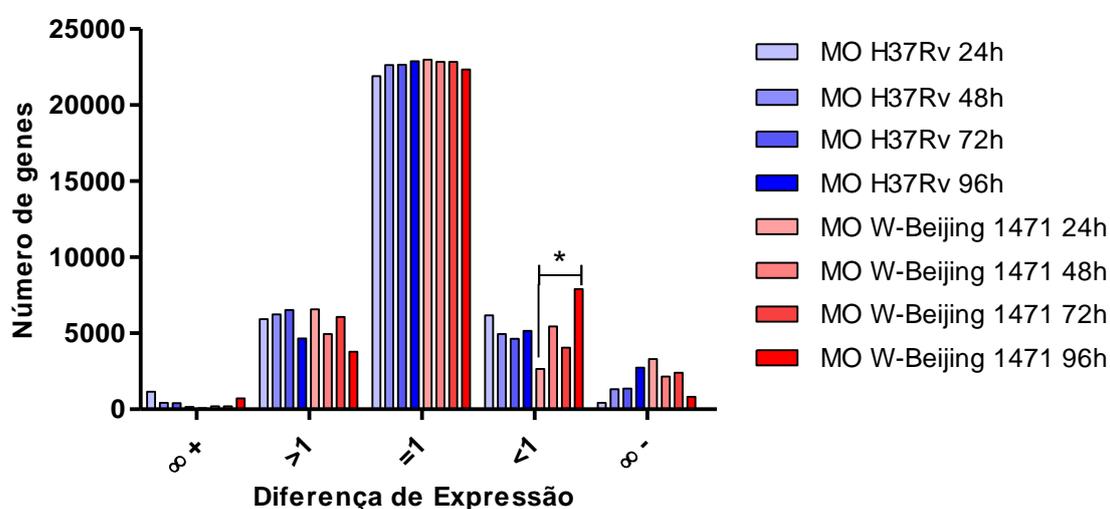


Gráfico 02. Representação gráfica do total de genes classificados de acordo com o nível de expressão após comparação dos transcriptomas das amostras de macrófagos controles com as infectadas com as cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471 nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Para as análises estatísticas foram aplicados o teste two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni, realizados em *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significantes e estão representados graficamente com o símbolo asterisco.

6.6.2.2. ANÁLISE DAS ROTAS METABÓLICAS

Para verificar possíveis alterações nas rotas metabólicas dos macrófagos, decorrente da infecção pela *M. tuberculosis* cepa W-Beijing 1471 e H37Rv foi realizada uma *core* análise dos resultados do sequenciamento via *IPA Ingenuity™*

(Qiagen, Gathersburg, MD, EUA). Foram considerados, nesta análise, apenas genes com expressão diferencial igual, acima ou menor do que sete.

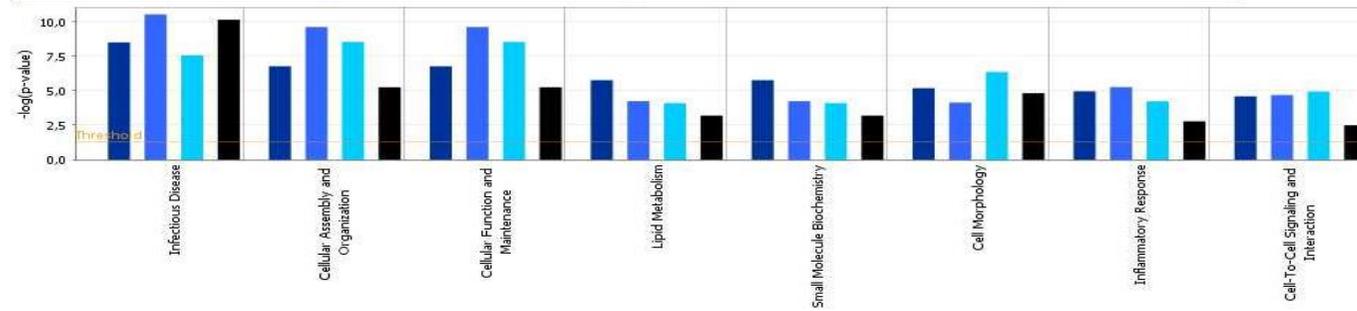
Foi realizada uma análise comparativa dos macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471 nos diversos tempos de infecção. Os genes foram agrupados de acordo com as vias metabólicas as quais fazem parte e posteriormente foram associados às principais doenças relacionadas com as mesmas.

Em relação aos macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv da *M. tuberculosis*, nos tempos de 24 a 96 horas, as principais vias metabólicas alteradas e classificadas de acordo com a maior alteração do nível de expressão do grupo gênico associado às vias, estão descritas no **gráfico 03**.

Em relação aos macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471 da *M. tuberculosis*, nos tempos de 24 a 96 horas, as principais vias metabólicas alteradas e classificadas de acordo com a maior alteração do nível de expressão do grupo gênico associado às vias, estão descritas no **gráfico 04**.

Comparison Analysis: MH24 x MH48 x MH72 x MH96

■ Control vs. MH 24h - 2013-12-04 01:21 PM ■ Control vs. MH 48h - 2013-12-04 03:21 PM ■ Control vs. MH 72h - 2013-12-04 03:39 PM ■ Control vs. MH 96h - 2013-12-04 03:55 PM



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

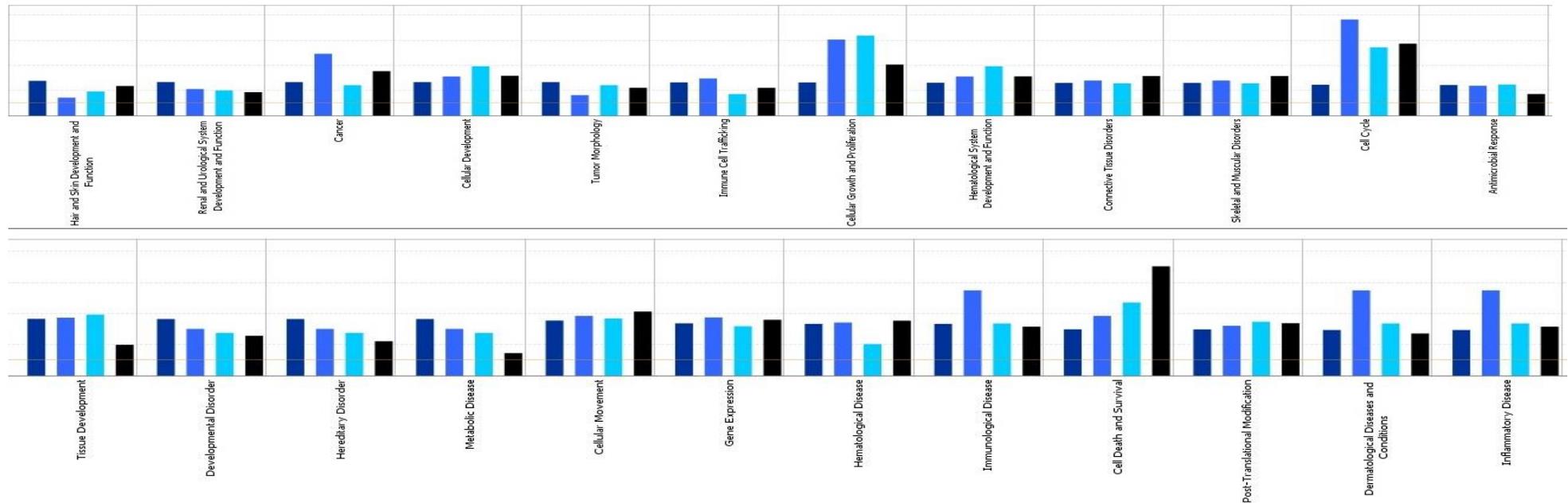


Gráfico 03. Descrição das principais vias metabólicas alteradas após infecção pela *M. tuberculosis* cepa H37Rv, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

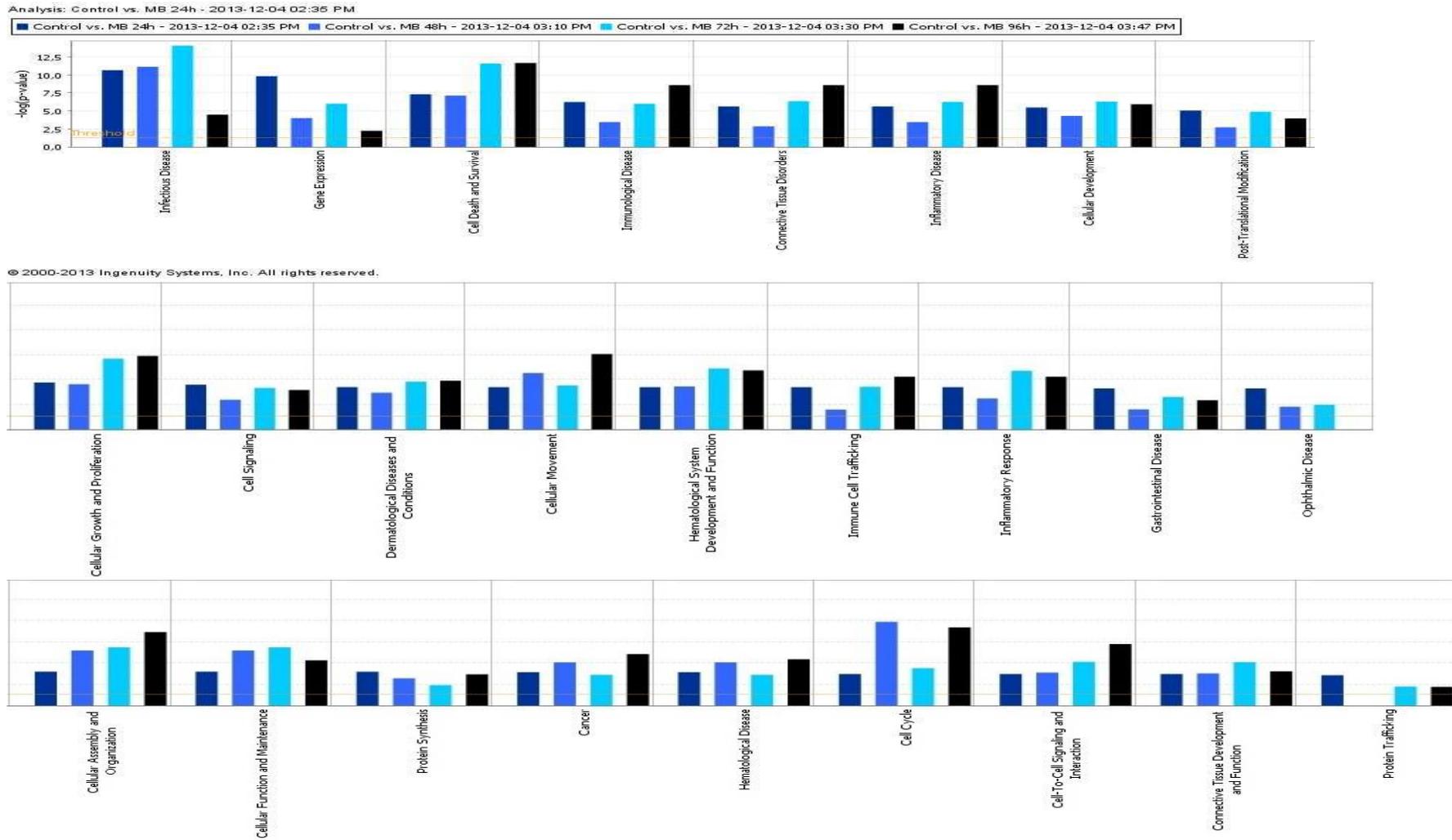
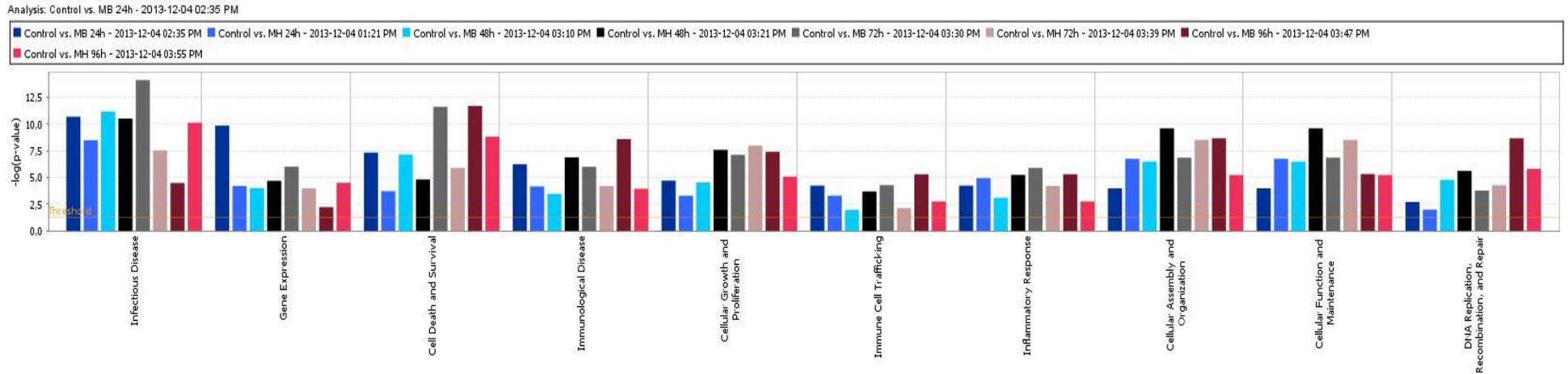


Gráfico 04. Descrição das principais vias metabólicas alteradas após infecção pela cepa da *M. tuberculosis*, H37Rv, nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas.

Para comparar as principais vias metabólicas envolvidas no processo de infecção pela cepa padrão H37Rv e pela cepa hipervirulenta W-Beijing 1471 de *M. tuberculosis* em macrófagos, foi realizado um filtro baseado na significância estatística de cada via e relevância da rota metabólica dentro do contexto da infecção (**gráfico 05**).

Em seguida os genes mais fortemente associados com a ativação e controle das vias observadas no **gráfico 05**, foram hierarquicamente escalonados de acordo com o grau de importância e tempo de infecção (**tabela 10**).



© 2000-2014 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Gráfico 05. Comparação das principais vias metabólicas relevantes dentro do contexto da infecção de macrófagos pelas cepas da *M. tuberculosis*, H37Rv e W-Beijing 1471.

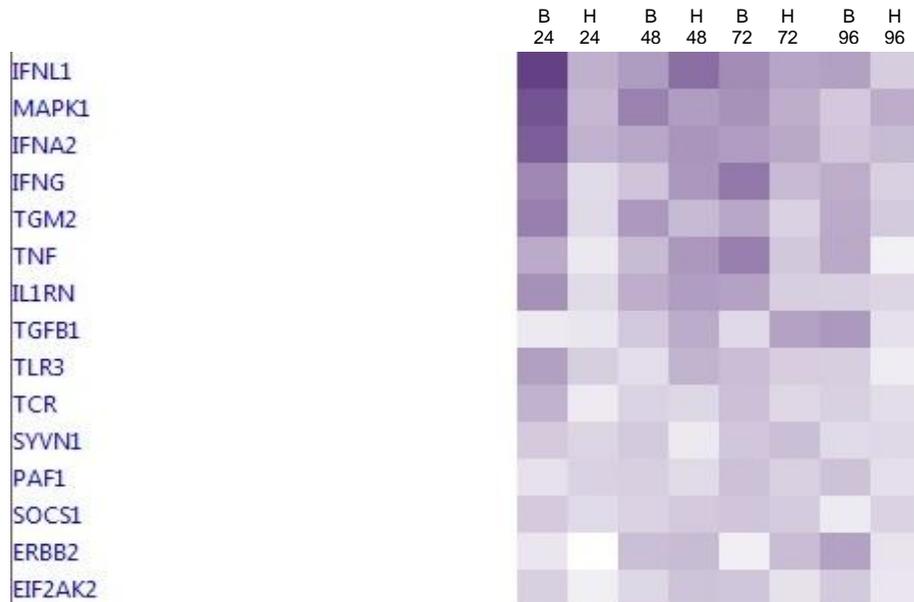


Tabela 10. Classificação hierárquica de reguladores gênicos que estão relacionados com a ativação das principais vias metabólicas envolvidas na infecção de macrófagos pelas cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471. Da direita para a esquerda: coluna H 96 – macrófagos infectados com a cepa H37Rv por 96 horas; coluna B 96 – macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471 por 96 horas e assim consecutivamente.

Após a análise das principais vias metabólicas envolvidas durante a infecção dos macrófagos pela *M. tuberculosis* cepa H37Rv e W-Beijing 1471, foi realizada uma seleção das principais redes gênicas associadas a estas vias, de acordo com o nível de expressão de cada gene pertencente a ela, após comparação com a amostra controle não infectada.

Para as amostras infectadas com a cepa da *M. tuberculosis* H37Rv, foram selecionadas as 25 redes gênicas para cada tempo analisado, com score entre 14 e 28 (tabela 11), para posterior sobreposição e determinação da via metabólica com maior importância dentro do contexto geral da infecção.

Tabela 11. *Networks*: Redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis*, H37Rv nos tempos de infecção de 24 a 96 horas.

ID	Analysis	Molecules in Network	Score	Focus Molecule	Top Diseases and Functions
1	Control vs. MH 24h - 2013-12-04 01:21	↑ADCY9, ↑AES, ↑ATP6AP1, ↑CALM1 (includes others)*, ↑CDA, ↑CEP164, ↑CHST12, ↑E2F4, ↑EMC4, ↑HIST1H2AC, ↑HIST2H2AA3/HIST2H2AA4*, ↑HLTF, ↑KCNN4, ↑LRWD1, ↑MCM5, ↑MOV10, ↓PMS1, ↑PNPLA2, ↑PRKCSH, ↑PSD2, ↑RANGAP1, ↓RFC4, ↑RNF123, ↑RPL10, ↑RPL18, ↑SKIV2L, ↑SLC27A3, ↑SLC35B2, ↑SLC35C2, ↑SLC43A2, ↑SLC04A1, ↓STOX1, ↑SYVN1, ↑UBA52, ↑USP5	28	35	Hematological Disease, Connective Tissue Disorders, Developmental Disorder
1	Control vs. MH 48h - 2013-12-04 03:21	↑ADRBK1, ↑BSG, ↑CSAR1, ↑CCBP2, ↑CCL8, ↑CCL26, ↑CCRS5, ↑CYP46A1, ERK1/2, ↓FPR1, ↓FPR2, ↑GAREM, ↑GRK5, ↑GRK6, ↑IL17RD, ↑LRRN1, ↑MAP3K10, ↑MAP3K11, ↑MAP4K2, ↑MGRN1, ↑MMP3, ↑NCS1, ↑NEU1, ↑P2RY6, ↑P2RY12, ↑PFKFB4, ↓PIGF, ↑PLD2, ↑PPIB, ↑RAB4B, ↑RASGRP4, ↑RPS19, ↑SLC51B, ↑TRPM2, ↑UNC119	24	34	Cellular Compromise, Inflammatory Response, Cellular Movement
1	Control vs. MH 72h - 2013-12-04 03:39	↑ARF6, ↑ATP1A2, ↓CCBP2, ↓CLEC4A, ↓CXCR5, ↓CYTH2, ERK1/2, ↓FPR1, ↓GPR183, ↑GRASP, ↑GRK6, ↓GRM1, ↑IL1RL1, ↓KLB, ↑MAP3K10, ↑MAP3K11, ↑MAP4K2, ↑MGRN1, ↑NEU1, ↑P2RY2, ↑P2RY6, ↑PFKFB4, ↑PPIB, ↓PTPR, ↑RAB4B, ↑RABL6, ↑RASGRP4, ↑RHOG, ↑SH3GLB2, ↑TDGF1, ↑TNFSF8, ↑TRPM2, ↑UNC119, ↑VAV2, ↑VEGFB	24	34	Cell Signaling, Cellular Function and Maintenance, Molecular Transport
1	Control vs. MH 96h - 2013-12-04 03:55	↑AFF2, ↑CCL4L1/CCL4L2*, ↑CD101, ↑CD300C, ↓COX11, ↑CSRNP1, ↑CXCR5, ↓DAAM2, ↑DAPK2, ↑DGAT2, ↑ERN1, ↓FAM86C1, ↑FFAR2, ↓GJA1, ↑HK3, ↑HYOU1, ↑IFI35, ↑LRR25, ↓MMP8, ↑NLN, ↑OAS2, ↓PROS1, ↑RNF213, ↑S100A8, ↑SEMA6B, ↑SEMA7A, ↑SIGLEC12*, ↑SLC16A13, ↓SPP1, ↑SYT11, ↑TGM2, ↑TNFAIP2, ↑TPCN1, ↑UBA7, ↓ZNF566	23	35	Cell Death and Survival, Cellular Compromise, Cellular Movement
2	Control vs. MH 24h - 2013-12-04 01:21	↑ARF6, ↑ARR3, ↑ATP6V0C, Caveolin, ↑CCL26, ↑CEACAM8, ↑CIB1, ↑CXCR5, ↑CYP46A1, ERK1/2, ↑FAIM3, ↑FPR1, ↑GRK6, ↑IL17RD, ↑ITPR3, ↑LIF, ↑MAP3K10, ↑MAP3K11, ↑MAP4K2, ↑MGRN1, ↑MVP, ↑NAPA, ↑P2RY2, ↑P2RY6, ↑PFKFB4, ↑PLEKHG6, ↑PRR7, ↑RAB4B, ↑RABL6, ↑RASGRP4, ↑RETN, ↑RHOG, ↑TRPM2, ↑UNC119, ↑VAV2	24	33	Cell Signaling, Molecular Transport, Vitamin and Mineral Metabolism
2	Control vs. MH 48h - 2013-12-04 03:21	↑AKR1C1/AKR1C2*, ↑ANPEP, APC (complex), ↓ASPM, ↓BUB1B, ↓CDC20, ↓CDKN3, ↓CENPA, ↓CENPE, ↓CENPF, ↑ESPL1, ↓FBLN1, ↓FOXO1, ↓FZR1, ↑HAS3, ↑HYAL2, ↑ITPA, ↓LTBP2, ↑MAPK8IP3, ↓MXD3, ↓NDC80, ↓NEK2, ↑NRBP1, ↑NUF2, ↑PORCN, ↓PRIM1, ↓RAD51AP1, ↑SMTN, ↑SPAG4, ↑TACC3, ↑TGFB1, ↑TGFB1, ↑TSPAN7, ↑TYMP, ↑UBE2S	24	34	Cellular Assembly and Organization, Cell Cycle, DNA Replication, Recombination, and Repair
2	Control vs. MH 72h - 2013-12-04 03:39	↑AKR1C1/AKR1C2*, ↓BUB1, ↓BUB1B, ↑CAPN15, ↓CDKN3, ↑CELSR2, ↓CENPA, ↓CENPE, ↓CENPF, ↑COL4A2, ↓COL6A3, ↓COL7A1, Collagen Alpha1, ↑EPHB2, ↑ERBB2, ↑FBN1, ↑GNA01, ↑GNA02, ↑GNA03, ↑GNA04, ↑GNA05, ↑GNA06, ↑GNA07, ↑GNA08, ↑GNA09, ↑GNA10, ↑GNA11, ↑GNA12, ↑GNA13, ↑GNA14, ↑GNA15, ↑GNA16, ↑GNA17, ↑GNA18, ↑GNA19, ↑GNA20, ↑GNA21, ↑GNA22, ↑GNA23, ↑GNA24, ↑GNA25, ↑GNA26, ↑GNA27, ↑GNA28, ↑GNA29, ↑GNA30, ↑GNA31, ↑GNA32, ↑GNA33, ↑GNA34, ↑GNA35, ↑GNA36, ↑GNA37, ↑GNA38, ↑GNA39, ↑GNA40, ↑GNA41, ↑GNA42, ↑GNA43, ↑GNA44, ↑GNA45, ↑GNA46, ↑GNA47, ↑GNA48, ↑GNA49, ↑GNA50, ↑GNA51, ↑GNA52, ↑GNA53, ↑GNA54, ↑GNA55, ↑GNA56, ↑GNA57, ↑GNA58, ↑GNA59, ↑GNA60, ↑GNA61, ↑GNA62, ↑GNA63, ↑GNA64, ↑GNA65, ↑GNA66, ↑GNA67, ↑GNA68, ↑GNA69, ↑GNA70, ↑GNA71, ↑GNA72, ↑GNA73, ↑GNA74, ↑GNA75, ↑GNA76, ↑GNA77, ↑GNA78, ↑GNA79, ↑GNA80, ↑GNA81, ↑GNA82, ↑GNA83, ↑GNA84, ↑GNA85, ↑GNA86, ↑GNA87, ↑GNA88, ↑GNA89, ↑GNA90, ↑GNA91, ↑GNA92, ↑GNA93, ↑GNA94, ↑GNA95, ↑GNA96, ↑GNA97, ↑GNA98, ↑GNA99, ↑GNA100	24	34	Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair

Para as amostras infectadas com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471, foram também selecionadas as 25 principais redes gênicas para cada tempo analisado, com score entre 13 e 28 (tabela 12), para posterior sobreposição e

determinação da via metabólica com maior importância dentro do contexto geral da infecção por W-Beijing.

Tabela 12. *Networks*: Redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 nos tempos de infecção de 24 a 96 horas

ID	Analysis	Molecules in Network	Score	Focus Molecul	Top Diseases and Functions
1	Control vs. MB 24h - 2013-12-04 02:35 PM	↑ARHGEF2, ↑BAG6, ↑BANP, ↑BAP1, ↑CDC14B, ↓CDKN3, ↓CSTF1, ↑CUL7, ↑CUL9, ↑ETHE1, ↑FBXW8, ↑GTSE1, ↑GUCY1A3, ↑HSPA11L, ↑ING4, ↑ING5, ↑IRS1, ↑LPIN1, ↑LSS, ↑MVK, ↑NOC2L, ↑PCBP4, ↑PFKM, ↑PPIF, ↑PPP4C, ↑PRKAB1, ↑RGS13, ↑RPL7A, ↑RPS6KA5, ↑SHISA5, ↑TAGLN2, ↑TEP1, ↑TMEM97, ↑TP53, ↑TRPV1	28	35	Cell Cycle, Cellular Development, Connective Tissue Development and Function
1	Control vs. MB 48h - 2013-12-04 03:10 PM	↑AKR1C1/AKR1C2*, ↓ASPM, ↓BUB1, ↓BUB1B, ↓CDC20, ↓CELSR2, ↓CENPA, ↓CENPE, ↓CENPF, ↑COL7A1, ↓DVL2, ↓DZIP3, ↑EPHB2, ↑ERBB2, ↑ESPL1, ↑FOXM1, ↑HYAL2, ↓LTBP2, ↑MAPK8IP3, ↓MPHOSPH9, ↑MXD3, ↓NDC80, ↓NEK2, ↓NSL1, ↓NUF2, ↑PORCN, ↓PRIM1, ↓RAD51AP1, ↓SCG5, ↓SLC39A8, ↓SPC25, ↓TACC3, ↑TGFB1, ↓WWOX, ↓ZWINT	26	35	Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair
1	Control vs. MB 72h - 2013-12-04 03:30 PM	↑ACTN4, ↑BRAT1, ↓BRCA1, ↓BRIP1, ↓CCNA2, ↓CCNB1, ↓CCNB2, ↓CDC6, ↓CKAP2, ↓CLSPN, ↑DDX11, ↑E2F4, ↓E2F8, ↑EIF4G1, ↑FIS1, ↓GADD45A, ↑IPO13, ↓KIF14, ↓KIF23, ↓KIF4A, ↓LMNB2, ↑MAD1L1, ↓MAD2L1, ↓MSH6, ↑MUTYH, ↑NCAPG, ↓NCAPH, ↓NFYB, ↓ORC1, ↑PDLIM7, ↑PRC1, ↓RACGAP1, ↑RFC2, ↑TOP2A, ↑UBXN1	25	35	Cell Cycle, Cellular Assembly and Organization, DNA Replication, Recombination, and Repair
1	Control vs. MB 96h - 2013-12-04 03:47 PM	↑ACO2, ↓ADORA3, ↓ADRBK1, ↑ANXA1, ↓ARRB1, ↓C5AR1, ↓CCBP2, ↑CCL8, ↑CCL26, ↑CCRS5, ERK1/2, ↓FARSA, ↓FLT1, ↑FPR1, ↑FPR2, ↓FXN, ↓GALNT2, ↓GAREM, ↓GLIPR2, ↓GMFG, ↓GPR183, ↓GRK6, ↓GRM1, ↑IL17RD, ↓LAT2, ↓MAP3K10, ↓PLD2, ↑PTGES, ↓PTGFR, ↑PTPN12, ↓RABL6, ↓RASGRP4, ↓RPS19, ↓SEMA4A, ↓UNC119	25	34	Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking
2	Control vs. MB 24h - 2013-12-04 02:35 PM	↑ATAD3A/ATAD3B*, ↑CAD, ↑CALCOCO1, ↓CBFA2T2, ↑CCND1, ↑CLPB, ↑CTDP1, CYP19, ↑ENDOD1, ↑FHOD1, ↑FLIL, ↑HIST2H2BE (includes others)*, ↑HSPH1, ↑KDM6B, ↑KMT2D, ↑LNP1, ↑MAML1, ↑MLF2, ↑NT5E, ↑PIAS4, ↓PMS2, ↑POLR2A, ↑PSMD3, ↑RBCK1, ↑RFC2, ↑RNF31, ↑SLC9B2, ↑SNRNP70, ↑SYMPK, ↓TCF4, ↑TMEM219, ↓TMPO, ↑UBA52, ↑VENTX, ↑ZNF324	26	34	Gene Expression, Cell Cycle, Developmental Disorder
2	Control vs. MB 48h - 2013-12-04 03:10 PM	↑ARL13B, ↑ATP6AP1, ↑AUP1, ↓BCAT1, ↑CASP1, ↓CDA, ↑CEP164, ↑CHST12, ↓CSTA, ↑DAG1, ↓GNB2, ↓GNG2, ↑IFI44, ↑IFITM2, ↑INPP5E, ↑KCNN4, ↑LGALS3BP, ↑MEFV, ↑PNPLA2, ↑POMGNT1, ↑POMT1, ↑POMT2, ↑PSTPIP1, ↓RAB10, ↓RPL17, ↑RPL18, ↑SKIV2L, ↑SLC1A5, ↓SLC27A3, ↓SLC35B2, ↓SLC35C2, ↓SLC4A7, ↑STOX1, ↓SYVN1, ↑USP5	26	35	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Skeletal and Muscular Disorders
2	Control vs. MB 72h - 2013-12-04 03:30 PM	↑BLNK, ↑C2, ↑CAD, ↓CCNC, ↑CDK3, ↓DLGAP5, ↑DRAP1, ↓ERCC8, ↓FHL1, ↑GAPDH, ↑GCM11, ↑GCSAM, ↓GRRF6, ↓GTF2I, ↑HCF1, ↑HIST2H2BE, ↑HIST2H3, ↑HIST2H3E	23	34	Gene Expression, Infectious Disease

Após realização da sobreposição das principais redes gênicas, foi determinado o principal grupo gênico que poderia estar associado ao processo de infecção dos macrófagos pela *M. tuberculosis* (figura 13)

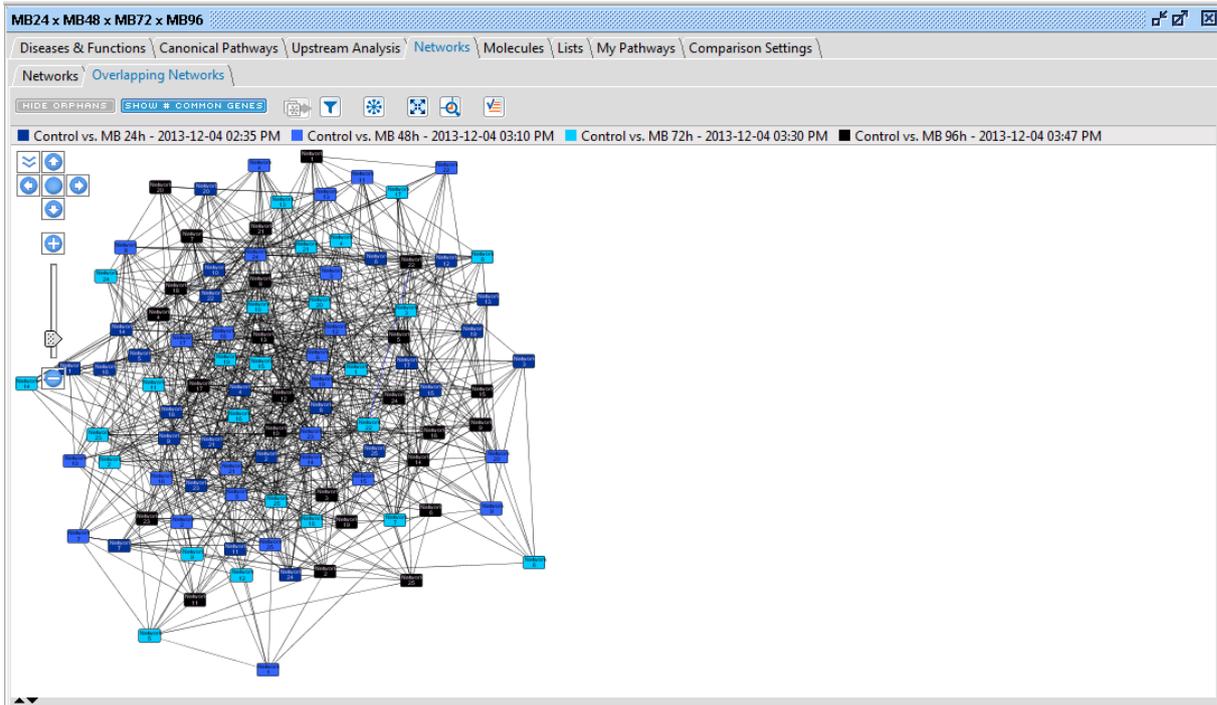


Figura 13. *Overlapping*: Sobreposição das redes gênicas associadas às vias metabólicas alteradas dos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 nos tempos de infecção de 24 a 96 horas.

Após a sobreposição das 25 principais redes gênicas formadas para cada tempo de infecção pela cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471, foi observado que as duas das principais redes relacionadas com o processo de infecção são controladas pelo gene que codifica para a síntese do IFN-alfa (**figura 14 e 15**). Além disso, foi realizada uma relação dos genes descritos na via **figura 15** com as afecções/doenças associadas a eles.

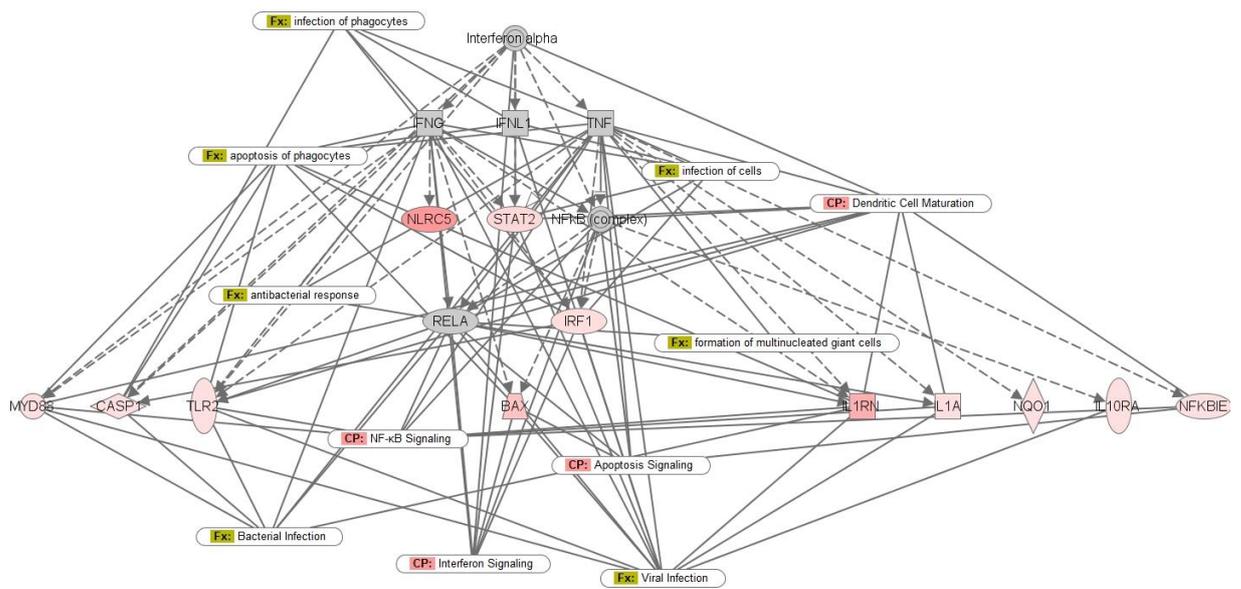


Figura 15. Rede gênica associada ao processo de infecção de macrófagos pela cepa da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e associação com afecções associadas a eles. A coloração e intensidade desta de cada gene refere-se ao nível de expressão após o ultrassequenciamento. Em vermelho: genes com expressão aumentada. Em verde: genes com expressão reduzida. Em cinza: prováveis moléculas reguladoras com expressão aumentada.

Para verificar o tipo de morte celular vista nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471, foi realizado um estudo das rotas metabólicas associadas a este processo no decorrer da infecção e especificamente em 96 h (**tabela 13**). Em seguida foram selecionados todos os genes relativos as duas primeiras rotas, morte celular e necrose (*cell death* e *necrosis*) observadas na tabela 24 (**tabela 14**)

Tabela 13. Relação das vias metabólicas de morte celular associadas as moléculas ativadas, de macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, no tempo de 96 h

Table view \ Tree View \ Select Observation: Control vs. MB 96h - 2...

The filtering found 48 Functions for Cell Death and Survival

<input type="checkbox"/>	Category	Diseases or Functions Annotation	p-Value	Predicted Active	Activation z-score	Notes	Molecules	# Molecules
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death	2,18E-12		0,668		↑ABCB4, ↑ABCC5, ↑ABL2, ↑ADAM12, ↑ADM, ↑ADORA3, ↑ADRBK1, ↑ADRM1, ↑... all 519	519
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	necrosis	3,79E-12		1,217		↑ABCB4, ↑ABL2, ↑ADAM12, ↑ADM, ↑ADORA3, ↑ADRBK1, ↑ADRM1, ↑AFAP1, ↑... all 441	441
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of tumor cell lines	7,28E-10		1,372		↑ABCB4, ↑ABL2, ↑ADM, ↑ADRBK1, ↑ADRM1, ↑AFAP1, ↑AIM2, ↑AKAP12, ↑AKT1 all 353	353
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	apoptosis	4,46E-09		1,193		↑ABL2, ↑ADAM12, ↑ADM, ↑ADORA3, ↑ADRBK1, ↑AGAP2, ↑AIM2, ↑AKAP12, ↑... all 400	400
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	1,28E-07		1,517		↑ABL2, ↑ADM, ↑ADRBK1, ↑AIM2, ↑AKAP12, ↑AKT1, ↑AKT2, ↑ALKB3, ↑AMER1 all 269	269
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell viability	1,13E-04	Decreased	-4,784	bias	↑ADRBK1, ↑AK5, ↑AKT1, ↑AKT2, ↑ALKB3, ↑ALPK2, ↑ANKS1B, ↑ANLN, ↑ANTX... all 204	204
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	mitochondrial cell death of tum	1,91E-04		1,992		↑AKT1, ↑CCNB1, ↑CDK1, ↑COX8A, ↑DDX58, ↑LTBP1, ↑MCL1 all 7	7
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of immune cells	2,05E-04		-0,408		↑ADORA3, ↑AKT1, ↑ANXA1, ↑ARRB1, ↑BIRC3, ↑CS, ↑CCL3, ↑CCL4, ↑CCL5, ↑CCR5 all 68	68
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of lymphoma cell line	2,53E-04		0,792		↑AKT1, ↑BACH2, ↑BBC3, ↑BIRC3, ↑BLNK, ↑BMX, ↑BTG2, ↑CAT, ↑CCRS, ↑CD48, ↑... all 45	45
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell survival	2,76E-04	Decreased	-4,781	bias	↑ADRBK1, ↑AK5, ↑AKT1, ↑AKT2, ↑ALKB3, ↑ALPK2, ↑ANKS1B, ↑ANLN, ↑ANTX... all 210	210
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	apoptosis of lymphoma cell line	3,31E-04		0,738		↑AKT1, ↑BACH2, ↑BBC3, ↑BIRC3, ↑BLNK, ↑BMX, ↑CAT, ↑CD48, ↑CD59, ↑CNN2, ↑... all 39	39
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of tumor cells	3,55E-04		1,686		↑ADAM12, ↑AGAP2, ↑AKT1, ↑AKT2, ↑ATP7B, ↑BMP6, ↑BRCA1, ↑BUB1B, ↑CASP1 all 50	50
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell viability of tumor cell lines	3,74E-04	Decreased	-4,490	bias	↑ADRBK1, ↑AK5, ↑AKT1, ↑AKT2, ↑ALKB3, ↑ALPK2, ↑ANKS1B, ↑ANLN, ↑APEX1 all 162	162
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of cancer cells	3,79E-04		1,019		↑AGAP2, ↑AKT2, ↑ATP7B, ↑BMP6, ↑BRCA1, ↑BUB1B, ↑CASP1, ↑CAT, ↑CD22, ↑... all 44	44
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	apoptosis of lymphoblasts	4,54E-04		-1,153		↑CCL3, ↑CCL4, ↑CCL5, ↑CD59, ↑EIF2AK2, ↑LGALS1, ↑SMPD1 all 7	7
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of leukemia cell lines	7,39E-04		0,658		↑ABCB4, ↑AKT1, ↑ARG1, ↑BIRC3, ↑CS, ↑C5AR1, ↑CAT, ↑CCRS, ↑CD4, ↑CD59, ↑... all 74	74
<input type="checkbox"/>	Cell Death and Survival	cell death of hematopoietic cell	7,79E-04		0,503		↑BIRC3, ↑CCL5, ↑CCRS, ↑EIF2AK2, ↑FASLG, ↑GGT1, ↑HCK, ↑HCST, ↑HES1, ↑IFIH1 all 27	27

Tabela 14. Relação das moléculas ativadas nas vias de morte celular e necrose de macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, no tempo de 96 h

HCK↓	HCST↓	HDAC11↓	HDAC5↓
HDAC6↓	HES1↑	HIST1H2BH/HIST1H2BO*↓	HMMR↓
HNRNPA1↓	HOXA5↑	HOXA7↓	HSPA1A/HSPA1B*↑
HTRA1↓	ID1↑	IFIH1↑	IFNB1↑
IFNE↑	IGF1↑	IGF1R↓	IGF2R↓
IGFBP7↓	IKBKE↓	IL15↑	IL17D↓
IL17RD↑	IL1A↑	IL1B↑	IL24↑
IL2RA↑	IL2RB↓	IL32↓	IL6↑
IL7R↑	IL8↑	ILK↓	INCENP↓
INHBA↑	IRF4↑	IRF8↓	ITGA2↑
ITGA3↓	ITGAL↓	ITGAM↓	ITGB2↓
ITGB3↑	ITGB3BP↓	JUN↑	KIF14↓
KLF4↑	LAIR1↓	LARP1B↓	LETM1↓
LGALS1↓	LGALS12↓	LGALS3BP↑	LGALS9↓
LIG1↓	LILRB1↓	LMO2↓	LPAR1↓
SMPD2↓	SOCS3↑	SOD2↑	SPI1↓
SPN↓	SPP1↓	ST6GAL1↓	STMN1↓
STOML2↓	STRA6↑	SYNGR2↓	TAF6↓
TAGLN2↓	TF↓	TGFA↑	TGM3↓
THBS1↑	TLR3↑	TMEM110↓	TMSB10/TMSB4X*↓
TNFAIP3↑	TNFAIP8L2↓	TNFRSF14↓	TNFRSF1B↓
TNFRSF9↑	TNFSF10↑	TNFSF13↑	TNFSF14↑
TOP2A↓	TRADD↑	TRAF1↑	TRAF7↓
TRAIP↓	TRAP1↓	TRIB3↓	TRPC1↓
TSC22D2↑	TTK↓	TUBA1A↓	TUBB↓
TYMP↓	TYMS↓	UBA7↓	UBE2C↓
UBE2S↓	UCP2↓	UNC119↓	UNG↓
USP18↑	USP2↑	USP22↓	VAV1↓
WEE1↓	XAB2↓	XDH↑	YWHAQ↑

6.6.2.3. VALIDAÇÃO DOS PRINCIPAIS GENES PELA PCR EM TEMPO REAL E DOSAGENS DE PROTEÍNAS

Foram validados alguns genes com expressão diferencial, observados durante o sequenciamento dos transcriptomas dos macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471, dentre outros, pela PCR em tempo real. Foram utilizadas placas pré-preparadas de PCR *array*, contendo

iniciadores para genes relacionados com resposta a infecção bacteriana em macrófagos, pré-determinados pelo fabricante e fornecedor das placas de PCR *array* (disponível em http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-148Z.html).

Além disso, foram estudadas as expressões de 16 proteínas com o kit *Human Fluorokine MAP Multiplex 16 plex* (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) relacionadas com a resposta imunológica a infecções por bactéria.

Os resultados de expressão gênica pela PCR *array* após análise e dosagem de algumas proteínas estatisticamente significante estão descritos na **tabela 15**.

Tabela 15. Resultados dos testes estatísticos para avaliação da expressão gênica dos genes *BAX*, *BCL2*, *BCL2L1*, *CASP3*, *ICAM1*, *L10*, *IL8*, *MCL1*, *NFKB* e *IL1B*, das amostras de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e H37Rv e dosagem das proteínas IL8 e IL1B.

Tempo (Horas)	BAX			BCL2			BCL2L1			CASP3			ICAM1		
	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing
24	(--)	(--)	***	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
48	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
72	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	**	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
96	(--)	(--)	*	(--)	(--)	**	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	***	**
120	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	**	(--)	(--)
144	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)
168	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)
192	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)
	IL10			IL8			MCL1			NFKB			IL1B		
	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing
24	(--)	(--)	(--)	(--)	**	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	***	(--)	(--)	(--)
48	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)	(--)	(--)	**	***	**	(--)	*	(--)
72	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	***	(--)	(--)	***
96	***	***	***	(--)	*	***	***	***	(--)	(--)	(--)	***	***	***	**
120	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	*	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
144	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)	***	(--)	(--)
168	*	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	**	(--)	(--)	*	(--)	(--)
192	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	***	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)

PCR array	
p<0,05	*
p<0,01	**
p<0,001	***

Luminex	
p<0,05	*
p<0,01	**
p<0,001	***

Legenda: Foi aplicado o teste estatístico two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni. Foram comparados os valores de expressão das amostras de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* cepa H37Rv e W-Beijing 1471 com as amostras não infectadas (coluna 1 e 2 respectivamente) e entre as amostras infectadas (coluna 3).

Foram analisados também os genes que codificam para o IFNA1 e a IL12B pela PCR *array* (**gráficos 06 e 07**). Além disso, para confirmação da expressão da proteína, foi realizada a dosagem de IFNA1, por ELISA.

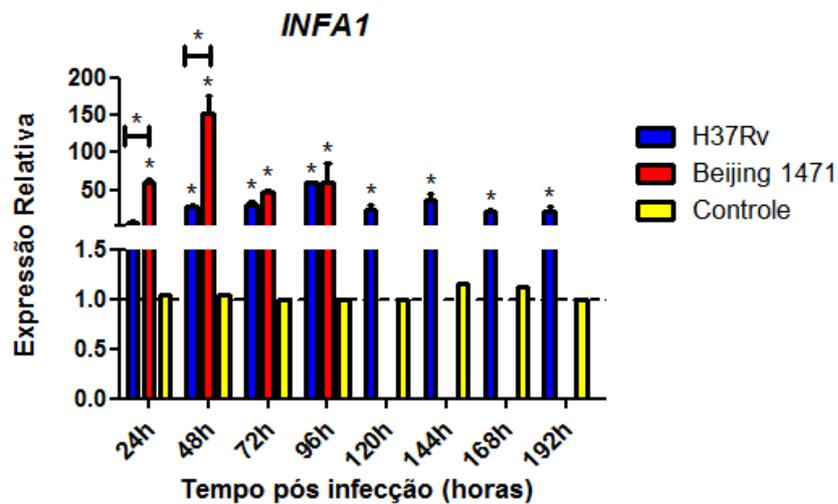


Gráfico 06. Resultado da análise da expressão gênica do gene IFNA1 em macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e H37Rv.

A expressão de IFNA1 foi aumentada em todos os tempos analisados na infecção pela *M. tuberculosis* H37Rv e nos tempos 24 a 96 horas de infecção pela *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 ($p < 0,001$). O pico de expressão do IFNA1 foi observado no tempo 48h com aumento de 36 vezes em *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e no tempo 96h com aumento de 27 vezes em *M. tuberculosis* H37Rv. Nos tempos 24 e 48h, a expressão de IFNA1 aumentou nove ($p < 0,05$) e 25 vezes ($p < 0,001$), respectivamente, em *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 quando comparado à H37Rv. O aumento do IFNA1 pela dosagem da proteína foi confirmado apenas nas amostras de macrófagos infectadas com a *M. tuberculosis* cepa W-Beijing 1471.

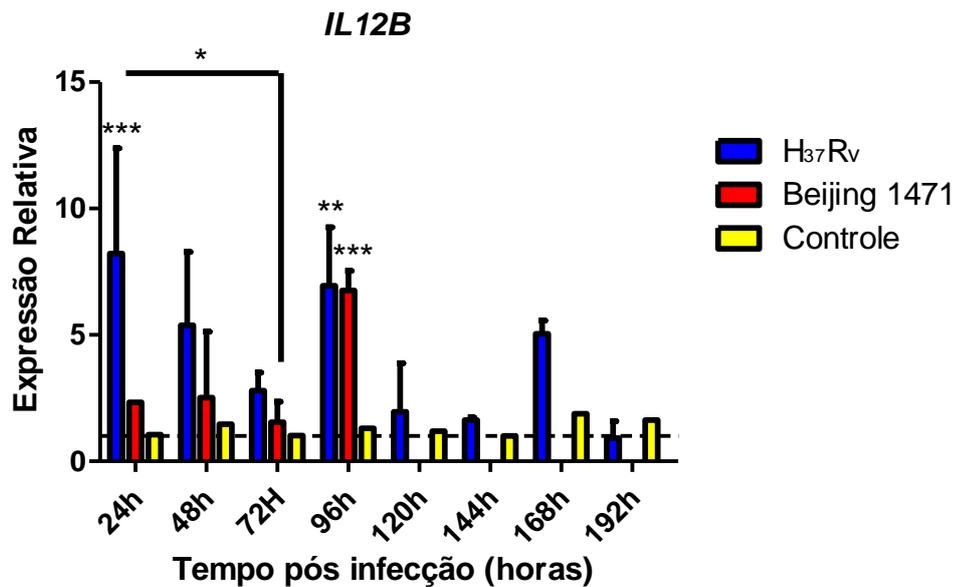


Gráfico 07. Resultado da análise da expressão gênica do gene que codifica para a IL12B de macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis*, H37Rv e cepa W-Beijing 1471

IL12B teve a sua expressão aumentada em sete vezes ($p < 0,001$) apenas no tempo 24h e 96h na infecção pela *M. tuberculosis* H37Rv e no tempo 96h na infecção pela *M. tuberculosis* W-Beijing 1471, quando comparado ao controle não infectado. Quando comparado às amostras infectadas com cepa W-Beijing 1471, IL12B aumentou em média 13 vezes ($p < 0,05$) no tempo 24 horas na infecção com H37Rv. Não foi possível confirmar a expressão da proteína nas amostras, por ELISA.

Em relação ao TNFa foi observado também um considerável aumento na expressão gênica apenas no tempo de infecção de 96h das amostras infectadas com a *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 (**gráfico 08**).

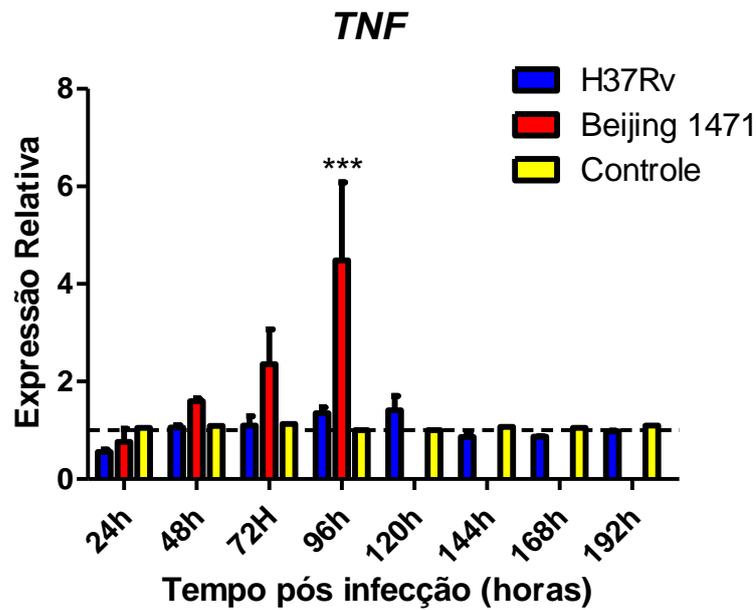


Gráfico 08. Resultado da análise da expressão gênica do gene que codifica para TNFa de macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* H37Rv e cepa W-Beijing 1471.

Foi realizada a dosagem de TNFa por Luminex e houve um aumento, estatisticamente relevante ($p < 0,05$) na expressão no tempo de 72h para as amostras infectadas com a *M. tuberculosis* cepa H37Rv e W-Beijing 1471, e um aumento estatisticamente relevante ($p < 0,001$) no tempo de 96h apenas para as amostras infectadas com a *M. tuberculosis* cepa W-Beijing 1471 (**gráfico 09**).

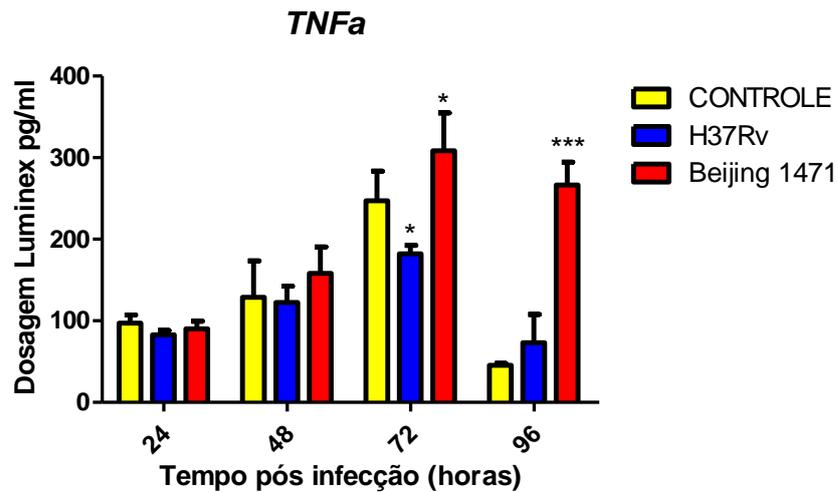


Gráfico 09. Resultado da análise da expressão proteica de TNF α de macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* H37Rv e cepa W-Beijing 1471.

Foram também confirmadas as expressões, por Luminex, da IL1A, IL1RA, IL2, IL4, IL6, MCP1, MIP1A e MIP1B das amostras de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471, nos tempos de 24 a 96 horas (**tabela 16**). Em geral, as amostras de macrófagos infectadas com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 apresentaram uma resposta imunológica mais estatisticamente relevante, com aumento das principais IL e quimiocinas.

Tabela 16. Resultados dos testes estatísticos para avaliação da expressão proteica de IL1A, IL1RA, IL2, IL4, IL6, MCP1, MIP1A e MIP1B, das amostras de macrófagos infectados com as cepas da *M. tuberculosis*, W-Beijing 1471 e H37Rv.

Tempo (Horas)	IL1A			IL1RA			IL2			IL4		
	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing									
24	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	*	(--)
48	(--)	***	***	***	***	***	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
72	*	***	***	***	***	***	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
96	(--)	***	***	(--)	**	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
	IL6			MCP1			MIP1A			MIP1B		
	H37Rv	W-Beijing 1471	H37xBeijing									
24	(--)	(--)	(--)	(--)	*	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)	(--)
48	(--)	(--)	(--)	(--)	**	*	(--)	***	***	(--)	***	***
72	(--)	***	***	(--)	*	(--)	(--)	***	***	***	***	**
96	(--)	***	***	(--)	***	*	(--)	***	***	***	***	***

Luminex	
p<0,05	*
p<0,01	**
P<0,001	***

Legenda: Foi aplicado o teste estatístico two-way ANOVA e pós teste de Bonferroni. Foram comparados os valores de expressão das amostras de macrófagos infectados com a *M. tuberculosis* cepa H37Rv e W-Beijing 1471 com as amostras não infectadas (coluna 1 e 2 respectivamente) e entre as amostras infectadas (coluna 3).

7. DISCUSSÃO

7.1. CULTIVO DE MACRÓFAGOS, INDUÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS, INFECÇÃO COM AS CEPAS DA *M. tuberculosis* H37RV E W-BEIJING 1471 E EXTRAÇÃO RNA TOTAL DOS MACRÓFAGOS E CONTROLES – refere-se aos itens 6.2

O cultivo das células THP1 e transformação em macrófagos foi inicialmente realizado apenas na presença das VA e VD com o intuito de mimetizar ao máximo, infecções *in vivo*, inclusive com a formação de células gigantes multinucleadas, que estão presentes principalmente na região central do granuloma. Sua função ainda não é bem caracterizada, porém pode-se notar que as culturas destes tipos celulares são capazes de conter mais eficientemente o crescimento micobacteriano, em experimentos com taxa de infectividade de 10, além de persistirem viáveis por quase dois meses após infecção pela cepa padrão da *M. tuberculosis* H37Rv, podendo de certa forma, mimetizar pela primeira vez *in vitro*, infecções crônicas (ESTRELLA *et al*, 2011).

A VD além de indutora no processo de transformação das células THP1 em macrófagos, determina um papel importante na resposta imune inata e adaptativa frente a infecção pela *M. tuberculosis*, participando de vias metabólicas envolvidas na síntese de peptídeos antimicrobianos e indução da autofagia, provavelmente pela síntese de IL15 (FABRI, *et al.*, 2011). Durante a infecção, macrófagos aumentam a expressão de receptores de VD para tentar eliminar mais eficientemente o bacilo, promovendo também quimiotaxia, aumento da fagocitose, processamento de antígeno, produção de superóxidos e produção de outras citocinas pró-inflamatórias, como IL1B e TNF-alfa (ESTRELLA, *et al*, 2011).

Em relação a VA, Estrella e colaboradores (2011) observaram uma redução do crescimento intramacrofágico micobacteriano em culturas expostas por 72 h a 1 μ M de VA. Wheelwright e colaboradores (2014) verificaram uma redução de colesterol celular e aumento da acidificação lisossomal, via NPC2, em culturas monocíticas infectadas com a *M. tuberculosis*. A proteína NPC2 está envolvida na regulação do transporte intracelular de colesterol. Mutações no gene que codifica para esta proteína estão associadas a doença de Niemann-Pick, que envolve o acúmulo de colesterol e glicolípídeos nos compartimentos lisossomais.

A julgar pela importância no processo de infecção e capacidade de causar diferenciação de células THP1 em macrófagos, o uso destas vitaminas foi considerado na realização metodológica deste estudo.

Após padronização foi demonstrado que a melhor concentração de vitaminas foi de um μ M em um período de exposição de 72 h, onde a maioria das células já se encontrava morfológicamente semelhante a macrófagos, embora não aderida a placa de seis poços. Após esse tempo foi realizada a infecção, como descrita na seção **5.3 de Materiais e Métodos (pág 49)**.

Era esperado que após a infecção, ocorresse a adesão das células, teoricamente já macrófagos completamente transformados, no fundo da placa de seis poços, uma vez que a própria infecção significa um estímulo para a diferenciação de monócitos. Porém, muitas células permaneceram em suspensão, dentre outras que já estavam completamente aderidas. As células que permaneceram em suspensão pareciam estar transformadas de forma incompleta, embora morfológicamente muito parecidas a macrófagos.

Durante a troca de meio das células, a cada três dias, ocorreram perdas substanciais de células ainda não aderidas, decorrente da excessiva manipulação

das placas. Ainda, de acordo com o protocolo sugerido por Estrella e colaboradores (2011), a cada 72 h foram adicionadas novas células pré-ativadas por 72 h com VA e VD, porém não infectadas, para manutenção das culturas por longos períodos.

A adição de novas células manteve as culturas por aproximadamente 15 dias. Algumas células recém-adicionadas juntaram-se as células infectadas aderidas a placa, formando as células gigantes multinucleadas (**figura 08 pág. 59**).

Porém muitas células permaneceram em suspensão, juntamente a outras que não aderiram no processo de infecção. Conseqüentemente foi gerado um meio onde vários tipos celulares poderiam ser encontrados, dentre eles:

- Células previamente infectadas não aderidas;
- Células previamente infectadas aderidas;
- Células não infectadas e não aderidas;
- Células não infectadas e aderidas;
- Células não infectadas adicionadas após 72 horas da infecção inicial que juntaram-se as células já aderidas e infectadas;
- Células não infectadas adicionadas após 72 horas da infecção em suspensão ou recentemente infectadas por bacilos contidos no sobrenadante, dentre outras possibilidades.

Além de ser claramente impossível separar os tipos celulares para extração dos RNA totais, após análise da contagem das UFC das micobactérias provenientes de dentro das células, observou-se uma reduzida infectividade das células e queda substancial da contagem após 72 h de infecção (dados não demonstrados), indicando perdas não somente pela ação bactericida do macrófago, mas pelas excessivas manipulações e aumento relativo de tipos celulares não infectados.

Porém, de fato as culturas permaneceram viáveis por longos períodos e com formação das células gigantes multinucleadas.

Visto a necessidade de uma uniformidade celular para uma correta caracterização do perfil de expressão gênica global por sequenciamento, foi realizada uma alteração no protocolo de transformação das células THP1, com uma indução por 24 h pelo PMA e descanso de 72 h em exposição às VD e VA. Após esse período foi realizada a infecção.

Além das células permanecerem todas completamente transformadas e uniformemente aderidas às placas de seis poços, foi possível manter as culturas por aproximadamente 15 dias. Ainda, foram adicionadas a cada 72 h, células previamente ativadas com as VD e VA. As células adicionadas se juntaram quase que completamente as células já aderidas à placa. Dessa maneira foi possível controlar os experimentos de extração de RNA total, garantindo de certa forma, a extração apenas de um tipo celular.

Durante a realização do experimento, mesmo com a adição das VA e VD, todas as culturas de macrófagos infectadas com a cepa W-Beijing 1471 morreram após 120 h de infecção, o que não ocorreu com as amostras infectadas com a cepa padrão H37Rv, que duraram aproximadamente 15 dias. Embora o ponto 120 h das células infectadas com a cepa W-Beijing 1471 tenha sido extraído, não foi considerado nos dados, pois a maioria (mais de 85%) das células já estava mortas.

7.2. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DOS MACRÓFAGOS INFECTADOS PELA *M. TUBERCULOSIS*, DEPLEÇÃO DOS rRNAs E CONSTRUÇÃO DAS BIBLIOTECAS DE CDNA PARA SEQUENCIAMENTO – refere-se ao item 6.3

As amostras de RNA totais extraídas a partir dos macrófagos infectados e controles foram consideradas adequadas para sequenciamento após determinação do RIN, antes da depleção dos rRNAs.

Com o intuito de avaliar alguns RNAs não codificantes dos macrófagos, foi proposto um protocolo inicial de preparo de bibliotecas de cDNA a partir de RNA total depletado apenas dos rRNA. Embora o protocolo de extração de RNA utilizado não conserve pequenos RNAs menores do que 100 bases, outros RNA não codificantes maiores poderiam ser avaliados durante o sequenciamento, como os RNA nucleares (snRNA) e nucleolares (snoRNA) (MATTICK & MAKUNIN, 2006).

Os RNAs não codificantes possuem distintas funções celulares, desde a participação direta na síntese proteica até a regulação da expressão gênica, como os RNA de interferência (siRNA), que incluem os microRNA (WOLFSWINKEL & KETTING, 2010). Mais recentemente foram descobertos RNA de regiões intergênicas (lincRNA), contendo mais de 300 bases, que podem regular diretamente a expressão de muitos genes, bem como a tradução do mRNA em proteína (GUTTMAN *et al.*, 2009).

A compreensão de muitos desses RNAs poderiam servir como adjuvante na elucidação de um transcriptoma, devido à participação ativa na regulação da expressão gênica e proteica, justificando o sequenciamento destes juntamente aos mRNA.

Após a construção das bibliotecas de cDNA a partir do RNA total das amostras de macrófagos infectadas com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471, observou-se uma grande perda de material, pois as bibliotecas além de estarem com concentrações baixas mesmo após a PCR de enriquecimento, os fragmentos não estavam na sua maioria na região de 260pb, como determinam os protocolos da Illumina (*TruSeq RNA Sample Preparation Guide*, p.66). Frente a isto, todas as bibliotecas para sequenciamento foram realizadas a partir da captação específica de mRNA poliadenilados, que representam os RNA codificantes de células eucariotas (NILIMA SARKAR, 1997).

Após o sequenciamento, foram gerados aproximadamente 40 milhões de sequências corretamente indexadas, para cada amostra de macrófago. Mais de 90% foram classificadas com score Q acima de 30 (**figura 10, pág.65**).

O score de qualidade Q mensura a qualidade de cada base de cada sequência pela determinação do score Phred, que basicamente se refere a probabilidade de um erro durante o processamento do *base-calling*, criado por Ewing e Green (1998).

Durante a realização do *base-calling* de um sequenciamento, um software é responsável em analisar os dados gerados de um sensor, para predizer cada base individualmente e esse software pode mudar de acordo com a plataforma de sequenciamento. Em plataformas Illumina a predição de cada base é feita a partir de um arquivo de imagem, referente à fluorescência emitida em cada ciclo do sequenciamento em cada um dos quatro sensores, sendo um para cada base. Essa predição é feita pelo software Bustard e o score Phred é determinado nesta fase (LEDERGERBER & DESSIMOZ, 2011).

O score Phred foi inicialmente desenvolvido para sequenciamentos por síntese, tal como Sanger e as plataformas Illumina. Os algoritmos utilizados pelo Phred verificam cada pico gerado para cada base e os picos que rodeiam esta base, durante a aquisição e conversão de imagem em base de cada ciclo. Quanto maior o valor do score Phred, maior a qualidade da base, ou menor a possibilidade daquela base ser um erro de sequenciamento. Se o Phred indica um score de qualidade de 30 para uma base, as chances daquela base ser incorreta é de apenas 1 em 1.000, enquanto que valores de 40 indicam uma chance de erro de apenas 1 em 10.000 (EWING & GREEN, 1998).

7.3. ANÁLISES PRIMÁRIAS E SECUNDÁRIAS DAS AMOSTRAS MACRÓFAGOS INFECTADAS COM AS CEPAS DA *M. tuberculosis* CEPA H37RV E W-BEIJING 1471 E CONTROLES, APÓS SEQUENCIAMENTO – refere-se ao item 6.6.1

Após mapeamento com quatro bases de dados de referência para *Homo Sapiens*, observou-se uma alta similaridade/especificidade das sequências (mais de 80% em um primeiro alinhamento e acima de 90% após um realinhamento) com aquelas que continham sequências referentes ao genoma total de humano, proveniente do NCBI e do Ensembl (**tabelas 05, 06, 07 e 08 pág.68 e 69**).

A eficiência de um mapeamento de milhões de sequências contra um genoma de referência pode variar de acordo com as configurações escolhidas (velocidade, *mismatch*, etc) e com o software utilizado para esse objetivo. Muitos algoritmos já foram desenvolvidos especificamente para alinhamentos de milhões de pequenas sequências contra genomas de referência e softwares como o BWA,

Bowtie, SOAP e Novoalign podem ser utilizados com esse propósito (RUFFALO *et al.*, 2011).

Cada um deles tem suas vantagens e desvantagens, principalmente quanto à velocidade e acurácia, e o que tem sido feito hoje é a utilização de mais de um algoritmo para o mapeamento de uma mesma amostra. A acurácia de um mapeamento é especialmente importante em sequenciamentos de DNA para a busca de mutações (NIELSEN *et al.*, 2011).

O software utilizado no alinhamento das sequências de macrófagos foi o CLC Genomics Workbench e embora seja um programa completamente fechado, além de ser possível configurar parâmetros de *mismatch*, dentre outros, mais de um algoritmo é utilizado no mapeamento, sendo a última versão considerada mais rápida e acurada do que softwares como o BWA e Bowtie, para plataformas Illumina (CLC Bio, 2012 – disponível em: <http://www.clcbio.com/wp-content/uploads/2012/10/whitepaper-on-CLC-read-mapper.pdf>).

Embora em experimentos de RNA-Seq não há exatamente a obrigatoriedade de busca de mutações, quanto menor a porcentagem de erros durante o mapeamento, menos vieses terão que ser ajustados. Os vieses mais encontrados em experimentos de sequenciamento de transcriptoma se dizem respeito ao mapeamento de sequências de RNA não codificantes misturados na população de mRNA, determinação incorreta de isoformas e mapeamento de uma mesma sequência em mais de uma região, que no fim, podem alterar os valores de expressão (SCHWARTZ *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2010).

Na tentativa de sobrepujar esses vieses, o mapeamento foi realizado com máxima acurácia, aceitando-se no máximo três *mismatches* e busca de exons para diferenciação de isoformas. Uma das alternativas para lidar com sequências que

mapeiam em mais de uma região é retirá-las das análises, dessa maneira foram consideradas apenas as sequências que mapearam em uma única região, evitando assim alterações nos níveis de expressão de alguns transcritos (LI *et al.*, 2010).

O genoma de referência de *Homo Sapiens*, versão GRCh37.74, disponibilizado pelo Ensembl e utilizado no mapeamento das amostras de macrófagos, contém mais de 35 mil genes e aproximadamente 33 mil transcritos já anotados. Em média, 70% das sequências geradas de cada amostra foram consideradas únicas (**tabelas 06, 07 e 08, pág. 68 e 69**), ou seja, foram mapeadas em apenas uma região do genoma de referência.

Outros vieses importantes que podem ser observados na avaliação da expressão gênica global se dizem respeito à alteração nos valores de expressão de um determinado gene, decorrente de erros sistemáticos, variações técnicas e diferenças nos tamanhos dos transcritos. Em tese, transcritos maiores geram mais fragmentos durante o preparo das bibliotecas de cDNA e conseqüentemente geram maior número de sequências durante o sequenciamento, não necessariamente significando aumento na sua expressão (AANES *et al.*, 2014).

Os erros sistemáticos e variações técnicas se referem à diferença na quantidade de sequências geradas para cada amostra. Por questões técnicas, é possível que uma *lane* de uma *flow cell* gere mais sequências do que a outra e essa diferença não pode influenciar na avaliação da expressão gênica diferencial ao comparar duas amostras (BULLARD *et al.*, 2010).

Para evitar estes vieses, todas as bibliotecas de cDNA de macrófagos infectados ou não com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471, foram normalizadas por RPKM após o sequenciamento. A normalização por RPKM (*reads per kilobase per million reads* – sequências por quilo-base por milhão de sequências)

é realizada levando-se em consideração o tamanho do transcrito e a quantidade total de sequências geradas por amostra (RAPAPORT *et al.*, 2013).

7.4. ANÁLISES TERCIÁRIAS DAS AMOSTRAS DE MACRÓFAGOS INFECTADOS COM AS CEPAS DA *M. tuberculosis* H37RV E W-BEIJING 1471 – refere-se ao item 6.6.2

7.4.1. Análise da expressão gênica global diferencial

Após normalização e verificação das expressões gênicas globais, individuais de cada amostra, os resultados relativos aos macrófagos infectados com as cepas H37Rv e W-Beijing 1471, nos diversos tempos, foram comparados aos resultados dos controles não infectados, para avaliação da diferença de expressão gênica entre as amostras (**figura 12, pág. 71**).

Após agrupamento dos genes de acordo com o seu nível de expressão (**tabela 09, pág. 72**), observou-se que a maioria dos genes não apresentava expressão gênica diferencial, enquanto que 19 e 18% foram classificados como menos e mais expressos respectivamente (**gráfico 01, pág. 72**), indicando proporcionalidade dessas duas populações. De acordo com Dillies e colaboradores (2012), um balanço entre os genes mais ou menos expressos e uma maior quantidade de genes sem diferença de expressão indicam uma adequada normalização das bibliotecas.

Ainda, nos macrófagos infectados por 96 h com a cepa hipervirulenta da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 foi observado um aumento no número total de genes com expressão reduzida.

Durantes os experimentos com as cepas W-Beijing 1471, os macrófagos sobreviveram apenas até o quinto dia de infecção, com uma taxa de morte acima de 85% para esse dia. No quarto dia (96 h) de infecção a maioria das células ainda estava viável, porém, é possível que estas já estivessem entrando em um estado de declínio metabólico decorrente da infecção, reduzindo a expressão de genes responsáveis pela viabilidade celular, levando a morte no dia seguinte. Outros estudos já associaram a morte prematura de macrófagos à infecção por cepas hipervirulentas da *M. tuberculosis* W-Beijing (MANCA *et al.*; 2004; MANCA *et al.*, 2005).

Na última década, cepas hipervirulentas da família W-Beijing tem sido mais frequentemente associadas ao aumento da incidência da TB no mundo, com alto índice de desenvolvimento de resistência às drogas disponíveis para tratamento. O sucesso do bacilo tem sido associado à sua grande capacidade de disseminação, com altas taxas de mortalidade e resistência as drogas. Estudos com estas cepas comprovam a capacidade do bacilo em gerar mortes rápidas em ratos e macrófagos *in vitro*, corroborando os dados epidemiológicos obtidos até o momento (FALLOW *et al.*, 2010, SALINAS *et al.*, 2005).

Em relação aos macrófagos infectados com a cepa padrão da *M. tuberculosis* H37Rv, não houve diferença estatisticamente significativa no número total de genes com diferença de expressão entre os tempos avaliados. Embora as amostras infectadas com esta cepa tenham sobrevivido por até aproximadamente 15 dias de infecção, apenas as amostras até 96 h foram analisadas.

7.4.2. Análise das rotas metabólicas alteradas durante a infecção de macrófagos pelas cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471

Com o intuito de verificar as principais rotas metabólicas envolvidas nas infecções de macrófagos pela *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulência, todos os genes obtidos no ultrasequenciamento com expressão diferencial, de ambas as cepas, foram analisados em conjunto fazendo-se uma associação entre os genes e as vias metabólicas que são controladas por eles. Em seguida as vias foram classificadas de acordo com a maior alteração na expressão do grupo gênico as quais pertencem.

Em relação aos macrófagos infectados com a cepa padrão da *M. tuberculosis* H37Rv no tempo de 24 h, observou-se um padrão de ativação principalmente de vias metabólicas relacionadas com doenças infecciosas, organização, montagem, manutenção e função celular (**gráfico 03, pág. 75**). Esse perfil se manteve até o tempo de 72 h, porém, no tempo de infecção de 96 h, observou-se acréscimo de alguns genes envolvidos na ativação de vias de morte celular, em detrimento de genes envolvidos na organização e manutenção.

Durante os estágios iniciais da infecção de macrófagos por patógenos bacterianos, são observados primariamente eventos de readaptação ao novo meio ambiente (infecção) controlado por genes de remodelamento e adesão celular, bem como, aumento na expressão de moléculas sinalizadoras e de fatores de transcrição (Nau *et al.*, 2002).

Tailleux e colaboradores (2008) observaram um perfil de resposta semelhante em macrófagos e DCs infectadas com a cepa padrão da *M. tuberculosis* H37Rv. Eles determinaram perfis de assinaturas gênicas de fagócitos infectados com a *M.*

tuberculosis em diferentes tempos e foi observado um padrão de resposta associado a infecção celular, organização do citoesqueleto e mobilidade celular.

Em um outro estudo, Wang e colaboradores (2003) determinaram o perfil transcriptacional por *microarray*, de macrófagos derivados de monócitos sanguíneos e infectados com a cepa virulenta Erdman de *M. tuberculosis*. Após 4, 12, 24 e 48 h foram observados aumentos nas expressões de genes envolvidos na estruturação da matrix celular, processamento de rRNA, transcrição gênica, síntese de proteínas transmembrana, síntese de citocinas e quimiocinas.

Em contrapartida, na infecção pela cepa hipervirulenta da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 foi observado um perfil de resposta macrofágica diferenciado. Em primeiro lugar foram ativados genes associadas a doença infecciosa, porém em seguida foi observado um padrão metabólico relacionado com o controle da expressão gênica, morte celular, doenças imunológicas e inflamatórias (**gráfico 04, pág. 76**). No período de 72 e 96 h houve ainda um aumento na ativação de genes que regulam a morte celular. Essa ativação era esperada, visto que todos os macrófagos infectados por essa cepa morreram precocemente após 96 h.

Genótipos hipervirulentos da *M. tuberculosis*, especificamente as cepas W-Beijing, são reconhecidamente capazes de causar morte rápida em células ou camundongos, principalmente pela sua rápida multiplicação. Embora sejam capazes de ativar eficientemente macrófagos nos primeiros estágios da infecção, é possível que ocorra um retrocesso nesta ativação, levando a um aumento exacerbado da multiplicação bacilar e conseqüente morte celular em poucos dias (LÓPEZ *et al.*, 2003).

Após a avaliação das principais vias metabólicas ativadas durante a infecção foi realizada uma hierarquização dos genes mais fortemente relacionados com a

regulação destas vias. Após a construção de um *heatmap* observou-se 15 genes associados ao controle/regulação das vias metabólicas alteradas no decorrer da infecção de macrófagos com as cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471 (**tabela 10, pág. 78**).

De acordo com a **tabela 10 (pág. 78)**, os principais reguladores envolvidos na ativação das vias do **gráfico 05 (pág. 78)**, são da família Interferon (IFN), dentre eles o Lambda 1 (IFNL1), Alfa 2 (IFNA2) e Gama (IFNG) e outros relacionados com o controle do crescimento, diferenciação, proliferação e morte celular, bem como resposta pro-inflamatória.

Os IFNs são considerados citocinas com potente atividade antiviral e antimicobacteriana. Até o momento foram descritas três subclasses (I, II e III), cada uma relacionada com um tipo específico de receptor e transdução de sinal (DICKENSHEETS, *et al.*, 2013, DHEDA *et al.*, 2010).

A classe I, representada pelos IFN- α , β , ϵ , κ e ω , é conhecida principalmente pela sua ação antiviral via proteínas codificadas por uma variedade de ISGs (genes estimulados por IFNs). A classe II é representada unicamente pelo IFN- γ , responsável pela ativação de resposta Th1 em infecções pela *M. tuberculosis*. A classe III, mais recentemente descoberta, é representada pelos IFN- λ 1, λ 2 e λ 3 (conhecidos como IL28A, IL28B e IL29), com ações antivirais, antiproliferativa e imunomodulatória (DICKENSHEETS, *et al.*, 2013, ZHENG *et al.*, 2013).

Nos macrófagos infectados com a cepa W-Beijing houve uma maior ativação das vias reguladas pelo IFNL1 (IFN- λ 1) nos tempos de 24, 72 e 96 h, quando comparados aos macrófagos infectados pela H37Rv (**tabela 10, pág. 78**). Embora os IFN- λ estejam mais correlacionados com infecções virais, estudos comprovam a

ação dessa subclasse de citocinas na modulação da resposta Th1/Th2 (ZHENG *et al.*, 2013).

Ao avaliar a expressão gênica dos IFNL1 nas amostras de macrófagos infectadas com as cepas W-Beijing 1471 e H37Rv, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle não infectado que pudessem corroborar os dados da **tabela 10 (pág. 78)**. Porém, ao analisar as expressões das outras classes de IFNs, foi observado um aumento significativo dos representantes da classe I, principalmente dos IFNA2, IFNB e IFNE, que tal como IFNL, atuam pela ativação da sinalização via JAK/STAT (DICKENSHEETS, *et al.*, 2013).

A sinalização JAK/STAT (*Janus kinase/ signal transducers and activators of transcription*) é uma das principais vias de transdução de sinal responsável pela homeostase, envolvida na proliferação, diferenciação, migração e morte celular por apoptose. Além disso, a sinalização por esta via, induzida por IFN- γ , tem sido associada a resposta antibacteriana, por aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, bem como, aumento de moléculas pro-inflamatórias, tais como IL12 e TNF- α . Deficiências nesta via podem induzir doenças inflamatórias e imunológicas (RAWLINGS *et al.*, 2004, KOUL *et al.*, 2004).

Embora os macrófagos não sejam capazes de a princípio, produzir IFN- γ , foram observados aumentos nas expressões dos genes que codificam para JAK e STAT em todos os tempos avaliados para as cepas W-Beijing 1471 e H37Rv indicando a ativação desta via, provavelmente pela ação dos IFNs da classe I. Aditivamente foram observados aumentos nas expressões de inibidores tais como SOCS e PIAS, corroborando a ativação da sinalização por esta via.

Em infecções pela *M. tuberculosis* patogênica, a sinalização via JAK/STAT pode estar inibida pelo aumento da expressão do supressor SOCS, um dos

principais controladores negativos desta via (KOUL *et al.*, 2004). Manca e colaboradores (2005) compararam a supressão de JAK/STAT entre camundongos infectados com cepas W-Beijing e não-Beijing e observaram que nas infecções pela W-Beijing houve um aumento na expressão de SOCS1, SOCS4, SOCS5, assim como de outros supressores de JAK/STAT, tais como PIAS1, Ptpn1 e Ptpns1.

No presente estudo foi observado um aumento na expressão de SOCS apenas nos macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, em todos os tempos avaliados, com uma exacerbação em 96 h. Além disso, houve também uma maior expressão do inibidor PIAS nas amostras infectadas pela W-Beijing 1471 quando comparada a aquelas infectadas com a cepa H37Rv, principalmente nos tempos de 24 a 72 h.

Já foi demonstrado que a supressão da via JAK/STAT e consequente redução da resposta ao IFN- γ pode afetar a diferenciação de células T e a produção de citocinas pro inflamatórias, levando a uma morte prematura de camundongos infectados com cepas hipervirulentas, incluindo W-Beijing (MANCA *et al.*, 2005).

Porém a ativação da sinalização JAK/STAT observada nos macrófagos infectados pelas cepas W-Beijing e H37Rv foi induzida provavelmente pelos IFNs da classe I, como pontuado anteriormente. A indução por essa classe de IFNs ocorre de maneira diferenciada, levando a ativação da expressão de genes relacionados com resposta antiviral e controle da proliferação celular (PLATANIAS, 2005).

7.4.3. Ativação dos Interferons da classe I versus *M. tuberculosis*

Os IFNs da classe I se ligam a receptores de membrana plasmática de macrófagos e são compostos pela subunidade IFNAR1 e IFNAR2. Já os IFNs da

classe II se ligam a receptores contendo as subunidades IFNGR1 e IFNGR2. Cada subunidade interage com um membro da família JAK, sendo JAK1 e JAK2 para os receptores de IFN- γ , JAK1 e uma tirosina quinase TYK2 para os receptores dos IFNs da classe I (**figura 16, abaixo pág.110**). A ativação de JAK associada aos IFNs da classe I resulta na formação de um complexo composto por STAT1/STAT2/IRF9 (fator 9 de regulação de IFN), que ao se translocar para o núcleo, liga-se ao DNA estimulando a transcrição de genes relacionados com a resposta via IFNs da classe I (ISRE). Já a ativação via IFN- γ estimula a transcrição de genes específicos, pela ligação de um complexo STAT1/STAT1 diretamente ao DNA nos sítios de ativação dos IFN- γ (GAS) (CHEN *et al.*, 2004 *apud* PLATANIAS, 2005).

A sinalização JAK/STAT via IFNs da classe I leva a um aumento na expressão de proteínas com efeitos inibitórios na proliferação celular e da morte por apoptose, mediada por quinases MAPK especialmente a família das p38 (HUANG *et al.*, 2004 *apud* PLATANIAS, 2005).

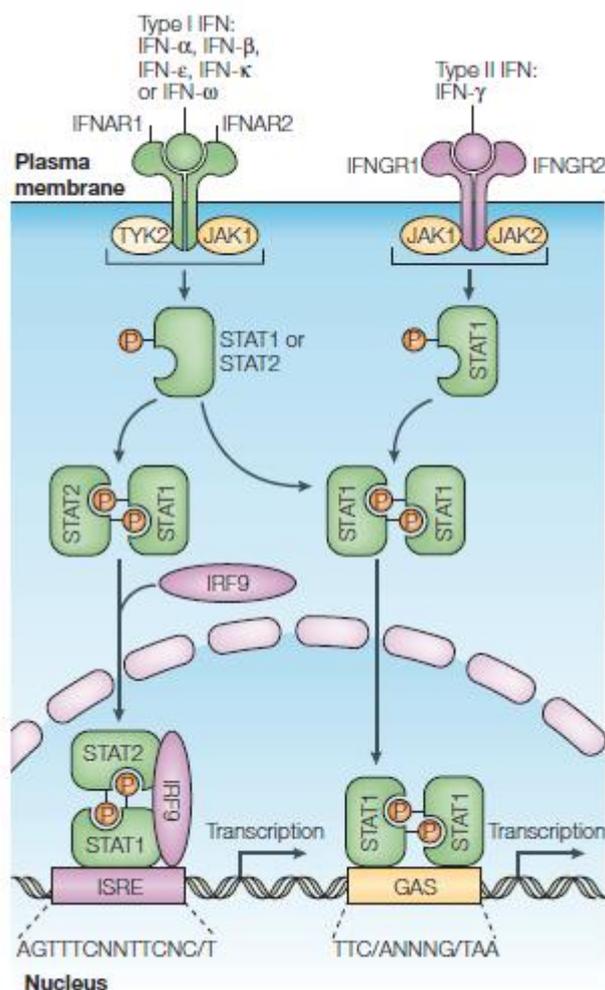


Figura 16. Cascata metabólica de ativação de JAK/STAT via IFNs da classe I e II. Figura retirada de Plataniás (2005).

Nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing em comparação com as infectadas com a cepa H37Rv, foi observado um maior aumento nas expressões de IFNAR2, JAK1, TYR2, STAT1, STAT2 e IRF9, em detrimento de JAK2 e IFNGR1, em todos os tempos avaliados. Houve também um aumento de MAPK1 nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing principalmente em 24 h de infecção.

Baseado nos dados dos prováveis reguladores das vias metabólicas associadas às infecções pela W-Beijing (**tabela 10, pág. 78**) relativas ao **gráfico 05 (pág.106)**, e de acordo com os resultados das expressões dos genes que participam destas vias, é possível correlacionar fortemente a participação de IFNs da classe I,

no desfecho observado nos macrófagos infectados por esta cepa. Manca e colaboradores (2004) correlacionaram a morte prematura de camundongos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing H8N8, com o aumento precoce da expressão de mRNA de IFNA e falha na resposta via IL12 e IFN- γ .

Os IFNs da classe I, especialmente os IFNA e IFNB, são considerados potentes inibidores da IL12, provavelmente pela produção do seu contrabalanceador IL10. A IL12 é uma das principais citocinas pro-inflamatórias envolvidas na ativação da resposta imune via Th1, juntamente com IFN- γ e TNF- α . Em contrapartida, IL10 tem ação anti-inflamatória, atuando como um inibidor da ativação de macrófagos e da resposta imunológica via Th1. Um balanço entre IL12 e IL10 se faz necessário para um controle eficiente da ativação das resposta via Th1/Th2. (BYRNES *et al.*, 2001).

Aditivamente ao aumento de IFNs da classe I foi observado um aumento nas expressões gênicas de IL12 e IL10 nas amostras de macrófagos infectadas com as cepas W-Beijing 1471 apenas no tempo de 96 h, confirmado posteriormente pela PCR em tempo real (**tabela 15 e gráfico 07, pág. 87 e 89**). Nas amostras infectadas com a cepa H37Rv, IL12 teve sua expressão aumentada já em 24 h de infecção e em 96 h, juntamente com IL10, porém em quantidade inferior, quando comparada as amostras infectadas com W-Beijing 1471.

Embora já se tenha comprovado a participação dos IFNs da classe I em infecções por cepas hipervirulentas da *M. tuberculosis* e sua associação com uma falha da resposta imune via Th1, ainda não foram completamente elucidadas as vias metabólicas envolvidas na ativação direta da morte prematura dos macrófagos infectados por estas cepas, tão quanto as moléculas/reguladores que fazem parte

destas vias, que poderiam, em tese, significar novos alvos terapêuticos para o tratamento da TB.

Para isso foram selecionadas as duas principais redes gênicas associadas ao aumento da expressão de IFNA, após sobreposição das principais redes construídas a partir de todas as vias metabólicas alteradas durante a infecção de macrófagos pela cepa W-Beijing 1471 (**figura 14 e 15, pág. 82 e 83**).

De acordo com as redes gênicas demonstradas nas **figuras 14 e 15 (pág. 82 e 83)**, o aumento da expressão de IFNA, confirmada pela PCR em tempo real (**gráfico 06, pág. 88**) e pela dosagem da proteína (dados não demonstrados), também está associado ao aumento na expressão de TNF e moléculas envolvidas na morte celular por apoptose, BAX e CASP, dentre outras.

Após validação pela PCR em tempo real dos principais genes envolvidos na morte celular programada, por apoptose (BAX, BCL2, BCL2L1, CASP3, MCL1), não foram observadas diferenças significativas nas amostras infectadas com a cepa H37Rv em nenhum tempo avaliado, bem como nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471 que pudesse explicar a morte precoce dos macrófagos após 96 h de infecção (**tabela 15, pág. 87**).

Por um outro lado, foi observado um aumento exacerbado e significativo na expressão de TNF- α , confirmado por PCR em tempo real e dosagem proteica, nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471 nos tempos de 72 e 96 h (**gráficos 08 e 09, pág. 90 e 91**).

7.4.4. TNF- α versus IFN1 versus *M. tuberculosis*

O TNF- α é uma importante citocina, com atividade pluripotente, envolvida na resposta imune frente a infecções pela *M. tuberculosis*. Além de participar na ativação de macrófagos, sinergicamente ao IFN- γ desempenha um papel importante na formação do granuloma, na prevenção da reativação da TB e na regulação da morte celular por apoptose. Camundongos deficientes desta citocina ou neutralizados com anti-TNF, não conseguem controlar eficientemente a multiplicação bacilar intramacrofágica, levando a uma disseminação descontrolada da bactéria e morte rápida, mesmo em infecções crônicas (LIN *et al.*, 2007; FLYN *et al.* apud O'GARRA *et al.*, 2013).

Por um outro lado, o TNF- α em altas concentrações fisiológicas pode exercer atividade citotóxica, causando necrose em células infectadas com a *M. tuberculosis* e favorecendo o crescimento da bactéria. No interior do granuloma, as células necróticas liberam substâncias citotóxicas causando danos teciduais as células adjacentes, que além de gerar um ambiente ótimo para o crescimento das micobactérias, pode ocasionar o rompimento do granuloma favorecendo a disseminação dos bacilos. A atividade citotóxica do TNF- α se dá principalmente pelo aumento excessivo de espécies reativas de oxigênio (ROS), que em concentrações muito alta causam danos teciduais (MOOTOO *et al.*, 2009).

Recentemente tem sido descritos os prováveis mecanismos de regulação cruzada entre IFNs da classe I e o TNF- α . Três hipóteses tem sido testadas: a primeira e mais disseminada considera o fato de que as duas citocinas tem efeitos contrabalanceados no controle da resposta imune e que um desequilíbrio de uma ou outra leva a um efeito negativo na proteção frente a infecções. A segunda hipótese

considera o fato de que, em estado de homeostase, ambas as citocinas influenciam diretamente nos níveis de cada uma, mas em situações patológicas este equilíbrio é perdido. Por último, supõe-se que os IFNs da classe I tenham um papel fundamental na iniciação da autoimunidade, enquanto que o TNF- α seja mais importante na manutenção da fase inflamatória secundária (CANTAERT *et al.*, 2010).

Em doenças infecciosas e autoimunes o TNF- α parece exercer um efeito supressor na síntese de IFNs da classe I via inibição da geração de DCs, as principais produtoras desta classe de IFNs (CANTAERT *et al.*, 2010; PALUCKA *et al.*, 2005).

Contraditoriamente, Reis e colaboradores já em 1989 descreveram um possível efeito sinérgico entre os IFNs da classe I, especialmente o do tipo beta, com o TNF- α na resposta antiviral, atuando na inibição da replicação. Neste estudo foi verificado um aumento na expressão de mRNA do IFNB após estimulação com TNF- α .

Em outro estudo realizado em DC infectadas com o vírus Influenza A e Sendai, foram observados aumento nas expressões de TNF- α , IFNB, ILNFL e MyD88 após tratamento com o IFNA (OSTERLUND *et al.*, 2005).

Em contrapartida, em um outro estudo foi observado o efeito inverso em culturas suplementadas com IFNs da classe I, com supressão da síntese de TNF- α principalmente pela ligação de proteínas específicas nos mRNA que codificam para o TNF- α , impedindo a sua tradução (SAUER *et al.*, 2006).

Embora existam fortes evidências de uma provável interação entre IFNs da classe I e o TNF- α , os efeitos sinérgicos ou antagônicos entre essas duas citocinas ainda não foram completamente esclarecidos, tão pouco os mecanismos moleculares envolvidos neste processo. É possível que a morte prematura dos

macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471 tenha sido causada por um efeito aditivo na ação destas duas classes de citocinas, onde os IFNs da classe I, especialmente os IFNA e IFNB, tenham estimulado um aumento na expressão de TNF- α .

Os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos nesse estímulo podem estar relacionados a um efeito compensatório do próprio macrófago para contrabalancear os altos níveis de INFA e IFNB ou ainda um efeito sinérgico direto para combater a infecção pela *M. tuberculosis*.

De qualquer maneira, o aumento exacerbado de TNF- α , observado principalmente nas amostras de macrófagos infectadas com a cepa hipervirulenta W-Beijing 1471, pode ter iniciado a cascata metabólica de morte celular, neste caso, por necrose. Park e colaboradores (2006) observaram que isolados clínicos virulentos da *M. tuberculosis* induzem preferencialmente a morte de macrófagos por necrose, associada a altos índices de multiplicação e disseminação do bacilo.

7.4.5. Necrose programada versus *M. tuberculosis*

Para comprovar a morte dos macrófagos por necrose, associada ainda a produção de IFNs da classe I, foi realizado um estudo das principais rotas metabólicas envolvidas neste processo e suas moléculas assessórias ativadas durante a infecção pela cepa W-Beijing 1471, no decorrer da infecção e principalmente no tempo específico de 96 h (**tabela 13, pág. 84**).

Foi observado um aumento nas expressões gênicas de receptores e proteínas induzíveis por TNF- α (TNFR1), IFNs da classe I, dentre outras moléculas que participam na cascata metabólica de indução (RIPK1, RIPK3, MLKL, PGAM5) e

inibição/proteção da morte celular por necrose programada ou não (**tabela 14, pág. 85**).

A ativação da via TNF-RIPK1-RIPK3 induz a morte programada por necrose (necroptose) e embora esteja relacionada principalmente a infecções virais, estudos tem relatado este tipo de morte celular em sepses e mais recentemente em infecções pela *M. tuberculosis* patogênica favorecendo a multiplicação extracelular do bacilo e disseminação (ROCA & RAMAKRISHNAN, 2013).

A necroptose geralmente é iniciada via receptor TNFR1 que induz a ativação das quinases RIPK1 e RIPK3. Ambas foram um complexo pronecrótico estável RIPK1-RIPK3, que controla a produção de ROS mitocondrial além de induzirem a ativação da transcrição de genes via NF- κ B (CHO *et al.*, 2009).

Interessantemente, Robinson e colaboradores (2012) observaram indução de necroptose em macrófagos infectados com *Salmonella entérica* serovar Typhimurium, via RPIK1-RIPK3, induzida por IFNs da classe I. Neste estudo foi observado uma provável interação entre IFNAR-RIPK1 levando a efeitos similares causados pela ativação via TNFR1-RIPK1, indicando uma ligação direta entre os IFNs da classe I e produção de ROS e NF- κ B, que induzem por *feedback* positivo a produção de TNF- α .

A produção de ROS mitocondrial está associada a fosforilação de componentes do poro de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial (mPTP) que são substratos de quinases RIPK1 e RIPK3, dentre outras. Além disso é possível que RIPK3 aumente a produção de ROS via ativação da NADPH oxidase NOX-1, que também pode ser ativada via TNFR1 (CHO *et al.*, 2009).

É possível que a cepa W-Beijing 1471 tenha induzido a produção de ROS mitocondrial via ativação de TNF-RIPK1-RIPK3, causando morte programada por

necrose. Aditivamente é possível que a indução de TNF-RIPK1-RIPK3 tenha ocorrido pela ação dos IFNs da classe I.

Como esperado, houve também um aumento nas expressões dos inibidores SOD2 e SOCS3 em resposta, provavelmente, aos níveis de ROS, induzidos pelo aumento exacerbado de TNF- α , principalmente no tempo de 96 h de infecção.

A família das superóxido dismutases (SOD) é representada por agentes antioxidantes enzimáticos citoplasmáticos (SOD1), mitocondriais (SOD2 ou MnSOD) e extracelulares (SOD3). Estes são responsáveis em converter os ROS em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, impedindo a ação citotóxica dessas moléculas (HURT *et al.*, 2007).

As proteínas SOCS são supressoras/atenuadoras da sinalização de citocinas e são responsáveis pela regulação da intensidade e duração dos sinais induzidos por estas. O aumento na expressão da SOCS está diretamente relacionado com o aumento nas expressões de IFN- γ , IL1B, IL6 e fatores de crescimento. Sua ação inibitória se dá principalmente pela ligação aos receptores das citocinas, moléculas sinalizadores e a proteína JAK. Aditivamente o aumento de SOCS3 parece estar relacionado com a redução na produção de ROS mitocondrial (AKIFUSA *et al.*, 2010).

Ainda, as ROS em altas concentrações celulares além de causarem os efeitos citotóxicos, podem atuar como potentes ativadores da transdução de sinal via NF- κ B e de fatores de transcrição via aumento da fosforilação de JAK/STAT e/ou JAK-TYK2/STAT (SIMON *et al.*, 1998).

O fator de transcrição NF- κ B é um importante mediador da resposta inflamatória frente a infecções por patógenos, além de coordenar as respostas imunes inata e adaptativa. Após sua ativação pela via clássica, ocorre indução na

expressão de genes que codificam para citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL1 β , IL6, GM-CSF), quimiocinas (IL8, MIP1 α , MCP1), enzimas (iNOS, COX2, PLA2) e moléculas de adesão (VCAM1, ICAM1, E-Selectina). Além disso, a ativação do NF- κ B pode ser amplificada pelo TNF- α e IL1 β (GOSH & KARIN, 2002 *apud* BONIZZI & KARIN, 2004).

Na TB, a estabilização do granuloma e controle do crescimento da bactéria é realizado principalmente via TNF- α /NF- κ B. Porém, uma superatividade de NF- κ B está associada a uma ativação descontrolada de macrófagos e excessiva inflamação, podendo causar danos teciduais (FALLAHI-SICHANI *et al.*, 2012).

Nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471, foi observado um aumento na expressão de NF- κ B em todos os tempos de infecção (**tabela 15, pág.87**), além do aumento nas expressões de IL1 β , IL8, ICAM1 a partir de 96 h (**tabela 15, pág.87**), TNF- α a partir de 72 h (**gráfico 09, pág.91**), IL6, MCP1, MIP1A e MIP1B em praticamente todos os tempos avaliados (**tabela 16, pág.92**) e de JAK, TYK2 e STAT.

É possível que as altas concentrações de ROS induzidos via TNF-RIPK1-RIPK3, tenham ainda amplificado a ativação dos IFNs da classe I via JAK/STAT e transdução de sinal via NF- κ B no decorrer infecção, além do efeito citotóxico visto principalmente no tempo de 96 h de infecção pela cepa W-Beijing 1471, onde houve maior expressão dos inibidores SOD2 e SOCS3.

7.4.6. Ativação dos IFNs da classe I nos estágios iniciais da infecção – provável rota metabólica

Baseado nos estudos das rotas metabólicas de ativação e produção dos IFNs da classe I, foi realizada uma última análise para tentar explicar metabolicamente a ativação inicial precoce dessa classe de IFNs induzida pela *M. tuberculosis*.

Os IFNs da classe I são reconhecidamente envolvidos em respostas antivirais, responsáveis pelo controle da replicação viral por meio da inibição da proliferação celular. A ativação inicial desta classe de IFNs ocorre via receptores TLR, especialmente os TLR3 e TLR4, que reconhecem dsRNA e DNA virais. Após o reconhecimento, ambos são capazes de ativar uma proteína citoplasmática TRIF que induz a transcrição de genes que codificam para a síntese de IFNs da classe I. Os receptores TLR4, localizados na membrana plasmática, são também capazes de reconhecer LPS além de outros ligantes bacterianos e por este motivo já foram relacionados com a ativação de IFNs da classe I, por bactérias (MONROE *et al.*, 2010).

Aditivamente algumas bactérias podem induzir a síntese de IFNs da classe I via ativação de sinais citoplasmáticos de reconhecimento de sequências de DNA e dsRNA. No citosol das células hospedeira é possível encontrar ligantes, tais como RIG-I, MDA5, LPG2, ZBP1, STING que interagem com fragmentos de RNA e DNA iniciando a cascata de ativação de IFNs da classe I. Inicialmente este mecanismo foi descrito no reconhecimento de material nucleico viral, mas tem sido descrito em bactérias também (MONROE *et al.*, 2010).

Pandey e colaboradores (2009) descreveram a ativação de IFNs da classe I via NOD2, outro sinalizador citoplasmático, e indução da transcrição de IRF5 em

infecções pela *M. tuberculosis*, provavelmente pela ação de fragmentos de ácidos nucleicos ou de parede celular livres no citosol.

Nas amostras de macrófagos infectadas pelas cepas da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 e H37Rv não foram observadas diferenças de expressão das moléculas descritas por Monroe e colaboradores (2010) e Pandey e colaboradores (2009) que pudessem comprovar a ativação de IFNs da classe I por estas vias.

Recentemente Bai e colaboradores (2014) demonstraram a participação de receptores TLR3 em infecções pela *M. tuberculosis*. Foi comprovada uma ativação dessa classe de receptores causada pela *M. tuberculosis* que induziu a produção de IL10, via PI3K/AKT e consequente inibição da resposta imune Th1.

Os receptores TLR3 estão fortemente associados com a resposta antiviral de infecções respiratórias causadas principalmente pelo Influenza A. Estes são capazes de reconhecer dsRNA e ativar a transcrição de NF- κ B e IRF3 via TRIF. Diferentes regiões de TRIF se ligam as quinases TBK1 e IKK via NAP1 ativando a fosforilação de IRF3 e para início da transcrição gênica de IFNs da classe I. Aditivamente TLR3 induz a fosforilação da tirosina 759 que leva ao recrutamento de PI3K e ativação da quinase Akt, requerida para a completa fosforilação de IRF3 no núcleo e completa transcrição de IFNs da classe I (**figura 17, abaixo pág.121**) (VERCAMMEN *et al.*, 2008).

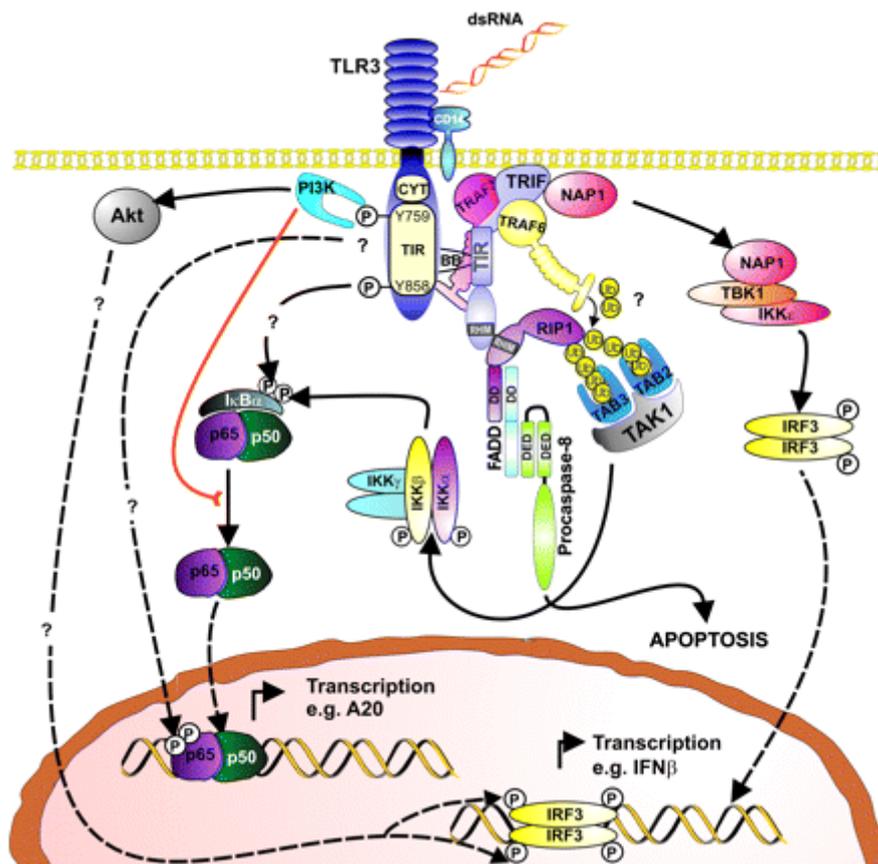


Figura 17. Cascata metabólica de ativação de receptores TLR3, via dsRNAs. Figura retirada de Vercammen e colaboradores (2008).

Foi observado um aumento nas expressões de TLR3, Akt, IRF3 e IKK nos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing quando comparados ao controle e as amostras infectadas com a cepa padrão H37Rv, em todos os tempos avaliados.

Embora muito pouco descrito até o presente momento, é possível que a indução da síntese dos IFNs da classe I tenha inicialmente ocorrido por ativação de receptores TLR3 por meio de sequências dsRNA da *M. tuberculosis*. Obregón-Henao e colaboradores (2012) pela primeira vez descreveram a participação direta de dsRNA estáveis da *M. tuberculosis* na ativação da apoptose dependente de caspase-8 via TLR8, comprovando a presença dessas estruturas na modelação da resposta imune celular. Neste mesmo estudo, foi observado também um aumento na

expressão de TNF- α que ao se ligar ao TNFAR1 ativou a cascata de metabolização da caspase-8 e indução da apoptose.

No ano seguinte, Kawashima e colaboradores (2013) observaram uma ativação de TLR3 e aumento na expressão de IFNs da classe I em DCs, via dsRNA de bactérias intestinais comensais, corroborando a presença dessas estruturas na ativação da resposta via IFNs da classe I por bactérias.

7.4.7. TLR3 versus IFNs da classe I versus TNF- α versus necroptose versus *M. tuberculosis* – provável relação

Após as análises de todas as moléculas envolvidas na morte precoce dos macrófagos infectados pela W-Beijing 1471 foi possível associar diretamente a produção de IFNs da classe I e aumento de TNF- α , via aumento na produção de ROS mitocondrial e NF- κ B.

Nos estágios iniciais e no decorrer da infecção dos macrófagos pela cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 foi observado um aumento na expressão de TLR3, que por sua vez induziu a expressão de IFNs da classe I, via IRF3. Associado a isto foi observado um aumento de IL10 principalmente em 96 h de infecção, em detrimento da expressão do seu contrabalanceador IL12 nos tempos de 24 a 72 h, levando a uma provável inibição da resposta via Th1. Ainda, a ativação de IFNs da classe I levou a inibição da proliferação celular via MAPK.

Aditivamente, o aumento de IFNs da classe I induziu a produção de ROS mitocondriais via ativação de TNF-RIPK1-RIPK3, que além de amplificar a sinalização dessa classe de IFNs pelo aumento da fosforilação de JAK/STAT, mais

tarde levou a morte prematura dos macrófagos por necrose programada, a necroptose.

As ROS juntamente ao TNF- α , induziram provavelmente uma superativação do fator de transcrição NF-kB levando a um aumento na expressão principalmente de TNF- α , que por sua vez, amplificou a sinalização via NF-kB resultando em um aumento ainda maior na produção de TNF- α e ROS mitocondriais, causando sérios danos celulares. Por um outro lado, a indução na produção de TNF- α também ocorreu devido a ativação de receptores TLR2 no início da infecção.

Em conjunto, todos esses fatores levaram ao desfecho observado nos macrófagos infectados pela cepa hipervirulenta da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 que morreram precocemente após 96 h de infecção.

Embora não tenham sido realizados experimentos para avaliarem a produção das ROS nas amostras de macrófagos infectadas com a *M. tuberculosis*, de acordo com a avaliação do transcriptoma total foram observados aumentos nas expressões de moléculas fortemente associadas a produção desses radicais (TNF- α , SOD2, SOCS3) ao longo da infecção e principalmente no tempo de 96 h nas amostras infectadas com a cepa W-Beijing 1471.

A ativação de receptores TLR3 por dsRNA da *M. tuberculosis* ainda não foi comprovada, embora tenha sido mostrada a participação dessa classe de receptores em infecções pela *M. tuberculosis*, indicando fortemente a participação dos dsRNA na modulação da resposta imune celular, o que poderia explicar a ativação dos IFNs da classe I desde os estágios iniciais da infecção.

O envolvimento dos IFNs da classe I na morte precoce de macrófagos e camundongos infectados pela W-Beijing já tem sido estudado desde 2004 com

Manca e colaboradores, porém a associação dessa classe de IFNs com a morte programada por necrose ainda não foi elucidada.

Foi observado um aumento de expressão de moléculas ativadoras (IFNs classe I/TNF/RIPK1/RIPK3) da necroptose nas amostras de macrófagos infectadas com a cepa W-Beijing 1471 quando comparada a aquelas infectadas pela cepa padrão H37Rv, indicando ativação da morte celular por esta via. Resultados semelhantes foram observados nos estudos Robinson e colaboradores em 2012 que comprovaram a ativação da necroptose em macrófagos infectados com a *Salmonella enterica* via IFNs da classe I/TNF/RIPK1/RIPK3.

Baseado nas rotas metabólicas já descritas/elucidadas e validadas na literatura e nos resultados obtidos neste estudo, foi realizada a construção/junção das principais vias relacionadas com a ativação de TLR3, IFNs da classe I, TNF e o desfecho observado nos macrófagos infectados com a cepa da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471, com as prováveis interconexões entre as vias, que estão representadas pelas linhas contínuas sem pontas em formato de flecha (**figura 18, abaixo pág.125**).

A rota sugerida na **figura 18 (pág.125)** representa um resumo de todos os resultados discutidos neste trabalho. A coloração em rosa das moléculas significa um aumento na expressão gênica e/ou proteica, comprovada nos experimentos de transcriptoma, PCR array e dosagem proteica por Luminex. As moléculas em branco não tiveram expressão diferencial comprovada ou não foram analisadas até o presente momento.

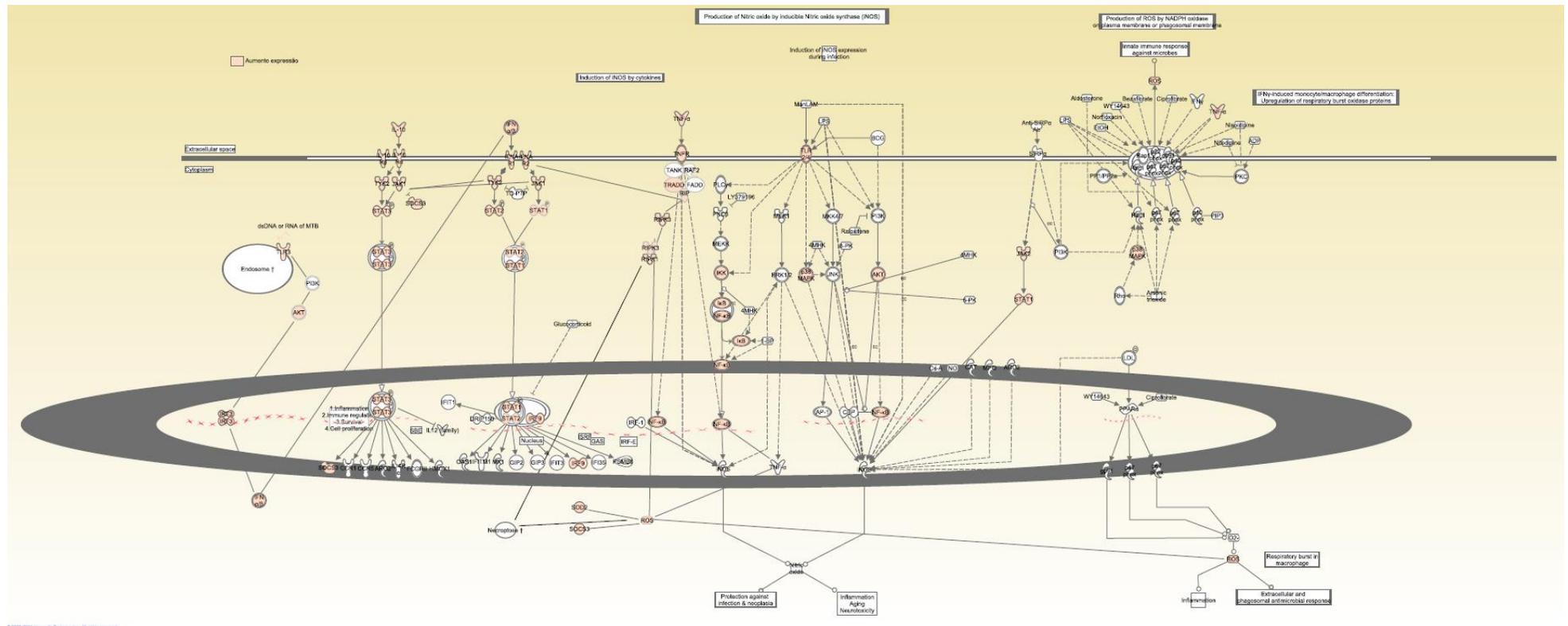


Figura 18. Descrição das rotas metabólicas e suas moléculas assessórias ativadas durante o processo de infecção de macrófagos pela *M. tuberculosis* W-Beijing 1471. As interconexões entre as vias foram sugeridas de acordo com os dados de expressões obtidos no ultra sequenciamento e relação com dados presentes na literatura. As moléculas com coloração em rosa tiveram sua expressão aumentada quando comparadas ao controle e as amostras infectadas pela cepa padrão H37Rv.

8. IMPACTO DO ESTUDO

Em 1993 a WHO declarou a TB um problema de saúde pública global e desde então o surgimento de cepas MDR, XDR e hipervirulentas da *M. tuberculosis* devido a pressão ambiental principalmente pela antibioticoterapia, tem trazido à tona umas das principais preocupações das agências/organizações/instituições de fomento à saúde que é a descoberta de novos alvos terapêuticos para tratamento da TB.

Desde 1960/70 com a introdução da RMP, EMB e reintrodução da PZA no esquema de tratamento da TB, poucos medicamentos novos ou classe de medicamentos com segurança e eficácia comprovada após estudos clínicos, tem sido apresentados para o tratamento de cepas MDR ou XDR da *M. tuberculosis* (ZUMLA *et al.*, 2014).

Em 2013 foi aprovado o uso de bedaquilina e delamanida, porém já foram observados casos de resistência a estas drogas em infecções por *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp*, indicando que será apenas uma questão de tempo para que apareçam cepas da *M. tuberculosis* resistentes também (MAEURER *et al.*, 2014).

Ainda mais preocupante tem sido a emergência e disseminação de cepas XDR e alguns genótipos hipervirulentos W-Beijing, com alta letalidade e capazes de matar pacientes rapidamente, chegando a uma sobrevivência de apenas 16 dias em imunossuprimidos (MATTELLI *et al.*, 2014; PARWATI *et al.*, 2010).

Isolados da *M. tuberculosis* com diferentes perfis de virulência associados ou não a uma multirresistência terapêutica parecem desencadear distintos mecanismos moleculares relacionados com a infecção, adaptação, persistência e letalidade em macrófagos. Como exemplo, as cepas W-Beijing estão associadas a mecanismos imunológicos não-protectivos levando a uma multiplicação descontrolada do bacilo,

disseminação e morte rápida, contrariamente ao genótipo Canetti (LÓPEZ *et al.*, 2003).

Fica clara a preocupação em entender os mecanismos moleculares envolvidos na interação bacilo-macrófago, associados aos diferentes perfis de virulência das cepas da *M. tuberculosis*, na tentativa de fornecer novas perspectivas terapêuticas adjuvantes aos tratamentos existentes para a TB. Dentro desse contexto emerge o impacto do presente estudo, que apresentou novos *insights* a respeito das rotas metabólicas imunológicas e moléculas assessórias envolvidas na infecção de macrófagos por uma cepa hipervirulenta W-Beijing, coordenadas provavelmente por IFNs da classe I.

Estudos já demonstram a eficácia de terapias adjuvantes aos medicamentos anti-TB comumente utilizados, baseadas no uso de imunomoduladores, citocinas e seus inibidores. Sabe-se ainda que a eficácia destas terapias são especialmente observadas em casos onde a droga escolhida para o tratamento primário da TB tem algum efeito anti-inflamatório, como por exemplo, os macrolídeos (ZUMLA *et al.*, 2014; ZUMLA & MAEURER, 2012; TOBIN *et al.*, 2011).

Obviamente que outros estudos ainda são necessários para melhor compreender as diferenças nos mecanismos envolvidos na resposta imunológica frente a infecções pela *M. tuberculosis* com distintos perfis de virulência, como por exemplo, a determinação do perfil de expressão gênica global de microRNAs (miRNA) que comprovadamente controlam/regulam processos biológicos, como a proliferação e diferenciação celular, respostas imunológicas inatas e adaptativas, bem como mecanismos de morte celular programada (LIU *et al.*, 2014).

9. CONCLUSÕES

A cepa hipervirulenta da *M. tuberculosis* W-Beijing 1471 apresentou reduzida persistência intramacrofágica e induziu morte precoce em macrófagos, provavelmente por necroptose.

A ativação da morte programada por necrose ocorreu via IFNs da classe I/TNF- α /RIPK1/RIPK3 e ROS.

A síntese precoce dos IFNs da classe I nos macrófagos infectados com a cepa W-Beijing 1471, provavelmente ocorreu pela ativação de TLR3 via dsRNA da própria micobactéria.

10. PERSPECTIVAS FUTURAS

Muitos eventos observados no decorrer deste estudo não puderam ser claramente elucidados pela falta de dados que corroborassem os resultados, deixando lacunas relativas principalmente sobre a ativação inicial dos macrófagos após infecção pela cepa W-Beijing com consequente produção precoce de IFNs da classe I que levaram ao desfecho final observado. Acredita-se, pela expressão gênica global, que os receptores TLR3 tenham apresentado um papel fundamental na inicialização da resposta coordenada por IFNs da classe I, porém sabe-se que estes receptores são ativados por dsRNAs que ainda são pouco descritos em *M. tuberculosis* e tão pouco foram isolados neste estudo, comprovando a teoria.

Somado a isso sabe-se da fundamental participação dos miRNA reguladores, no controle de muitos processos biológicos imunológicos, modulando a expressão proteica principalmente pela inibição da tradução dos mRNAs, resultando em uma

relação incoerente entre mRNA/proteína. Mais de 1/3 da síntese de proteínas humanas é controlada pelos miRNAs (DAS *et al.*, 2013).

Face a isto serão realizadas ainda novas tentativas de isolamento dos RNA totais da *M. tuberculosis* após infecção em macrófagos para tentar verificar não somente a expressão gênica global da bactéria, mas tão importante quanto, a participação direta de RNAs micobacterianos na regulação da expressão gênica do macrófago.

Por um outro lado, já foram isolados os miRNA totais dos macrófagos infectados pelas cepas da *M. tuberculosis* H37Rv e W-Beijing 1471, nas mesmas condições do presente trabalho. Estes serão sequenciados e avaliados dentro do contexto da infecção para em seguida, somar aos dados fornecidos pelo transcriptoma.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta pesquisa foi realizada em conjunto com o professor Chinnaswamy Jagannath da Universidade do Texas, EUA, que tem trabalhado com linhagens THP1 diferenciadas em macrófagos e células gigantes multinucleadas, pela exposição a VD e VA e infectadas com micobactérias.

Todas as análises por bioinformática dos dados obtidos após sequenciamento foram inicialmente realizadas no Instituto Max Planck (*Core Facility Genome/Microarray* – Berlim/Alemanha) em um estágio de curta duração, no mês de abril do ano de 2013, a convite do Prof. Dr. Mollenkopf e do Prof. Dr. Stefan H. E. Kaufmann. O *Core Facility* é um importante centro de pesquisa dedicado ao processamento e análises de dados de genoma e transcriptoma. O período do

estágio neste centro de pesquisa visou aprofundar o conhecimento de ferramentas para análise estatística e bioinformática com a finalidade de aplicá-lo na análise dos dados obtidos em plataforma de sequenciamento de nova geração HiScan Illumina.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANES, H. V., C. WINATA, L. F. MOEN, O. ÅSTRUP, S. MATHAVAN, P. COLLAS, T. R. ROGNES AND P. ALESTRAM. "Normalization of RNA-Sequencing Data from Samples with Varying mRNA Levels." **PLoS ONE** 9(2): e89158, 2014.

ADAMS, K., TAKAKI, K., CONNOLLY, L., WIEDENHOFT, H., WINGLEE, K., HUMBERT, O., EDELSTEIN, P., COSMA, C., & RAMAKRISHNAN, L. Drug Tolerance in Replicating Mycobacteria Mediated by a Macrophage-Induced Efflux Mechanism, **Cell**, April, vol.1, p. 145-159, 2011.

AKIFUSA, S., N. KAMIO, Y. SHIMAZAKI, N. YAMAGUCHI, K. NONAKA AND Y. YAMASHITA. "Involvement of the JAK-STAT pathway and SOCS3 in the regulation of adiponectin-generated reactive oxygen species in murine macrophage RAW 264 cells." **Journal of Cellular Biochemistry** 111(3): 597-606, 2010.

ANÔNIMO. Beijing_W genotype Mycobacterium tuberculosis and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**. 12(5). 2006.

AWUA AK, DOE ED, GYAMFI OK. Evaluation of cost-effective total nucleic acids extraction protocols for cultured *Mycobacterium tuberculosis*; a comparison by PCR amplification of genes associated with drug resistance. **BMC Res Notes**. Feb 26;3:48, 2010.

BAI, W., H. LIU, Q. JI, Y. ZHOU, L. LIANG, R. ZHENG, J. CHEN, Z. LIU, H. YANG, P. ZHANG, S. H. E. KAUFMANN AND B. GE. "TLR3 regulates mycobacterial RNA-induced IL-10 production through the PI3K/AKT signaling pathway." **Cellular Signalling** 26(5): 942-950, 2014.

BARRERA, L. Acerca de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos, un enfoque microbiológico. **Infect. Microbiol. Clin**, Buenos Aires, v.6, p. 192-98, 1994.

BELKAID Y, TARBELL K. Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions. **Annu Rev Immunol**. 27:551-89. 2009.

BERMUDEZ, L.E; DANELISHVILI, L; EARLY, J. Mycobacteria and Macrophage Apoptosis: Complex Struggle for Survival. **Microbe**, 1(8). 2006.

BONIZZI, G. AND M. KARIN. "The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity." **Trends in Immunology** 25(6): 280-288, 2004.

BRIGHENTI, S. AND J. ANDERSSON. "Local Immune Responses in Human Tuberculosis: Learning From the Site of Infection." **The Journal of Infectious Diseases** 205(suppl 2): S316-S324, 2012.

BULLARD, J., E. PURDOM, K. HANSEN AND S. DUDOIT. "Evaluation of statistical methods for normalization and differential expression in mRNA-Seq experiments." **BMC Bioinformatics** 11(1): 94, 2010.

BYRNES, A. A., X. MA, P. CUOMO, K. PARK, L. WAHL, S. F. WOLF, H. ZHOU, G. TRINCHIERI AND C. L. KARP. "Type I interferons and IL-12: convergence and cross-regulation among mediators of cellular immunity." **European Journal of Immunology** 31(7): 2026-2034, 2001.

CANTAERT, T., D. BAETEN, P. TAK AND L. VAN BAARSEN. "Type I IFN and TNFalpha cross-regulation in immune-mediated inflammatory disease: basic concepts and clinical relevance." **Arthritis Research & Therapy** 12(5): 219, 2010.

CHACÓN-SALINAS, R., J. SERAFÍN-LÓPEZ, R. RAMOS-PAYÁN, P. MÉNDEZ-ARAGÓN, R. HERNÁNDEZ-PANDO, D. VAN SOOLINGEN, L. FLORES-ROMO, S. ESTRADA-PARRA AND I. ESTRADA-GARCÍA. "Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes." **Clinical & Experimental Immunology** 140(3): 443-449, 2005.

CHO, Y., S. CHALLA, D. MOQUIN, R. GENGA, T. D. RAY, M. GUILDFORD AND F. K.-M. CHAN. "Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation." **Cell** 137(6): 1112-1123, 2009.

CLC. Read Mapping. **White Paper**. 2012. (disponible em: <http://www.clcbio.com/wp-content/uploads/2012/10/whitepaper-on-CLC-read-mapper.pdf>)

CRUZ-KNIGHT, W. AND L. BLAKE-GUMBS. "Tuberculosis: An Overview." **Primary Care: Clinics in Office Practice** 40(3): 743-756, 2013.

DAS, K., S. SAIKOLAPPAN AND S. DHANDAYUTHAPANI. "Differential expression of miRNAs by macrophages infected with virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis*." **Tuberculosis** 93, Supplement(0): S47-S50, 2013.

DAVIS, J. M. AND L. RAMAKRISHNAN (2009). "The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection." **Cell** 136(1): 37-49, 2009.

DHEDA, K., S. K. SCHWANDER, B. ZHU, R. N. VAN ZYL-SMIT AND Y. ZHANG. "The immunology of tuberculosis: From bench to bedside." **Respirology** 15(3): 433-450, 2010.

DICHIARA JM.; CONTRERAS-MARTINEZ LM.; LIVNY J.; SMITH D.; MCDONOUGH A.; BELFORT M. Multiple small RNAs identified in *Mycobacterium bovis* BCG are

also expressed in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium smegmatis*. **Nucleic Acids Res.** 38(12): 4067-78, 2010.

DICKENSHEETS H, SHEIKH F, PARK O, GAO B, DONNELLY RP. Interferon-lambda (IFN- λ) induces signal transduction and gene expression in human hepatocytes, but not in lymphocytes or monocytes. **J Leukoc Biol.** 93(3):377-85. 2013.

DILLIES, M.-A. S., A. RAU, J. AUBERT, C. HENNEQUET-ANTIER, M. JEANMOUGIN, N. SERVANT, C. L. KEIME, G. MAROT, D. CASTEL, J. ESTELLE, G. GUERNEC, B. JAGLA, L. JOUNEAU, D. LALOË, C. LE GALL, B. SCHAFFER, S. P. LE CROM, M. L. GUEDJ AND F. JAFFRÉZIC. "A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high-throughput RNA sequencing data analysis." **Briefings in Bioinformatics** 14(6): 671-683, 2012.

DODD, D., Y.-H. MOON, K. SWAMINATHAN, R. I. MACKIE AND I. K. O. CANN. "Transcriptomic Analyses of Xylan Degradation by *Prevotella bryantii* and Insights into Energy Acquisition by Xylanolytic Bacteroidetes." **Journal of Biological Chemistry** 285(39): 30261-30273, 2010.

DUBNAU, E.; SMITH, I. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in macrophages. **Microbes and Infection**, 5. 2003.

DUSSURGET, O., G. STEWART, O. NEYROLLES, P. PESCHER, D. YOUNG AND G. MARCHAL. "Role of *Mycobacterium tuberculosis* Copper-Zinc Superoxide Dismutase." **Infection and Immunity** 69(1): 529-533, 2001.

ERNST, J. D. "The immunological life cycle of tuberculosis." **Nat Rev Immunol** 12(8): 581-591, 2012.

ESTRELLA, L.J.; KAN-SUTTON, C.; GONG, K., RAJAGOPALAN, M.; LEWIS, D.E.; HUNTER, R.L.; EISSA, N.T.; JAGANNATH, C. A novel in vitro human macrophage model to study the persistence of *Mycobacterium tuberculosis* using Vitamin D and retinoic acid activated THP1 macrophages. **Front. Microbio.** 18(2), 2011.

EWING, B. AND P. GREEN. "Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities." **Genome Research** 8(3): 186-194, 1998.

FABRI, M., S. STENGER, D.-M. SHIN, J.-M. YUK, P. T. LIU, S. REALEGENO, H.-M. LEE, S. R. KRUTZIK, M. SCHENK, P. A. SIELING, R. TELES, D. MONTOYA, S. S. IYER, H. BRUNS, D. M. LEWINSOHN, B. W. HOLLIS, M. HEWISON, J. S. ADAMS, A. STEINMEYER, U. ZÄGEL, G. CHENG, E.-K. JO, B. R. BLOOM AND R. L. MODLIN. "Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages." **Science Translational Medicine** 3(104): 104ra102-104ra102, 2011.

FALLAHI-SICHANI M1, KIRSCHNER DE, LINDERMAN JJ. NF- κ B Signaling Dynamics Play a Key Role in Infection Control in Tuberculosis. **Front Physiol.** Jun 6;3:170, 2012

FALLOW, A., P. DOMENECH AND M. B. REED. "Strains of the East Asian (W/Beijing) Lineage of *Mycobacterium tuberculosis* Are DosS/DosT-DosR Two-Component Regulatory System Natural Mutants." **Journal of Bacteriology** 192(8): 2228-2238, 2010.

GIANNOUKOS, G., D. CIULLA, K. HUANG, B. HAAS, J. IZARD, J. LEVIN, J. LIVNY, A. EARL, D. GEVERS, D. WARD, C. NUSBAUM, B. BIRREN AND A. GNIRKE. "Efficient and robust RNA-seq process for cultured bacteria and complex community transcriptomes." **Genome Biology** 13(3): r23, 2012.

GLYNN JR1, WHITELEY J, BIFANI PJ, KREMER K, VAN SOOLINGEN D. Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review. **Emerg Infect Dis.** Aug;8(8):843-9, 2002.

GOMES JE.; MCKINNEY JD. *Mycobacterium tuberculosis* persistence, latency, and drug tolerance. **Tuberculosis.** 84: 29-44, 2004.

GUTIERREZ, M. G., S. S. MASTER, S. B. SINGH, G. A. TAYLOR, M. I. COLOMBO AND V. DERETIC. "Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* Survival in Infected Macrophages." **Cell** 119(6): 753-766, 2004.

GUTTMAN, M., I. AMIT, M. GARBER, C. FRENCH, M. F. LIN, D. FELDSER, M. HUARTE, O. ZUK, B. W. CAREY, J. P. CASSADY, M. N. CABILI, R. JAENISCH, T. S. MIKKELSEN, T. JACKS, N. HACOEN, B. E. BERNSTEIN, M. KELLIS, A. REGEV, J. L. RINN AND E. S. LANDER. "Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals." **Nature** 458(7235): 223-227, 2009.

HAAS BJ.; CHIN M.; NUSBAUM C.; BIRREN BW.; LIVNY J. How deep is deep enough for RNA-Seq profiling of bacterial transcriptomes? **BMC genomics.** 13(734), 2012.

HANEKON M.; VAN DER SPUY GD.; STREICHER E.; NDABAMBI SL.; MCEVOY CRE.; KID M.; BEYERS N.; VICTOR TC.; VAN HELDEN PD.; WARREN RM. A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. **J. Clin. Microbiol.** 45(5):1483-90, 2007.

HEID, C. A., J. STEVENS, K. J. LIVAK AND P. M. WILLIAMS. "Real time quantitative PCR." **Genome Research** 6(10): 986-994, 1996.

HURT, E. M., S. B. THOMAS, B. PENG AND W. L. FARRAR. "Integrated molecular profiling of SOD2 expression in multiple myeloma." **Blood** 109(9): 3953-3962, 2007.

KAUFMANN, S. H. E., G. HUSSEY AND P.-H. LAMBERT. "New vaccines for tuberculosis." **The Lancet** 375(9731): 2110-2119, 2010.

KAWASHIMA, T., A. KOSAKA, H. YAN, Z. GUO, R. UCHIYAMA, R. FUKUI, D. KANEKO, Y. KUMAGAI, D.-J. YOU, J. CARRERAS, S. UEMATSU, MYOUNGÂ H.

JANG, O. TAKEUCHI, T. KAISHO, S. AKIRA, K. MIYAKE, H. TSUTSUI, T. SAITO, I. NISHIMURA AND NORIKO M. TSUJI. "Double-Stranded RNA of Intestinal Commensal but Not Pathogenic Bacteria Triggers Production of Protective Interferon- β ." **Immunity** 38(6): 1187-1197, 2013.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, KUCHROO VK. IL-17 and Th17 **Cells. Annu Rev Immunol.** 27:485-517, 2009.

KOUL, A., E. ARNOULT, N. LOUNIS, J. GUILLEMONT AND K. ANDRIES. "The challenge of new drug discovery for tuberculosis." **Nature** 469(7331): 483-490, 2011.

KOUL, A., T. HERGET, B. KLEBL AND A. ULLRICH. "Interplay between mycobacteria and host signalling pathways." **Nat Rev Micro** 2(3): 189-202, 2004

KUO, H.-C., T.-Y. WANG, P.-P. CHEN, Y.-M. CHEN, H.-C. CHUANG AND T.-Y. CHEN. "Real-Time Quantitative PCR Assay for Monitoring of Nervous Necrosis Virus Infection in Grouper Aquaculture." **Journal of Clinical Microbiology** 49(3): 1090-1096, 2011.

LAMICHHANE G. Novel targets in *M. tuberculosis*: search for new drugs. **Trends Mol Med.**16(1), 25-33, 2011.

LEDERGERBER, C. AND C. DESSIMOZ. "Base-calling for next-generation sequencing platforms." **Briefings in Bioinformatics.** 12 (5), 2011

LI, B., V. RUOTTI, R. M. STEWART, J. A. THOMSON AND C. N. DEWEY. "RNA-Seq gene expression estimation with read mapping uncertainty." **Bioinformatics** 26(4): 493-500, 2010.

LIN, P. L., H. L. PLESSNER, N. N. VOITENOK AND J. L. FLYNN. "Tumor Necrosis Factor and Tuberculosis." **J Invest Derm Symp P** 12(1): 22-25, 2007.

LIU, Z., G. ZHOU, X. DENG, Q. YU, Y. HU, H. SUN, Z. WANG, H. CHEN, C. JIA AND D. WANG. "Analysis of miRNA expression profiling in human macrophages responding to *Mycobacterium* infection: Induction of the immune regulator miR-146a." **Journal of Infection**, 2014.

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.

LÓPEZ, B., D. AGUILAR, H. OROZCO, M. BURGER, C. ESPITIA, V. RITACCO, L. BARRERA, K. KREMER, R. HERNANDEZ-PANDO, K. HUYGEN AND D. VAN SOOLINGEN. "A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes." **Clinical & Experimental Immunology** 133(1): 30-37, 2003.

MANCA, C., M. B. REED, S. FREEMAN, B. MATHEMA, B. KREISWIRTH, C. E. BARRY AND G. KAPLAN. "Differential Monocyte Activation Underlies Strain-Specific

Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis." **Infection and Immunity** 72(9): 5511-5514, 2004.

MANCA C, TSENOVA L, FREEMAN S, BARCZAK AK, TOVEY M, MURRAY PJ, BARRY C, KAPLAN G. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. **J Interferon Cytokine Res.** Nov;25(11):694-701, 2005.

MANCA, C., S. PAUL, C. E. BARRY, V. H. FREEDMAN AND G. KAPLAN. "Mycobacterium tuberculosis Catalase and Peroxidase Activities and Resistance to Oxidative Killing in Human Monocytes In Vitro." **Infection and Immunity** 67(1): 74-79, 1999.

MARINO, S. AND D. E. KIRSCHNER. "The human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* in lung and lymph node." **Journal of Theoretical Biology** 227(4): 463-486, 2004.

MATTEELLI A., ROGGI A., CARVALHO, ACC. Extensively drug-resistant tuberculosis: epidemiology and management. **Clin Epidemiol.** 2014; 6: 111–118, 2014.

MATTICK, J. S. AND I. V. MAKUNIN. "Non-coding RNA." **Human Molecular Genetics** 15(suppl 1): R17-R29, 2006.

MEENA LS.; RAJNI. Survival mechanisms of pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **FEBS.** 277, p.2416-27, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. O controle da tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. **Boletim epidemiológico Brasil.** 44(2), 2014.

MONROE, K. M., S. M. MCWHIRTER AND R. E. VANCE (2010). "Induction of type I interferons by bacteria." **Cellular Microbiology** 12(7): 881-890, 2010.

MOOTOO A, STYLIANOU E, ARIAS MA, RELJIC R. TNF-alpha in tuberculosis: a cytokine with a split personality. **Inflamm Allergy Drug Targets.** Mar;8(1):53-62, 2009.

MOSMANN, T. R. AND S. SAD. "The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more." **Immunology Today** 17(3): 138-146, 1996.

NAU, G. J., J. F. L. RICHMOND, A. SCHLESINGER, E. G. JENNINGS, E. S. LANDER AND R. A. YOUNG. "Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens." **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(3): 1503-1508, 2002

NICOL, M. P. AND R. J. WILKINSON. "The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*." **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 102(10): 955-965, 2008.

NIELSEN, R., J. S. PAUL, A. ALBRECHTSEN AND Y. S. SONG. "Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data." **Nat Rev Genet** 12(6): 443-451, 2011.

O'GARRA A, REDFORD PS, MCNAB FW, BLOOM CI, WILKINSON RJ, BERRY MP. The immune response in tuberculosis. **Annu Rev Immunol.** 31:475-527, 2013.

OBREGON-HENAO, A., M. DUQUE-CORREA, M. ROJAS, L. F. GARCIA, P. J. BRENNAN, B. L. ORTIZ AND J. T. BELISLE. "Stable Extracellular RNA Fragments of *Mycobacterium tuberculosis* Induce Early Apoptosis in Human Monocytes via a Caspase-8 Dependent Mechanism." **PLoS ONE** 7(1): e29970, 2012.

OSTERLUND, P., V. VECKMAN, J. SIRÉN, K. M. KLUCHER, J. HISCOTT, S. MATIKAINEN AND I. JULKUNEN. "Gene Expression and Antiviral Activity of Alpha/Beta Interferons and Interleukin-29 in Virus-Infected Human Myeloid Dendritic Cells." **Journal of Virology** 79(15): 9608-9617, 2005.

PALUCKA, A. K., J.-P. BLANCK, L. BENNETT, V. PASCUAL AND J. BANCHEREAU. "Cross-regulation of TNF and IFN- γ in autoimmune diseases." **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 102(9): 3372-3377, 2005.

PANDEY, A. K., Y. YANG, Z. JIANG, S. M. FORTUNE, F. COULOMBE, M. A. BEHR, K. A. FITZGERALD, C. M. SASSETTI AND M. A. KELLIHER. "NOD2, RIP2 and IRF5 Play a Critical Role in the Type I Interferon Response to *Mycobacterium tuberculosis*." **PLoS Pathog** 5(7): e1000500, 2009.

PARK, J. S., M. H. TAMAYO, M. GONZALEZ-JUARRERO, I. M. ORME AND D. J. ORDWAY. "Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages." **Journal of Leukocyte Biology** 79(1): 80-86, 2006.

PARWATI, I., R. VAN CREVEL AND D. VAN SOOLINGEN. "Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains." **The Lancet Infectious Diseases** 10(2): 103-111. 2010

PAVAN, F.R.; SATO, D.N.; HIGUCHI, C.T.; SANTOS, A.C.B.; VILEGAS, W.; LEITE, C.Q.F. In vitro anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of some Brazilian "Cerrado" plants. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, p.204-206, 2009.

PEANO, C., A. PIETRELLI, C. CONSOLANDI, E. ROSSI, L. PETITI, L. TAGLIABUE, G. DE BELLIS AND P. LANDINI. "An efficient rRNA removal method for RNA sequencing in GC-rich bacteria." **Microbial Informatics and Experimentation** 3(1): 1, 2013

PINTO, W.P. Tuberculose e resistência a drogas em pacientes atendidos em um centro de referência para síndrome da imunodeficiência adquirida em São Paulo-Brasil. **Tese de doutorado**. Curso de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1998

PLATANIAS, L. C. "Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling." **Nat Rev Immunol** 5(5): 375-386, 2005.

RAMAKRISHNAN, L. "Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis." **Nat Rev Immunol** 12(5): 352-366, 2012.

RAPAPORT, F., R. KHANIN, Y. LIANG, M. PIRUN, A. KREK, P. ZUMBO, C. MASON, N. SOCCI AND D. BETEL. "Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data." **Genome Biology** 14(9): R95.
RAWLINGS, J. S., K. M. ROSLER AND D. A. HARRISON (2004). "The JAK/STAT signaling pathway." **Journal of Cell Science** 117(8): 1281-1283, 2013.

REIS, L. F., T. HO LEE AND J. VILCEK. "Tumor necrosis factor acts synergistically with autocrine interferon-beta and increases interferon-beta mRNA levels in human fibroblasts." **Journal of Biological Chemistry** 264(28): 16351-16354. 1989.

SHERMAN DR, MDLULI K, HICKEY MJ, ARAIN TM, MORRIS SL, BARRY CE, STOVER CK. Compensatory ahpC gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Science**. Jun 14;272(5268):1641-3. 1996.

ROBINSON, N., S. MCCOMB, R. MULLIGAN, R. DUDANI, L. KRISHNAN AND S. SAD. "Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*." **Nat Immunol** 13(10): 954-962. 2012.

ROCA, FRANCISCOÂ J. AND L. RAMAKRISHNAN. "TNF Dually Mediates Resistance and Susceptibility to Mycobacteria via Mitochondrial Reactive Oxygen Species." **Cell** 153(3): 521-534. 2013.

ROSEMBERG, J. Mecanismo imunitário da tuberculose síntese e atualização. Boletim de pneumologia sanitária, v. 9, nº 1. 2001.

RUAN, J., G. ST. JOHN, S. EHRT, L. RILEY AND C. NATHAN. "noxR3, a Novel Gene from *Mycobacterium tuberculosis*, Protects *Salmonella typhimurium* from Nitrosative and Oxidative Stress." **Infection and Immunity** 67(7): 3276-3283. 1999

RUFFALO, M., T. LAFRAMBOISE AND M. KOYUTÁRK. "Comparative analysis of algorithms for next-generation sequencing read alignment." **Bioinformatics**. 27 (20), 2011.

SAKAMOTO, K. "The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection." **Veterinary Pathology** 49(3): 423-439. 2012.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. 3.ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, p.2344. 2001.

SARKAR N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes. **Annu Rev Biochem**. 66:173-97. 1997

SAUER, I., B. SCHALJO, C. VOGL, I. GATTERMEIER, T. KOLBE, M. MÄLLER, P. J. BLACKSHEAR AND P. KOVARIK. "Interferons limit inflammatory responses by induction of tristetraproline." **Blood** 107(12): 4790-4797. 2006.

SCHWARTZ, S., R. OREN AND G. AST. "Detection and Removal of Biases in the Analysis of Next-Generation Sequencing Reads." **PLoS ONE** 6(1): e16685. 2011.

SILVA MIRANDA, M., A. BREIMAN, S. ALLAIN, F. DEKNUYDT AND F. ALTARE. "The Tuberculous Granuloma: An Unsuccessful Host Defence Mechanism Providing a Safety Shelter for the Bacteria?" **Clinical and Developmental Immunology** 2012: 14, 2012.

SIMON, A. R., U. RAI, B. L. FANBURG AND B. H. COCHRAN. "Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species." **American Journal of Physiology - Cell Physiology** 275(6): C1640-C1652. 1998.

TAILLEUX, L., S. J. WADDELL, M. PELIZZOLA, A. MORTELLARO, M. WITHERS, A. TANNE, P. R. CASTAGNOLI, B. GICQUEL, N. G. STOKER, P. D. BUTCHER, M. FOTI AND O. NEYROLLES. "Probing Host Pathogen Cross-Talk by Transcriptional Profiling of Both *Mycobacterium tuberculosis* and Infected Human Dendritic Cells and Macrophages." **PLoS ONE** 3(1): e1403. 2008.

TOBIN, DAVID M., FRANCISCO J. ROCA, SUNGWHAN F. OH, R. MCFARLAND, THAD W. VICKERY, JOHN P. RAY, DENNIS C. KO, Y. ZOU, NGUYEN D. BANG, TRAN T. H. CHAU, JAY C. VARY, THOMAS R. HAWN, SARAH J. DUNSTAN, JEREMY J. FARRAR, GUY E. THWAITES, M.-C. KING, CHARLES N. SERHAN AND L. RAMAKRISHNAN. "Host Genotype-Specific Therapies Can Optimize the Inflammatory Response to Mycobacterial Infections." **Cell** 148(3): 434-446. 2011.

TRUSEQ RNA SAMPLE PREPARATION GUIDE. (Disponível em: http://epigenome.usc.edu/docs/resources/core_protocols/TruSeq_RNA_SamplePrep_Guide_15008136_A.pdf)

VAN WOLFSWINKEL, J. C. AND R. F. KETTING. "The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization." **Journal of Cell Science** 123(11): 1825-1839. 2010.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v.3, n.7. 2002.

VELMURUGAN, K.; CHEN, B.; MILLER, J. L.; AZOGUE, S.; GURSES, S.; HSU, T.; GLICKMAN, M.; JACOBS JR. W.R.; PORCELLI, S.A.; BRIKEN V. *Mycobacterium tuberculosis* nuoG Is a Virulence Gene That Inhibits Apoptosis of Infected Host Cells. **Plos Pathogens**, v.3, n.7. 2007.

VERCAMMEN, E., J. STAAL AND R. BEYAERT. "Sensing of Viral Infection and Activation of Innate Immunity by Toll-Like Receptor 3." **Clinical Microbiology Reviews** 21(1): 13-25. 2008.

WADDELL SJ. Reprograming the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptome during pathogenesis. **Drug Dis. Today**. 7(1): e67 - e73. 2010

WANG, J. P., S. E. ROUGHT, J. CORBEIL AND D. G. GUINEY. "Gene expression profiling detects patterns of human macrophage responses following *Mycobacterium tuberculosis* infection." **FEMS Immunology & Medical Microbiology** 39(2): 163-172. 2003.

WHEELWRIGHT, M., E. W. KIM, M. S. INKELES, A. DE LEON, M. PELLEGRINI, S. R. KRUTZIK AND P. T. LIU. "All-trans retinoic acid-triggered antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on NPC2." **The Journal of Immunology** 192(5): 2280-2290. 2014.

WHO. Global Tuberculosis Report 2013. (Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf)

XIAOZHEN, W.; HONGHAI, W.; JIANPING, X. Genes and regulatory networks involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Science China**, v.54, n.4. 2011.

ZHANG, M., J. GONG, Z. YANG, B. SAMTEN, M. D. CAVE AND P. F. BARNES. "Enhanced Capacity of a Widespread Strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Grow in Human Macrophages." **The Journal of Infectious Diseases** 179(5): 1213-1217. 1999.

ZHANG, Y.; YEW, W.W. Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**. Nov;13(11):1320-30. 2009.

ZHENG, Y., H. LI, J. YU, H. ZHAO, S. E. WANG AND X. REN. "Interferon-lambda: Special Immunomodulatory Agents and Potential Therapeutic Targets." **Journal of Innate Immunity** 5(3): 209-218. 2013

ZUMLA, A. AND M. MAEURER. "Rational Development of Adjunct Immune-Based Therapies for Drug-Resistant Tuberculosis: Hypotheses and Experimental Designs." **Journal of Infectious Diseases** 205(suppl 2): S335-S339. 2012.

ZUMLA, A. I., S. H. GILLESPIE, M. HOELSCHER, P. P. J. PHILIPS, S. T. COLE, I. ABUBAKAR, T. D. MCHUGH, M. SCHITO, M. MAEURER AND A. J. NUNN. "New antituberculosis drugs, regimens, and adjunct therapies: needs, advances, and future prospects." **The Lancet Infectious Diseases** 14(4): 327-340, 2014.

