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

Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro em
macrófagos humanos infectados com cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Juliana Gonçalves dos Santos

São Paulo
2014

Juliana Gonçalves dos Santos

**Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro
em macrófagos humanos infectados com cepas de *Mycobacterium
tuberculosis***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre
em Ciências

Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador: Professor Doutor Mario
Hiroyuki Hirata

**São Paulo
2014**

Ficha Catalográfica

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

Santos, Juliana Gonçalves dos
S237a Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo
do ferro em macrófagos humanos infectados com cepas de
Mycobacterium tuberculosis / Juliana Gonçalves dos Santos. --
São Paulo, 2014.
67p.

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

Orientador: Hirata, Mario Hiroyuki

1. Diagnóstico molecular : Medicina 2. Expressão gênica
3. *Mycobacterium tuberculosis* I. T. II. Hirata, Mario Hiroyuki,
orientador.

616.0756 CDD

Juliana Gonçalves dos Santos

Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro em
macrófagos humanos infectados com cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Comissão Julgadora da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata
Orientador/Presidente

1º. Examinador

2º. Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2014.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Mario Hiroyuki Hirata pela oportunidade de ingressar na pesquisa científica e pela paciência em todos os meus momentos de dificuldade.

Á Cristina Moreno Fajardo, técnica do laboratório, pelo apoio e amizade.

Á Professora Rosário Dominguez Crespo Hirata pelo exemplo de pesquisadora e profissional.

Á equipe da Tuberculose, Joás, Gabriela, Gisele, Marcelo, Eduardo, Caio e Rosana pela amizade e auxílio na produção deste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório – aprimorandos, alunos de IC, pós graduandos e demais pesquisadores pela amizade e momentos de descontração.

Á Professora Célia Colli e sua equipe pelo auxílio na dosagem de ferro das culturas de macrófagos.

Á Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Á CAPES pela bolsa de estudo concedida.

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

RESUMO

SANTOS, J.G. **Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo do ferro em macrófagos humanos infectados com cepas de *Mycobacterium tuberculosis***. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O ferro (Fe) é um dos metais mais importantes para a homeostase. Está envolvido em vários processos fisiológicos como, por exemplo, processo redox, síntese de DNA, metabolismo energético e transporte de biomoléculas. A regulação da concentração deste metal é bem controlada já que o seu excesso pode culminar na produção de espécies reativas de oxigênio que causam dano celular e sua escassez inibe o sistema imunológico. Um dos elementos chaves para o sucesso da cura de doenças infecciosas está na capacidade do hospedeiro em conter a proliferação do microrganismo e na ativação controlada da imunidade celular. Assim como os organismos eucariotos, grande parte dos organismos procariotos necessita de Fe para proliferação e manutenção das atividades biológicas. Deste modo, a interação entre esses dois organismos promove uma batalha para a captura deste metal que pode influenciar no curso de uma doença infecciosa tanto para o benefício do hospedeiro quanto para o patógeno invasor. A Tuberculose (TB) é a maior causa de morte por doença infecciosa em adultos no mundo sendo responsável pela morte de 1 milhão de pessoas anualmente. Embora a doença tenha grande possibilidade de cura e tratamento disponível para a população, a reincidência de TB é alta e o surgimento de cepas resistentes à antibioticoterapia cresce gradativamente. Diante disso, é necessário compreender cada vez mais o processo fisiopatológico envolvido na TB para buscar novos alvos terapêuticos para cura e redução dos índices de mortalidade. O presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão de genes envolvidos na homeostase do ferro em macrófagos humanos após a infecção com *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico hipervirulento *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1471 com e sem suplementação de ferro. Para isso, macrófagos infectados foram lisados para obtenção e purificação de RNA total e o estudo de expressão gênica foi realizado utilizando a tecnologia de PCR em tempo real (RT-qPCR). Além disso, foi determinada a concentração de ferro no sobrenadante dessas culturas bem como o crescimento desses microrganismos no interior dos macrófagos. Genes envolvidos no controle da internalização do Fe em macrófagos foram diferentemente expressos nas culturas infectadas em relação ao controle não infectado. Também foi possível observar que a expressão desses genes varia com o tempo de infecção e com o tratamento com ferro, demonstrando que existe um esforço da célula hospedeira em conter a infecção. Não foi observado variação significativa com relação à dosagem de ferro no sobrenadante das culturas infectadas em relação ao controle e o crescimento das micobactérias dentro dos macrófagos não variou de maneira significativa com relação aos tratamentos empregados. Dessa forma, este estudo contribuiu para o esclarecimento da resposta do macrófago frente à infecção com micobactérias que apresentam perfil de virulência distinto entre si e a interação do ferro neste processo patológico.

Palavras-chave: Tuberculose, micobactéria, Ferro, Expressão gênica, Virulência.

ABSTRACT

SANTOS, JG. **Expression analysis of genes involved with iron metabolism in human macrophages infected with *Mycobacterium tuberculosis* strains**. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Iron (Fe) is one of the most important metals to homeostasis. It is involved in various physiological processes such as redox process, DNA synthesis, energy metabolism and transport of biomolecules. The concentration regulation of this metal is well-controlled since its excess can lead to the production of reactive oxygen species that cause cell damage and its scarcity inhibits the immune system. One of the key elements for the cure of infectious diseases is the host's ability to contain the spread of the organism and control activation of cellular immunity. Just as eukaryotes, most prokaryotes organisms require Fe for its proliferation and maintenance of biological activities. Thus, the interaction between these two organisms promotes a battle to capture this metal that can influence the course of an infectious disease either to the benefit of the host or to the invading pathogen. Tuberculosis (TB) is the leading cause of death from infectious disease among adults worldwide and is responsible for the death of 1 million people annually. Although the disease has high possibility of cure and treatment available to the population, the recurrence of TB is high and the emergence of resistant strains to antibiotics grows gradually. Therefore, it is necessary to understand more the pathophysiological process involved in TB to seek new therapeutic targets for healing and reduction in mortality. The present study aims to evaluate the expression of genes involved in iron homeostasis in human macrophages after infection with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the hypervirulent clinical isolate *Mycobacterium tuberculosis* Beijing in 1471 with and without iron supplementation. For this, macrophages were lysed and purified to obtain total RNA, and the study of gene expression was performed using the technology of Real-time PCR (RT-qPCR). Furthermore, the iron concentration in the supernatant of these cultures was determined as well as growth of these microorganisms in macrophages. Genes involved in controlling internalization of Fe in macrophages were differently expressed in infected compared to uninfected control cultures. It was also observed that the expression of these genes varies with the time of infection and treatment with iron, showing that there is an effort of host cell to contain the infection. No significant variation was observed onto the iron dosage in the supernatant of infected compared to control cultures and the growth of mycobacteria inside macrophages did not vary significantly between treatments. Thus, this study contributed to the clarification of the macrophage response to infection with mycobacteria that have distinct virulence profile among themselves and the interaction of the iron in this disease process.

Keywords: Tuberculosis, Mycobacteria, Iron, Gene expression, Virulence.

LISTA DE ABREVIATURAS

SIDA	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
TB	Tuberculose
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
TLR	Toll like receptor
CR	receptor complemento
Mbt	micobactina
Fur	Ferric uptake regulator
Irt	Iron regulated transporter
ideR	Iron dependente repressor and activator
ROS	espécies reativas de oxigênio
iROS	intermediaries de espécies reativas de oxigênio
kDa	kilo Dalton
Th	Linfócito
LTB	Tuberculose Latente
pknG	Serine/threonine protein kinase
ppk	Família de proteínas quinase
Fe	Ferro
O ₂ ^{•-}	Ìon superóxido
OH	Radical hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
DMT1	Proteína transportadora de metais divalentes tipo 1
Tf	Transferrina
FLVCR	Feline leukaemia vírus, subgrupo C, receptor
IRE	Elementos reponsivos de Ferro
IRP	Proteínas
TfR1	Receptor de transferrina do tipo 1
UTR	Untranslated receptor
LF	Lactoferritinas
NGAL	Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos
PMA	Éster de forbol miristato

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Equação química da reação de Fenton 5

Figura 2 Determinação de genes estáveis utilizando o programa *Genorm* 24

Figura 3 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *HAMP* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (A) e com suplementação de ferro (B). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$ 25

Figura 4 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *SLC11A1* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (C) e com suplementação de ferro (D). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$ 25

Figura 5 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *SLC40A1* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (E) e com suplementação de ferro (F). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$ 26

Figura 6 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *TFRC* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (G) e com suplementação de ferro (H). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$ 26

Figura 7 - Expressão relativa do gene *TFR2* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv sem e com suplementação de ferro (I). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$ 27

Figura 8 Representação gráfica do perfil de genes (A.1-X.2) após infecção com micobactérias nos tempos 24, 48 e 72 horas com e sem suplementação com ferro. Os valores descritos correspondem à média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *Two way*

ANOVA e teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foi adotado nível de significância ($p \leq 0.05$); (*) = $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$	34
Figura 9 Recuperação de micobactérias fagocitadas nos tempos 24, 48 e 72 horas com (B) e sem suplementação (A) com ferro em macrófagos ativados. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Não houve diferença estatística entre as infecções e ao longo do tempo.	35
Figura 10 Representação gráfica da curva padrão linear e equação da reta formulada para esta metodologia	36
Figura 11 Representação gráfica da concentração de ferro no sobrenadante das culturas celulares não tratadas com citrato férrico amoniacal no decorrer do tempo. Foi aplicado o teste <i>One way ANOVA</i> e pós-teste de <i>Tukey</i> . Foi adotado nível de significância $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$	37
Figura 12 Representação gráfica da quantificação de ferro nas amostras tratadas com 500 μM de citrato férrico amoniacal.	37
Figura 13 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. tuberculosis</i> Beijing 1471. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste <i>One way ANOVA</i> e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$	39
Figura 14 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. tuberculosis</i> Beijing 1471. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste <i>One way ANOVA</i> e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$	40
Figura 15 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. tuberculosis</i> Beijing 1471. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste <i>Kruskal Wallis</i> e pós-teste de Dunn; (*) = $p \leq 0.05$; (***) = $p \leq 0.001$	41
Figura 16 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias <i>M. tuberculosis</i> H37Rv e <i>M. tuberculosis</i> Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular	

após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$; (**) = $p \leq 0.01$ 42

Figura 17 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$ 43

Figura 18 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$ 44

Figura 19 Representação gráfica da concentração de TNF alfa no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. Os valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Kruskal Wallis* e teste de comparação múltipla de *Dunn*. Foi adotado nível de significância de $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 45

Figura 20 Representação gráfica da concentração de IL-6 no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 46

Figura 21 Representação gráfica da concentração de IL-8 alfa no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471, sem e com tratamento com citrato férrico amoniacal. Os valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Kruskal Wallis* e teste de comparação múltipla de *Dunn*. Foi adotado nível de significância de $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 47

Figura 22 Representação gráfica da concentração de IL2, IL4, IL10 e IL17 no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. Estão representados média e desvio padrão. 48

Figura 23 Representação gráfica da concentração de IL-1 α e IL-1 β no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado

teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 49

Figura 24 Representação gráfica da concentração de IL-1 RA e MIP-1 α no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 50

Figura 25 Representação gráfica da concentração de MCP-1 e MIP-1 β no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$ 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Genes relacionados ao metabolismo do ferro em humanos..... 19

Tabela 2 Valores utilizados para construção de curva padrão linear para dosagem do ferro 36

SUMÁRIO

1) INTRODUÇÃO	
1.0 Tuberculose.....	1
1.1 Fisiopatologia da Tuberculose	2
1.2 Metabolismo do ferro.....	5
1.3 Ferro e infecção microbiana.....	7
1.4 Ferro e Tuberculose	9
1) OBJETIVO GERAL	13
2.1 Objetivos específicos.....	13
2) MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Seleção e cultivo das Micobactérias	14
3.2) Cultivo e ativação de células monocíticas THP-1 <i>in vitro</i>	15
3.2.1) Descongelamento de células monocíticas	15
3.2.2) Manutenção das culturas de THP-1	15
3.2.3) Congelamento das células THP-1	16
3.2.4) Diferenciação das células THP-1 em macrófagos.....	16
3.3) Infecção das células THP-1 com <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
3.4) Extração de RNA total de macrófagos	18
3.5) Quantificação da expressão gênica pela RT-PCR em tempo real.....	18
3.5.1) Síntese de cDNA	19
3.5.2) Análise da expressão gênica.....	20
3.6) Contagem de micobactérias fagocitadas	21
3.7) Dosagem de ferro no sobrenadante das culturas de células	22
3.8) Avaliação de viabilidade celular	22
3.9) Dosagem de proteínas	23
3.10) Análise estatística.....	23
3) Resultados	24
4.1) Análise de expressão gênica.....	24
4.1.1) Escolha dos genes endógenos	24
4.1.2) Expressão dos genes relacionados ao metabolismo do ferro	24
4.1.3) Expressão dos genes relacionados a resposta imune celular.....	27
4.2 Contagem de micobactérias intracelulares	34

4.3 Dosagem do ferro no sobrenadante	36
4.4 Viabilidade celular após infecção com <i>M. tuberculosis</i>	37
4.5 Dosagem de proteínas importantes para imunidade celular	45
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO.....	58
7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
8. ANEXOS	65

1.0 Tuberculose

A Tuberculose é uma das doenças infectocontagiosas mais preocupantes atualmente. É considerada a segunda maior causa de mortalidade no mundo por um único agente infeccioso, sendo superada apenas pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA). Em 2011, aproximadamente 8.7 milhões de pessoas adoeceram e cerca de 1.4 milhões faleceram em decorrência desta doença (WHO, 2012). Além disso, a TB encontra-se entre uma das três maiores causas de morte em mulheres entre 15-44 anos e lidera na mortalidade de pessoas infectadas com vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), representando dessa forma, cerca de um quarto das mortes (WHO, 2013).

O Brasil está entre os 22 países que concentram 82% de casos no mundo e está entre uma das prioridades estabelecidas pelo governo federal para gestão de políticas públicas que visam à contenção, tratamento e prevenção da doença desde 2003. A Tuberculose está intimamente relacionada com o padrão socioeconômico presente num determinado país e/ou região. No Brasil, as regiões que concentram maior incidência de casos registrados estão nas periferias urbanas ou aglomerados urbanos denominados favelas como também estão relacionados às más condições de moradia e alimentação, à falta de saneamento básico, ao abuso de álcool, tabaco e outras drogas (MINISTERIO DA SAÚDE, 2012).

A TB é causada pela bactéria *Mycobacterium tuberculosis* sendo este o principal agente etiológico da doença. Pode se disseminar em vários órgãos como pele, fígado, linfonodos, cérebro, mas a principal forma de manifestação da doença ocorre através dos pulmões. O contágio e a transmissão da Tuberculose pulmonar ocorrem pela inalação de gotículas em suspensão que contém a micobactéria no seu interior e aloja-se no pulmão, mais precisamente nos alvéolos pulmonares, podendo levar a doença ativa (sendo este grande foco de transmissão) ou permanecendo inerte no organismo durante anos ou décadas (WHO, 2013).

Apesar do número de casos ter diminuído 41% entre os períodos de 1990-2011, existir cura e obter sistema de tratamento efetivo, a Tuberculose ainda é considerada uma enfermidade que tem grande impacto na saúde da população mundial. Isso se deve a vários fatores dentre os quais se podem citar aparecimento de cepas hipervirulentas

resistentes a antibioticoterapia existente, co-infecção com outras doenças, principalmente a SIDA, Diabetes, administração de corticosteroides e pacientes imunodeprimidos (Rodriguez et al, 2006).

1.1 Fisiopatologia da Tuberculose

A Tuberculose Pulmonar é uma infecção complexa, que exige uma interconexão entre o organismo infectado (hospedeiro humano) e a linhagem de micobactéria. O *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é uma espécie de micobactérias que apresenta formato bacilar, imóvel, aeróbia e possui uma parede celular que apresenta atividade imunomodulatória pela presença de glicolípídeos fenólicos, fosfatidilinositol, lipoproteínas e manose que interagem com as células de defesa do hospedeiro que reconhecem essas moléculas de superfície (Maartens et al, 2007).

Após a entrada do bacilo no organismo do hospedeiro, ocorre o primeiro contato com células especializadas do sistema imune – macrófagos e células dendríticas. Essas células possuem a habilidade de reconhecer padrões moleculares específicos de *Mycobacterium tuberculosis* que servirão para desencadear o primeiro mecanismo de defesa – sistema imune inato. Os macrófagos alveolares englobam a micobactéria e iniciam o processo de digestão, chamado fagocitose. Esse processo auxilia na contenção da proliferação do bacilo, na estabilização da micobactéria no local encontrado, evitando assim sua disseminação para outras regiões do organismo e também serve de célula sinalizadora para recrutamento de outras do sistema imunológico que auxiliarão para destruição do microrganismo (Vergne et al, 2004).

O recrutamento do microrganismo para início da fagocitose ocorre primeiramente por meio do reconhecimento do *M. tuberculosis* pelos receptores moleculares expostos na superfície de membrana dos macrófagos. Desses pode-se citar os toll like receptors (TLRs), receptor complemento (CRs), receptor de manose. A interação de TLR2 com TLR1 reconhecem fosfatidilinositol e uma lipoproteína de 19 kDa presente na parede celular da micobactéria, o que resulta na ativação da imunidade antimicrobiana (Maartens et al, 2007).

Após este primeiro contato, o macrófago ativa sua maquinaria para envolver e englobar o bacilo completamente, culminando na formação do fagossoma que se fundirá com lisossoma para formar o fagolisossoma. Este contém enzimas líticas e produtoras de espécies reativas de oxigênio (iROS) que deixam um ambiente inóspito para a

manutenção da vida da micobactéria favorecendo assim a morte e total digestão do microrganismo (Nguyen et al, 2005).

O processo de fagocitose também pode acarretar em morte programada (apoptose) do macrófago que irá antes promover a produção e posterior sinalização de moléculas denominadas citocinas que induzem a ativação de outras células (Th1/Th2) do sistema imune, gerando uma resposta em cascata de vários tipos celulares (linfócitos T auxiliares, linfócitos T citotóxicos, linfócitos B, natural killers), que serão recrutados ao local da infecção formando um emaranhado de células denominado granuloma (Koo et al, 2012).

As células Th1 são importantes na ativação da resposta pró-inflamatória por meio da produção de interleucinas (IL) 1, 12, interferon γ (INF γ) que são moléculas imprescindíveis para produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e acidificação do compartimento intramacrofágico. As células Th2, ao contrário, favorecem uma resposta anti-inflamatória pela indução de IL 10, IL4 que suprimem a proliferação de células Th1 e a atividade de macrófagos (Lee et al, 2009; Koo et al, 2012).

Entretanto, bactérias patogênicas intracelulares como a *M. tuberculosis* utilizam mecanismos moleculares que ajudam no escape do sistema imune do hospedeiro, seja por meio da inibição da formação do fagolisossoma, pela inativação de moléculas produtoras de espécies reativas de oxigênio, radicais livres ou pela produção de substâncias que inibem a diminuição do pH do vacúolo aonde a micobactéria encontra-se alojada (Rodriguez et al, 2006; Altena et al, 2011).

Isso resulta na sobrevivência dos bacilos durante anos ou até mesmo décadas com metabolismo energético reduzido dentro do granuloma, mantendo-se sob estado de latência, em que não há proliferação da linhagem e, que pode, eventualmente ser ativado quando há alguma instabilidade do sistema imune do hospedeiro (co-infecção com outras enfermidades como, por exemplo, HIV, uso de drogas imunossupressoras, câncer e diabetes). Este mecanismo desenvolvido por micobactérias é caracterizado na clínica como Tuberculose Latente (LTB) em que pacientes são portadores de micobactérias viáveis que podem em algum momento da vida adquirir a doença ativa e tornar focos de transmissão para população (WHO, 2012).

A interação do hospedeiro com o bacilo é intrigante, pois, uma vez que é formado o granuloma não beneficia totalmente o indivíduo. Para o hospedeiro, a formação do granuloma é benéfica porque estabiliza a infecção e evita a proliferação do

bacilo para outros locais, mas ao mesmo tempo não mata efetivamente a micobactéria patogênica (Sundaramurthy et al, 2007).

O grupo de estudo mencionado anteriormente avaliou a atividade de uma proteína quinase chamada PknG. Esta proteína tem papel importante na fosforilação de substâncias importantes na transdução de sinal de processos bioquímicos que ocorrem na célula e conseguiram constatar que a ausência dessa proteína favorece a maturação do fagolisossoma e posterior eliminação do bacilo. Por ser uma proteína solúvel, que não está presente na região transmembranar da micobactéria e também se assemelhar geneticamente com a proteína quinase de humano (PKC α), foi especulado que a micobactéria secreta PknG no citosol da célula eucariótica, interferindo assim na cascata de sinal que é mediada pela PKC α , envolvendo a maturação do endossoma do macrófago (Sundaramurthy et al, 2007).

Outro estudo realizado por Boutte e Crosson em 2012 também demonstrou que proteínas quinases, principalmente da família ppk são importantes para um mecanismo denominado "Resposta Estringente" que permite a reprogramação da transcrição em resposta a ambiente escasso de oxigênio e limitação de nutrientes, que é justamente o ambiente enfrentado por micobactérias persistentes que se encontram em granulomas.

Bactérias persistentes se caracterizam por serem de difícil tratamento pela resistência aos antibióticos disponíveis, por apresentar componentes genéticos que as tornam mais virulentas, dificuldade de caracterização para possível prevenção, controle de transmissão e de surgimento de surtos (WHO,2012; Koo et al, 2012).

Os aspectos genéticos também são relevantes na patogenicidade da Tuberculose. Num estudo *in vitro* foi avaliado genoma completo de cepas de *M. tuberculosis* em diferentes condições tanto dentro quanto fora do macrófago e observou-se que o arsenal de genes das micobactérias intramacrofágicas reduziu significativamente, demonstrando dessa forma que as micobactérias se adaptam e adequam o seu metabolismo às condições do ambiente em que se depara (Maartens et al, 2007).

As variações genéticas do hospedeiro também apresentam papel importante quanto à suscetibilidade à infecção causada por micobactérias patogênicas. Pacientes que apresentam deficiência na produção de INF γ e fator de necrose tumoral (TNF α) tem maior probabilidade de adquirir Tuberculose. TNF α é essencial para formação e manutenção do granuloma em pacientes acometidos pela TB latente e sua ausência resulta na redução do granuloma e menor atividade pró-inflamatória do sistema imune,

o que favorece a reativação dos bacilos persistente e ao surgimento de TB ativa (Altena et al, 2011) .

Diante de vários fatores que podem contribuir para a patogênese da TB, estudos tanto in vitro quanto in vivo que consigam elucidar os mecanismos de virulência e persistência intramacrofágica tornam-se indispensáveis para entender a doença e buscar marcadores que auxiliem no prognóstico e tratamento da TB.

1.2 Metabolismo do ferro

Com poucas exceções, o ferro (Fe) é um dos elementos presentes em quase todas as células do organismo, atuando como cofator em várias reações bioquímicas, como, por exemplo, no transporte de oxigênio metabolismo energético e síntese de DNA. Essa variabilidade de funções que o ferro exerce no organismo é devido a sua propriedade química de mediar rotas de transdução de sinal (sinalização redox) por meio da transferência de elétrons (Wang et al, 2011).

Reações de oxirredução são essenciais para manutenção da homeostase celular sendo um mecanismo importante para proteínas que catalisam reações como, por exemplo, oxidases, peroxidases que necessitam dessas reações para exercer sua atividade. Além disso, a sinalização redox é necessária para evitar a formação de radicais livres que culminam em estresse oxidativo, danos ao DNA e morte celular (Quinlan et al, 2001; Wang et al, 2011).

Fora suas propriedades benéficas no organismo, o ferro em elevadas concentrações pode levar a formação de radicais peróxidos que são altamente reativos por meio da Reação de Fenton. A reação de Fenton compreende na interação de ferro na sua forma oxidada (Fe^{3+}) com peróxido de hidrogênio, levando a formação de hidroxila livre ($\text{OH}^\bullet$) e ânions superóxidos ($\text{O}_2^{\bullet-}$), conforme a equação apresentada abaixo:

Figura 1 Equação química da reação de Fenton

A maioria do ferro presente no organismo (pelo menos 2,1g em humanos) está distribuída em hemoglobinas e células eritróides em desenvolvimento que servem para o transporte de oxigênio. Cerca de 600 mg de ferro podem estar presentes em macrófagos e aproximadamente 300 mg estão presentes em mioglobinas e o restante está estocado no fígado (aproximadamente 1g). A absorção de ferro proveniente da dieta ocorre por meio da redução do ferro (Fe^{2+}) no lúmen intestinal e seu transporte pela membrana apical dos enterócitos pela proteína transportadora de metais divalentes do tipo 1 (DMT1). O Fe processado nessas células (ferro complexado com heme e outras proteínas) é excretado através da membrana apical para a corrente sanguínea pela proteína transportadora ferroportina.

A ferroportina atua em conjunto com outra proteína (hefaestina) promovendo a oxidação do ferro para a liberação na corrente sanguínea aonde se complexará com transferrinas circulantes que irão distribuir esse metal para os demais locais do organismo. O total de ferro nas transferrinas (Tf) corresponde a 0,1% de moléculas desse metal no organismo e essas proteínas passam por constantes reciclagens para a manutenção de eritropoiese. As células sanguíneas senescentes são metabolizadas por macrófagos e os resíduos de ferro presente nessas células são reciclados e liberados para corrente sanguínea (Theil, 2011; Wang et al, 2011).

Outra molécula importante no metabolismo do ferro de mamíferos é a hepcidina que é um peptídeo excretado pelo fígado em resposta a inflamação e excesso de Fe no organismo. Este peptídeo se complexa com seu receptor, Ferroportina tipo 1, que será internalizado e degradado no lisossomo bloqueando desse forma a liberação de ferro dos macrófagos. Alguns estudos foram realizados avaliando o papel da hepcidina em muitas enfermidades como no caso da Hemocromatose que se trata de uma doença em que ocorre o acúmulo de ferro nos tecidos devido ao seu excesso acarretado por mutações no gene que codifica a hepcidina, levando a uma série de problemas sistêmicos no organismo como também a sua relevância na mediação de infecções bacterianas (Lounis et al, 2001; Andrews et al, 2002; Drakesmith et al, 2012).

A excreção do excesso de ferro intracelular é feita pela ferroportina ou por um exportador denominado FLVCR (feline leukaemia vírus, subgrupo C, receptor). O Fe também pode ser estocado e detoxificado por intermédio da proteína ferritina. A ferritina é uma proteína carreadora de ferro que possui domínios e subunidades que conferem a capacidade de armazenar aproximadamente 4500 moléculas de Fe, ferro tornando-a uma molécula crucial para a saúde. A depleção do gene que codifica esta

proteína ocasiona letalidade embrionária o que justifica sua importância no organismo (Wang et al, 2011).

A regulação do ferro em organismos superiores é essencial e orquestrada por várias moléculas e elementos pós transcricionais nos quais podemos citar os elementos responsivos de ferro (IREs) e proteínas reguladoras de ferro (IRPs). A expressão do receptor de transferrina do tipo 1 (TfR1) é coordenada pela ligação do IRP1, IRP2 e IRE a porção não translacional (UTR) do respectivo mRNA. Quando ocorre a deprivação de ferro nas células, a interação IRE-IRP acontece e estabiliza o mRNA do TfR1 e concomitantemente leva ao bloqueio da translação do mRNA da ferritina, resultando num aumento dos níveis de TfR1 que leva ao estímulo da captação de ferro no plasma por Tf circulantes, na tentativa de neutralizar a deficiência deste biometal (Resnick, 2012).

Contrariamente, células que apresentam alta concentração férrica não têm disponíveis IRP1 e IRP2 para se ligarem ao IRE, permitindo dessa forma que o mRNA do TfR1 seja degradado e o mRNA da ferritina seja traduzido. Este mecanismo de regulação IRP-IRE é muito bem caracterizado e revisado e assim como a ferritina, IRP1 e IRP2 são essenciais para vida demonstrando por meio de estudos moleculares em camundongos que a depleção dos genes codificantes dessas moléculas levam a má formação do feto, má absorção de nutrientes, perda de peso e morte até quatro semanas (Galy et al, 2008). Essas proteínas reguladoras além de ter papel crucial na homeostase do ferro também tem importância biológica na patogênese do câncer apresentando atividade supressora de tumores (Wang et al, 2011).

Uma Tf independente do sistema de captação de ferro que tem importância equivalente aos já descritos é a Lipocalina associada à gelatinase de neutrófilos (NGAL) que se complexa com Fe provavelmente por meio da ligação com quelantes lipofílicos de ferro presentes no organismo. Essa proteína é secretada por células epiteliais e neutrófilos que são posteriormente transportados para endossomos maduros complexados com moléculas quelantes de ferro. O NGAL está associado ao sistema imune inato por auxiliar na contenção da proliferação de bactérias e/ou fungos dentro de macrófagos por ligar-se a moléculas captadoras de ferro (sideróforos) que são excretados por bactérias invasoras/patogênicas, limitando a disponibilidade de nutrientes para sua sobrevivência (Schaible et al, 2004).

1.3 Ferro e infecção microbiana

Considerando os mecanismos evolutivos, a interação patógeno-hospedeiro há muitos anos ocorre e tanto o hospedeiro quanto o microrganismo evoluíram seus mecanismos de defesa e sobrevivência, ao longo dos anos. O primeiro desenvolveu mecanismos que suprimem nutrientes disponíveis para o microrganismo e o segundo começou a sintetizar moléculas solúveis que pudessem capturar nutrientes essenciais para sua adaptação no citoplasma do hospedeiro (Collins et al, 2008).

O sistema de captura de ferro em procariotos envolve a síntese de moléculas ligantes de ferro (sideróforos) que são micobactinas e exoquelinas em *Mycobacterium sp*, moléculas TF-like de *Listeria monocytogenes* e enterobactinas presentes em bactérias gram negativas. A captação desses ligantes conjugados para dentro da célula procariótica dependerá do receptor e do transportador dependente de ATP localizado na membrana externa da bactéria (Schaible et al, 2004).

Em bactérias gram negativas, o receptor de enterobactinas férricas, FepA está localizado na membrana externa desses organismos e a interação entre o receptor e o seu respectivo ligante transfere o ferro para uma proteína periplasmática, FepB, que é dependente da ação de permeases consumidoras de ATP. Em espécies de *Neisseria*, *Staphylococcus Aureus*, *Streptococcus mutans* e *L. monocytogenes* expressam receptores de superfície que irão interagir com moléculas ligantes de ferro de mamíferos (Tf/Lf). *E.coli*, *V. cholerae* expressam hemo ou citolisinas para liberar o complexo de Fe intracelular. *C. diphtheriae* utiliza oxigenases que degradam heme das células do hospedeiro disponibilizando Fe para sua manutenção (Andrews et al, 2003; Schaible et al, 2004).

Recentemente, estudos vêm apontando a hepcidina como peptídeo antimicrobiano que sob ativação das citocinas IL1 e IL6 medeia a internalização e destruição da ferroportina 1 presente na superfície de enterócitos e macrófagos bem como em membranas de vesículas intracelulares como os fagossomos que contém patógeno inserido. Isso resulta em bloqueio do efluxo de ferro para fora da célula sendo uma resposta rápida à inflamação, mas que por outro lado leva ao acúmulo de ferro intracelular que pode favorecer a captação de ferro pelos patógenos fagocitados (Collins, 2008).

Outra molécula envolvida na interação entre patógeno-célula hospedeira é a proteína ligante de ferro denominada Lactoferritina (LF) que está presente nos fluidos corporais do hospedeiro como leite, lágrima, soro e saliva que são liberados por

neutrófilos durante o processo de degranulação. A LF circulante satura com moléculas de ferro, ajudando na varredura deste metal livre nos tecidos e sendo uma das primeiras linhas de defesa do organismo contra evasão de microrganismos (Schaible et al, 2004). Possui atividade microbicida para maioria das enterobactérias e inibe a formação de biofilme em paciente que apresentam fibrose cística e infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (Andrews et al, 2003; Schaible et al, 2004; Theil, 2011).

Além dos efeitos diretos da replicação de microrganismos e imunidade inata, o ferro influencia na resposta imune adquirida. Tanto a ausência quanto o excesso do ferro dificultam a expressão e reconhecimento de antígenos nos receptores de células T que resulta em baixa sensibilidade ao patógeno intracelular pela diminuição da síntese de citocinas e imunoglobulinas (Igs), principalmente a IgG e IgM que são moléculas importantes para início do processo inflamatório. Desta forma, a concentração do ferro no organismo precisa sempre estar sob uma concentração ótima para melhor resposta contra microrganismos invasores (Collins, 2008).

1.4 Ferro e Tuberculose

Em doenças crônicas, o surgimento de anemia é comum e, muitas das vezes, pode agravar o estado fisiológico do paciente. No caso de pacientes acometidos por doenças infecciosas o ferro pode ter papel crucial para manutenção da sobrevivência do paciente tanto na sua escassez quanto em excesso. No caso da AIDS, doença que afeta células CD4 que são cruciais para o sistema imunológico, pode-se observar um acúmulo de ferro na medula óssea e o metabolismo de regulação do mesmo encontra-se mais lento e a retirada do ferro da circulação é mais acentuada. Esse fenômeno ocorre porque na presença de qualquer risco para o organismo um dos primeiros mecanismos de defesa do hospedeiro é a absorção de nutrientes, principalmente, o ferro, inviabilizando esses nutrientes para microrganismos invasores - esse processo é chamado de imunologia nutricional (STAVRUM et al, 2011; TANEJA et al, 2010).

O ferro apresenta duas vertentes e também opiniões contraditórias dentre os pesquisadores. Muitos defendem que estados anêmicos auxiliam na incidência de algumas doenças infecciosas como já foi relatado que crianças anêmicas têm menor incidência de casos de malária comparados com crianças que apresentam níveis normais

de ferro no organismo (SARNI, et al, 2010). Entretanto, há pesquisadores que são contra essa teoria uma vez que, a ausência ou baixa concentração férrica acarreta em baixa resposta imune contra microrganismo devido à diminuição da eficiência fagocítica dos macrófagos e da atividade de células natural killer na destruição dos microrganismos intracelulares (REDDY et al, 2012; RODRIGUEZ et al, 2006).

O excesso de ferro em processos infecciosos já foi bem descrito e sabe-se que níveis altos de ferro no organismo do hospedeiro intensifica a virulência do patógeno e, conseqüentemente, agrava a doença, principalmente, na TB. Alguns estudos demonstraram que ao administrar uma dieta rica em ferro para pacientes com Tuberculose, o quadro clínico do paciente se agravava rapidamente (RODRIGUEZ et al, 2003; LAMARCA et al, 2004).

A via que controla o metabolismo do ferro em microrganismos e a interação bactéria-hospedeiro é um ponto chave na busca por novos alvos terapêuticos que possam intervir nesta via metabólica em microrganismos patogênicos bem como entender melhor os estágios críticos dessa doença, tanto em períodos de latência quanto na doença ativa (Menzie et al, 2011; REDDY et al, 2012; RODRIGUEZ et al, 2006 e 2003; LAMARCA et al, 2004).

A TB possui duas formas de se manifestar no hospedeiro. O primeiro é a doença na forma ativa com a presença de sintomas característicos da doença, como por exemplo, emagrecimento, sudorese noturna, febre e tosse por mais de uma semana sendo esta forma a mais preocupante quanto ao aspecto epidemiológico, pois é nessa fase que os indivíduos podem disseminar a doença através da tosse. O segundo é a TB latente que acomete grande parte dos indivíduos infectados e tem como principal característica a ausência de sintomas que dificulta a busca por auxílio médico pelos pacientes, tornando-se grandes reservatórios para esses microrganismos e podem, porventura, desenvolver a doença ativa (LIN et al, 2008; KOUL et al, 2011).

Na doença ativa, o ferro, como dito anteriormente, tem papel importante, pois é considerado um fator de virulência da *M. tuberculosis*, já que auxilia na sua sobrevivência e reprodução dentro do hospedeiro. Na doença latente, o ferro não deixa de ser importante porque em ambiente escasso de nutrientes o bacilo consegue obter ferro através da formação e liberação de sideróforos (micobactinas), moléculas captadoras que se complexam com ferro exógeno e o transporta para o citoplasma da célula para utilização pelas micobactérias. (MURPHY et al, 2007; YANG et al, 2011).

A síntese de micobactinas é complexa, pois envolve a ação de várias enzimas. Os genes que codificam essas enzimas são altamente conservados nessa espécie e a transcrição é regulada por outras proteínas, ou apoproteínas que são ativadas mediante a complexação do ferro nos seus sítios alostéricos. Dentre as proteínas reguladoras pode-se citar o *ferric uptake regulator* (*fur*) e o iron dependent repressor and activator (*ideR*). As duas são cruciais para o controle endógeno de ferro na *M. tuberculosis* (RODRIGUEZ et al, 2003; REDDY et al, 2012).

A proteína *fur* (*ferric uptake regulator*???) serve como um sensor para concentrações elevadas de ferro, pois ao se complexar com o ferro ela reprime a transcrição de uma série de genes utilizados para formação de sideróforos e genes que codificam proteínas transmembranais que transportam ferro exógeno para o interior do bacilo. Essa proteína também está envolvida na TB latente, pois o gene que a codifica se localiza muito próximo ao gene da proteína catalase peroxidase (*KatG*) envolvida na resistência a Isoniazida. Essa aproximação pode modificar a expressão genica da *KatG*, podendo ser favorável ou não para a sobrevivência do bacilo dentro do macrófago, uma vez que ela é essencial para a prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Estudos indicam que *fur* pode ser um alvo terapêutico importante para o controle da TB por influenciar não somente a transcrição da *KatG* mas também de aproximadamente 100 genes relacionado a virulência da *M. tuberculosis* (KOUL et al, 2011).

O *ideR* é uma proteína que também tem sua ação modulada a partir da ausência ou alta concentração férrica na célula bacteriana. Ela regula a transcrição dos genes pertencentes à família *mbt* e nas bacterioferritinas (*bfr*) que são as proteínas estocadoras de ferro. Quanto a sua ação na família de genes *mbt*, em altas concentrações de ferro, o *ideR* se complexa com ferro para ficar ativado, liga-se ao *operon* desses genes e reprime a transcrição, concomitantemente o mesmo se complexa no *operon* de genes que codificam bacterioferritinas (*bfr A e B*) que estocam o ferro que está em excesso. O *ideR* não é importante apenas para manter a homeostase do ferro dentro do bacilo, mas também regula genes relacionados ao stress oxidativo e ao pH – acidez (KEREN et al, 2011; RODRIGUEZ et al, 2006).

Outras proteínas estão presentes na regulação do ferro como, por exemplo, as irtAB que são proteínas de membrana que captam ferro livre ou acoplado as micobactinas solúveis. A depleção do cassete desses genes afeta a atividade da micobacteria, entretanto, não são consideradas essenciais para a sobrevivência do

bacilo. Apesar da utilização dessa complexa maquinaria para regulação do ferro endógeno, o *M. tuberculosis* utiliza-se de outro mecanismo. Uma vez dentro do organismo do hospedeiro, a micobacteria se depara com um ambiente tuberculostático, pois em processos infecciosos grande parte do ferro circulante é absorvido no fígado, baço ou encontra-se complexado a proteínas como as lactoferritinas e ferritinas. O *M. tuberculosis* além de conseguir obter ferro ao secretar micobactinas que sequestram o metal dessas proteínas circulantes também captam ferro de hemoglobina por um mecanismo ainda desconhecido (KOUL et al, 2011; KOO et al, 2012).

O *M.tuberculosis* H37Rv é uma cepa bem caracterizada e com genoma totalmente sequenciado. Possui quantidade de sequencias de inserção (IS) e cerca de 90% do seu aparato genético codifica enzimas relacionadas à síntese e manutenção da parede celular micobacteriana. Por ser um micro-organismo que não apresenta fatores de virulência bem característicos de outras espécies de bactérias como, por exemplo, fímbrias, pesquisadores sugerem que a capacidade de manter-se dormente bem como ser virulento se dá pela codificação de genes relacionados ao metabolismo das micobactérias.

A cepa Beijing é uma linhagem da espécie *Mycobacterium tuberculosis* que foi primeiramente relatada em 1995 e se caracteriza por apresentar alta virulência, resistência à antibioticoterapia, disseminação, transmissibilidade como também ser tolerante a ativação do sistema imune do hospedeiro induzido pela vacina BCG (Wada et al., 2008). Além disso, esta linhagem está muito relacionada com a presença de surtos da doença ao redor do mundo e ao aumento da morbidade e/ou mortalidade entre pacientes HIV positivo (Wada et al., 2008; Jiang et al., 2009). A facilidade de disseminação desta cepa continua desconhecida e, por esta razão, a compreensão da interação do patógeno com a célula hospedeira e sua contribuição para o desenvolvimento da doença torna-se requisito indispensável para controle efetivo da tuberculose.

1) OBJETIVO GERAL

Analisar o comportamento da via metabólica do ferro de macrófagos infectados com micobactérias, que apresentam perfis de virulência diferentes, num determinado tempo de infecção, com o intuito de entender melhor os mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da Tuberculose.

2.1 Objetivos específicos

- Analisar e comparar a expressão de mRNA dos genes relacionados ao metabolismo do ferro de macrófagos infectados com a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1471 nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção com ou sem suplementação de ferro;
- Avaliar o crescimento intramacrofágico das micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção;
- Determinação da concentração de ferro do sobrenadante dos macrófagos infectados com as micobactérias escolhidas para este estudo no decorrer dos tempos de infecção pré-determinados;
- Avaliar e correlacionar os níveis de transcritos de citocinas e dos genes relacionados ao metabolismo do ferro de macrófagos infectados com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção com ou sem suplementação de ferro;
- Analisar e comparar os níveis proteicos de citocinas de macrófagos infectados com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 nos tempos 24, 48 e 72 horas após a infecção com ou sem suplementação de ferro;

2) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção e cultivo das Micobactérias

Foram escolhidas para este estudo a cepa de referência *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294) e o isolado clínico *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1471 que são mantidas na Micobacterioteca do Laboratório de Biologia Molecular aplicada ao diagnóstico. Todo o procedimento que envolveu a manipulação de micobactérias foi realizado dentro do laboratório de nível de segurança biológica 3 do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo com a autorização e supervisão do responsável, Professor Doutor Mário Hiroyuki Hirata, seguindo as normas de Biossegurança local (HIRATA M., HIRATA D.C.R, MANCINI J., Manual de Biossegurança, 2ª ed., 2012) e as condutas de Boas Práticas Microbiológicas descritas no Manual de Biossegurança para laboratórios da Tuberculose da Organização Mundial da Saúde (www.who.int).

As colônias de micobactérias mantidas em meio de cultura Middlebrook 7H10 (Difco, Detroid, MI) suplementado com solução de enriquecimento OADC (10%) (5 gramas de Albumina bovina fração V, 2 gramas de glucose, 0,85 gramas de cloreto de sódio, 0,05 gramas de ácido oleico e 4 miligramas de catalase) foram coletadas com o auxílio de uma alça bacteriológica e colocadas em um tubo estéril de polipropileno de fundo cônico de 15 mL (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) contendo pérolas de vidro de 3 mm previamente autoclavadas e 5 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco, Detroid, MI, EUA). A cultura micobacteriana foi agitada no vórtex por 1 minuto, submetida no banho de ultrassom (Ultrasonic Max Cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto e agitada novamente no vórtex por mais 1 minuto para desfazer os grumos de micobactérias (referência). Após este procedimento, 1 mL desta suspensão micobacteriana foi adicionada em 9 mL de meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco, Detroid, MI) suplementado com a solução de enriquecimento OADC (10%) (5 gramas de Albumina bovina fração V, 2 gramas de glucose, 0,85 gramas de cloreto de sódio, 0,05 gramas de ácido oleico e 4 miligramas de catalase) e 0,05% de Polissorbato 80 (Tween 80[®]), sob agitação constante (160 rpm) a 37°C. Após 7-10 dias de cultivo, 10 mL da cultura de micobactérias foi adicionada em 90 mL de meio de cultura fresco e

incubada por mais 7-15 dias até atingir fase log de crescimento (densidade óptica (D.O) medida em um comprimento de onda de 600 nm entre 0.5-0.8) para proceder à infecção em macrófagos.

3.2) Cultivo e ativação de células monocíticas THP-1 *in vitro*

As células de linhagem monocítica humana utilizadas neste estudo pertencem ao banco de células do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada ao Diagnóstico. Testes para detecção de bactéria e fungo foram realizados para assegurar a ausência de contaminação que poderiam inviabilizar a utilização da linhagem celular.

3.2.1) Descongelamento de células monocíticas

Um criotubo mantido em nitrogênio líquido foi retirado e incubado em banho maria (Quimis LTDA, São Paulo) a 37°C até completo descongelamento das células. Após o descongelamento, as células foram transferidas para um tubo estéril do tipo Falcon de 15 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) contendo 10 mL de meio RPMI – 1640/R4130 ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 2 g/L de Bicarbonato de sódio) e centrifugado por 10 minutos a 1.000 rpm (Centrífuga Eppendorf (Hamburgo, Alemanha), modelo 5804R) a 37°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 10 mL de meio RPMI – 1640/R4130 ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 2 g/L de Bicarbonato de sódio), transferido para uma garrafa de cultura celular de 25 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça) e armazenadas em incubadora de CO₂ (série 8000 WJ, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C e 5% de saturação de CO₂, para adaptação e multiplicação celular.

3.2.2) Manutenção das culturas de THP-1

A manutenção da cultura se baseia na diluição do volume de células presentes na garrafa. Dessa forma, após o período de adaptação que dura, em média, cerca de 3-5 dias, dependendo da concentração de células, da fase de crescimento e do estágio do

ciclo celular na qual as mesmas foram congeladas, a cultura é transferida para uma garrafa de cultura celular de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Suíça), contendo meio RPMI – 1640/R4130 ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 2 g/L de Bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 100 UI/mL de Penicilina G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)). A adição dos antimicrobianos previne a contaminação de bactérias no meio de cultura durante a sua manipulação.

As trocas de meio de cultura foram realizadas periodicamente até obter o volume desejado de células (a cada 2 dias ou quando houver necessidade para não ultrapassar a capacidade máxima de células dentro da garrafa, que pode acarretar na morte por deficiência de nutrientes e acidificação do meio de cultura) e foram mantidas em cultura por um período máximo de 2 semanas ou entre 3-6 passagens até o momento da infecção.

3.2.3) Congelamento das células THP-1

Para manutenção dos estoques e a preservação dessa linhagem no laboratório, o congelamento se faz necessário. A fase ideal para congelamento é a fase de crescimento exponencial das células, pois permite melhor viabilidade, estabilidade genética e fenotípica da linhagem estudada (ATCC, 2014). Após avaliação morfológica ao microscópio óptico e a verificação da presença de microrganismos na cultura, a concentração de células viáveis foi determinada com o auxílio da câmara de Neubauer. A cultura foi transferida para um tubo estéril do tipo Falcon de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) e centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm a 37°C (Centrífuga Eppendorf (Hamburgo, Alemanha), modelo 5804R). Após a etapa de centrifugação, foi retirado o sobrenadante e o precipitado foi ressuspendido com meio de cultura criopreservante (RPMI 1640/4130 suplementado com 20% de SFB (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 10% de Dimetilsufóxido (DMSO)). A suspensão contendo cerca $1-5 \times 10^6$ células/mL foi aliqotada em criotubos e armazenadas a -20°C por 2 horas, -80°C por 24 horas e posteriormente mantidas por tempo indeterminado em nitrogênio líquido.

3.2.4) Diferenciação das células THP-1 em macrófagos

Para a diferenciação das células THP-1 foi utilizado acetato de forbol miristato (PMA – sigla em inglês para *phorbol miristate acetate* - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

As células após atingirem um número desejado foram transferidas para tubos do tipo Falcon de 50 mL (TPP, Trasadingen, Suíça) e centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm a 37°C (Centrífuga Eppendorf (Hamburgo, Alemanha), modelo 5804R). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi suspenso em meio RPMI – 1640/R4130 ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 2 g/L de Bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 100 UI/mL de Penicilina G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)) contendo 30 ng/mL de PMA.

As células estavam numa concentração de aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/mL e foram colocadas em placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça). As placas permaneceram na incubadora de CO₂ (série 8000 WJ, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) a 37°C e 5% de saturação de CO₂ por 24 horas. Após este período de incubação, o meio de cultura foi trocado por outro fresco sem a presença de PMA e mantidos novamente na incubadora por mais 72 horas para descanso.

Esse período de descanso permite que as células aumentem sua capacidade fagocítica, a expressão de marcadores de superfície celular e a produção de citocinas, adquirindo um perfil semelhante aos macrófagos teciduais humanos (Daigneault M., et al, 2010).

3.3) Infecção das células THP-1 com *Mycobacterium tuberculosis*

As células THP-1 ativadas foram infectadas com a cepa H37Rv e com o isolado clínico Beijing 1471 de *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) numa razão 10:1 bactéria:macrófago (MOI). Primeiro, a quantidade de micobactérias foi padronizada através da leitura da densidade óptica da suspensão bacteriana em espectrofotômetro (Hitachi, modelo U-1100), no comprimento de onda de 600 nm, após incubação da amostra em banho de ultrassom (Ultrasonic Max Cleaner 800 – UNIQUE) por 1 minuto e descanso de 10 minutos para evitar a formação de aerossol após abertura do tubo e para sedimentação dos grumos de bactérias. Segundo, após a leitura, foi utilizada a seguinte relação para determinação da concentração de micobactérias (AMARAL, 2011) e a quantidade de micobactérias a ser adicionada na cultura de células:

D.O 0,1 ~ 10⁷ bacilos

O mesmo procedimento foi feito para as placas com cultura de macrófagos que foram incubadas com citrato férrico amoniacal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) numa concentração final de 500 µM, 3 horas antes do momento da infecção. Após 24 horas de infecção, todas as placas foram lavadas 3 vezes com solução tampão fosfato salino (PBS – nome inglês para *Phosphate Buffered Solution* – 8 gramas de NaCl, 0,2 gramas de KCl, 1,44 gramas de Na₂HPO₄, 0,24 gramas de KH₂PO₄, pH 7,4 para 1 litro de solução) e mantidas em meio RPMI – 1640/R4130 ((Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, EUA), 2 g/L de Bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de Gentamicina (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) e 100 UI/mL de Penicilina G (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)), sem e com suplementação com ferro para extração de RNA total dos macrófagos.

3.4) Extração de RNA total de macrófagos

Os macrófagos foram lavados 3 vezes com solução tampão fosfato salino (PBS – 8 gramas de NaCl, 0,2 gramas de KCl, 1,44 gramas de Na₂HPO₄, 0,24 gramas de KH₂PO₄, pH 7,4 para 1 litro de solução), tratado previamente com Dietilpirocarbonato (DEPC – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), para eliminação de micobactérias que não foram fagocitadas.

O mRNA foi obtido a partir da extração do RNA total dos macrófagos controles (não infectados) e macrófagos infectados com as micobactérias *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e a *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1471, utilizando o kit de extração *RNeasy Plus Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Todo o procedimento foi realizado conforme as especificações sugeridas pelo fabricante. A pureza e quantificação das amostras foram feitos pelo aparelho NanoDrop® ND1000 (versão 3.3, EUA) e a integridade foi avaliada pelo equipamento Bioanalyzer 2100 (RNA 6000 Nano Ship). As amostras foram incubadas em gelo seco imediatamente após a extração e armazenadas por tempo indeterminado em freezer -80°C para conservação do material extraído.

3.5) Quantificação da expressão gênica pela RT-PCR em tempo real

Para a quantificação da expressão dos genes descritos na tabela 1.0 foram obtidos cDNA a partir do mRNA por Transcrição reversa seguido da amplificação pela reação em cadeia da Polimerase (RT-PCR). O sistema de amplificação escolhido foi o *TaqMan® Gene Expression* (Applied Biosystems, Foster City, CA) que se baseia na utilização de oligonucleotídeos específicos marcados com fluoróforos (sondas) nas extremidades, sendo que na extremidade 5' está acoplado o fluoróforo emissor de fluorescência (*Reporter*) enquanto que na extremidade 3' está um fluoróforo bloqueador (*Quencher*) que impede a emissão de fluorescência do *Reporter*. No momento da extensão, o par de iniciadores da reação de PCR (*primers*) e a sonda estão hibridizados na fita molde, permitindo o início da amplificação, na direção 3'-5' de uma fita complementar pela enzima *Taq* Polimerase. Esta enzima possui atividade 5' exonucleásica, que clivará a porção 5' da sonda hibridizada na fita molde, permitindo, dessa forma, a liberação do sinal de fluorescência do *Reporter* e a sua detecção em tempo real pela plataforma de detecção 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Tabela 1 Genes relacionados ao metabolismo do ferro em humanos

Gene	Nº de acesso (NCBI) ¹	Assay ID ²
<i>LCN2</i>	3934	Hs01008571_m1
<i>TFR2</i>	7036	Hs01056398_m1
<i>SLC40A1</i>	30061	Hs00205888_m1
<i>HAMP</i>	57817	Hs00221783_m1
<i>SLC11A1</i>	6556	Hs01105516_m1
<i>TFRC</i>	7037	Hs00951083_m1

3.5.1) Síntese de cDNA

A transcrição reversa das amostras de mRNA foi feita com o kit RT2 *First Strand* (Qiagen, Strassen Hilden, Alemanha). O procedimento consiste na eliminação de DNA genômico presente nas amostras, utilizando o reagente GE2 (incubação das amostras a 37°C por 5 minutos), posterior síntese da fita de cDNA utilizando a enzima

¹ Código de identificação dos genes disponíveis para consulta no site: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>

² Código de identificação dos ensaios *TaqMan® single-tube Gene Expression assays* disponíveis para consulta no site: <http://www.lifetechnologies.com>

Transcriptase reversa MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) e incubação das amostras em termociclador com a seguinte programação de temperatura: 42°C por 15 minutos, 95°C por 5 minutos. Ao término da síntese, foram adicionados aos tubos contendo as amostras 91 uL de água livre de RNase e armazenados em freezer -20°C até o momento do uso.

3.5.2) Análise da expressão gênica

3.5.2.1) Genes relacionados ao metabolismo do ferro

Para a reação de amplificação dos genes do macrófago foi utilizado *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix* e ensaios customizados *Taq Man*® *Gene Expression Assays* (Life Technologies, São Paulo, SP, Brasil) que foram fornecidos em solução 2 vezes e 20 vezes concentradas, respectivamente. Para o ensaio de PCR em tempo real, os reagentes estavam concentrados 1 vez e 10 ng de cDNA foi utilizado para um volume final de 10 uL. Para amplificação dos genes endógenos foram utilizados 300 nM dos iniciadores (Prodinol/MWG Biotecnologia™, Minas Gerais, Brasil), 250 nM de sonda de detecção marcadas com FAM™ (fluorófulo-6-carboxifluoresceína) e a enzima *AmpliTaq Gold*® *DNA Polymerase* para um volume final de reação igual a 10µL. Foi utilizado o software de análise Genorm - <http://medgen.ugent.be/genorm> - para selecionar o mais estável dentre os seis genes endógenos de referência [ubiquitina C (UBC), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPD), beta-2-microglobulina (B2M), Hipoxantina fosforribosil-transferase I (HPRTI), complexo succinato desidrogenase, subunidade A (SDHA) e hidroximetilbilano sintetase (HMBS)]. A quantidade de cDNA utilizada nos ensaios de amplificação foi determinada por meio de uma curva padrão realizada com diferentes concentrações da amostra. Esse procedimento é indispensável, pois permite avaliar a linearidade e a eficiência da reação. A quantificação relativa dos RNAs mensageiros dos genes descritos na Tabela 1 foi calculada utilizando o método comparativo Ct (ciclo em que a fluorescência emitida pelo produto amplificado ultrapassa o limite de detecção (*Threshold*) do equipamento). Assim, as análises de expressão do mRNA dos genes foram realizadas com base na fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak e Schmittgen, 2001), onde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ amostras} - \Delta Ct \text{ do controle}$ (utilizado como calibrador). E $\Delta Ct = Ct \text{ do gene alvo} - Ct \text{ do gene endógeno}$. Genes de referência ou *housekeeping* genes são úteis para normalizar a quantidade de cDNA inseridas no ensaio, diminuindo as variações de expressão gênica devido a erros na padronização da quantidade de amostra inseridas no sistema (Applied Biosystems, 2008).

3.5.2.2) Outros genes relacionados a imunidade celular

Genes que codificam proteínas relacionadas ao reconhecimento de patógenos, processo de morte celular e citocinas foram avaliados neste estudo utilizando o kit *RT² Profiler PCR Array* e *RT² SYBR Green Mastermix* (Qiagen, Strasse, Hilden, Alemanha). Esses ensaios permitem avaliar grupos de genes relacionados a uma doença ou via metabólica utilizando os princípios e a tecnologia de PCR em tempo real. Os ensaios são fornecidos em placas de 96 poços contendo os oligonucleotídeos iniciadores dos genes de interesse, cinco genes endógenos (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH; *Ubiquitin*, UBC; *Homo sapiens succinate dehydrogenase complex*, SDHA; *Beta-2-microglobulina*, B2M e *Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*, HPRT-1), um controle de DNA genômico, três controles de Transcrição reversa, e três controles positivos. O *Mastermix* é fornecido separadamente e adicionado na placa juntamente com a amostra no momento do uso. Para a síntese de cDNA foi utilizado o mesmo procedimento descrito no item 1.5.1 e as condições da reação de PCR foram as descritas a seguir: 10 minutos a 95°C; 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C. A análise de qualidade dos dados e a quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas conforme recomendações do fabricante (*RT² Profiler PCR Array Handbook*. Qiagen, 2013).

3.6) Contagem de micobactérias fagocitadas

Para determinar a quantidade de micobactérias fagocitadas e o crescimento dentro de macrófagos humanos, foi utilizado o protocolo descrito por Theus e colaboradores (2007), com algumas modificações. As células THP-1 ativadas foram lavadas 3 vezes com solução tampão fosfato salino (PBS – nome inglês para *Phosphate Buffered Solution* – 8 gramas de NaCl, 0,2 gramas de KCl, 1,44 gramas de Na₂HPO₄, 0,24 gramas de KH₂PO₄, pH 7,4 para 1 litro de solução) a 37°C para retirada de micobactérias presentes no sobrenadante. Após este procedimento foi adicionado 1 mL de Triton X-100 a 1% para lise dos macrófagos infectados e liberação das micobactérias intracelulares. Em seguida, diluições seriadas decimais foram feitas em PBS 1X e alíquotas de 10 µL em triplicatas foram colocadas em placas com meio de cultura Middlebrook 7H10 (Difco, Detroit, MI) suplementado com solução de enriquecimento OADC (10%) (5 gramas de Albumina bovina fração V, 2 gramas de glucose, 0,85 gramas de cloreto de sódio, 0,05 gramas de ácido oleico e 4 miligramas de catalase) e incubadas a 37°C. A determinação de unidades formadoras de colônia (UFC) foi

calculada nos tempos pré-determinados após a infecção (24h, 48h e 72h) depois de 20 – 30 dias (período necessário para o aparecimento de colônias visíveis a olho nu no meio de cultura).

3.7) Dosagem de ferro no sobrenadante das culturas de células

A quantificação do ferro no sobrenadante das culturas de células controles e infectadas foi determinada pelo método de espectrofotometria de absorção atômica (EAA; AAnalyst 100, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), empregando-se lâmpadas de catodo oco no comprimento de onda (λ) 248,3 nm, fenda de 0,2 nm e chama: ar acetileno. As curvas padrão foram preparadas a partir de soluções padrão (Tritisol, Merck, Darmstadt, Alemanha) segundo as normas da AOAC (1995). Estas determinações foram realizadas sob orientação da Profa Celia Colli do Departamento de Alimentos e Nutrição experimental da FCF-USP

Todos os materiais utilizados nos experimentos eram descartáveis ou foram desmineralizados a fim de anular a interferência de ferro dos materiais.

3.8) Avaliação de viabilidade celular

Para avaliar a porcentagem de morte das culturas de células foi utilizado o método de coloração com Brometo de etídeo (BE) e Laranja de acridina (LA). Este método permite quantificar e avaliar morfológicamente células viáveis ou mortas a partir da incorporação e interação desses corantes com o material nucleico celular (Ribble et al, 2005).

As células THP-1 ativadas foram incubadas em placas de 6 poços (TPP, Trasadingen, Suíça) numa concentração de aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células/mL em 2 mL de meio de cultura/poço e infectadas com as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 por 24 horas com ou sem adição de citrato férrico amoniacal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Para a incorporação dos corantes foi preparado uma solução estoque de laranja de acridina (50µg/mL) e Brometo de etídeo (50µg/mL) que foram posteriormente misturadas numa proporção 1:1 para obter uma solução concentrada de 25µg/mL de cada composto. Desta última solução elaborada (LA/BE) foi adicionado cerca de 10% do volume existente na placa de cultura, ou seja, foi incubado aproximadamente 220µL da solução LA/BE em cada poço, obtendo assim uma concentração final de 2,5µg/mL. O conteúdo foi homogeneizado por 1 minuto e a leitura realizada no microscópio invertido de

fluorescência (Nikon Eclipse, Japão) com os filtros FITC/PE. O experimento foi realizado em triplicata, as imagens foram visualizadas pela objetiva de 20X e capturadas em 10 campos.

3.9) Dosagem de proteínas

O sobrenadante das culturas de células ativadas THP-1 controles e infectados com as cepas *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 foram coletadas e filtradas (microtubos com membrana de acetato de celulose com poros de espessura 0.22 μm para centrifugação, Costar[®] Spin-X[®], Corning Incorporated Life Science, Amsterdam, Holanda) e armazenados em -80°C até o momento da utilização. A quantificação das proteínas MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1, IL-1RA, IL-1 β , IL-1 α , IL-10, IL-17, IL-2, IL-4, IL-8, IL-6 e TNF- α no sobrenadante foi determinada por meio da tecnologia Luminex xMAP[®] (Luminex Corporation, Texas, EUA) com a utilização do Kit Fluorokine[®] MAP multiplex (R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA) e o sistema de detecção Luminex[®] 100TM (Luminex Corporation, Texas, EUA). Esta tecnologia baseia-se na utilização de microesferas (5.6 μm) de poliestireno que são internamente coradas com dois fluorocromos distintos em termos espectrais. A quantidade e intensidade de cada fluorocromo permite identificar precisamente um grupo de microesferas, obtendo assim um código de identificação espectral único. A presença de um terceiro fluorocromo ligado a uma molécula *repórter* em sua superfície permite quantificar a interação biomolecular do analito. O sistema utilizado é semelhante ao citômetro de fluxo onde as microesferas são carregadas em meio líquido, alinhadas e detectadas individualmente através da interação dos fluorocromos com dois feixes de luz (laser) que permitem identificar (laser vermelho $\lambda = 635 \text{ nm}$) e quantificar (laser verde $\lambda = 532 \text{ nm}$) moléculas de interesse. Devido alta precisão e sensibilidade, esse sistema permite identificar num único ensaio até 100 analitos diferentes (Dunbar, 2005).

3.10) Análise estatística

Os resultados da expressão gênica relativa, dosagem de ferro e dosagem de proteínas correspondem à média e desvio padrão. A viabilidade celular está representada em número absoluto de células mortas. Os experimentos foram feitos em triplicata biológica e os testes aplicados para avaliar diferença estatística entre os grupos

de estudo foram realizados no software *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, Inc – La Jolla, CA, EUA).

3) Resultados

4.1) Análise de expressão gênica

4.1.1) Escolha dos genes endógenos

Conforme descrito no item 1.5.2, cinco genes endógenos foram analisados quanto à estabilidade de expressão gênica nas diferentes amostras testadas. Para tal análise, foi utilizado o software *Genorm*[®] que é uma ferramenta utilizada para determinação de genes de referência que são necessários para normalização de expressão gênica relativa nas reações de RT-PCR em tempo real. O programa tem formato semelhante ao Excel onde são tabulados os valores de Ct das amostras estudadas. Com auxílio de algoritmos matemáticos, o programa solta os resultados no formato gráfico, mostrando os genes que foram considerados mais estáveis. A figura 1 abaixo mostra os resultados obtidos com as amostras propostas neste estudo:

Figura 2 Determinação de genes estáveis utilizando o programa *Genorm*

Após a análise do resultado gerado, optou-se pelos genes *UBC* e *SDHA* para normalização dos valores de Ct dos genes de interesse.

4.1.2) Expressão dos genes relacionados ao metabolismo do ferro

A expressão dos genes listados na tabela 1 está representada nas figuras 2-5 abaixo. Foram comparados as amostras infectadas com a cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico hipervirulento *Mycobacterium tuberculosis* Beijing 1471 sem e com suplementação de ferro em relação às amostras não infectadas.

Figura 3 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *HAMP* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (A) e com suplementação de ferro (B). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

Figura 4 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *SLC11A1* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (C) e com suplementação de ferro (D). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo que $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{amostra\ teste} - \Delta Ct_{amostra\ calibradora}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

E

F

Figura 5 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *SLC40A1* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (E) e com suplementação de ferro (F). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra\ teste}} - \Delta C_{t_{amostra\ calibradora}}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

G

H

Figura 6 – Representação gráfica da expressão relativa do gene *TFRC* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem suplementação de ferro (G) e com suplementação de ferro (H). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra\ teste}} - \Delta C_{t_{amostra\ calibradora}}$; * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

Figura 7 - Expressão relativa do gene *TFR2* nos macrófagos infectados com as micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv sem e com suplementação de ferro (I). Valores comparados pelo teste *Two-way ANOVA* e pós-teste de *Bonferroni*. Expressão gênica calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo que $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra\ teste}} - \Delta C_{t_{amostra\ calibradora}}$. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$.

O Gene *HAMP* apresentou um perfil semelhante de expressão entre os tratamentos com aumento gradativo no decorrer do tempo. Houve diferença estatística entre as duas infecções nos tempos 48h e 72h após a infecção sem o tratamento com citrato férrico amoniacal e nas infecções em que ocorreu a suplementação com ferro houve aumento significativo nos tempos 24h e 48h após infecção (figura 3).

Com relação ao gene que codifica a proteína NRAMP1, *SLC11A1*, as infecções com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 demonstrou aumento significativo da expressão gênica tanto com relação à infecção com a cepa padrão, *M. tuberculosis* H37Rv, quanto com o controle não infectado, apresentando aumento 3 vezes e 6 vezes maior, respectivamente no tempo 72h sem tratamento.

Nas amostras sem tratamento houve redução da expressão do gene *SLC40A1* nos tempos 24h e 72h das infecções com relação ao controle não infectado, enquanto que nas amostras com tratamento houve diferença estatística entre as infecções nos tempos 24h e 72h (figura 5).

Os receptores de transferrinas TFRC e TFR2 tiveram a expressão do mRNA diminuída em relação ao controle não infectado e com variações mínimas no decorrer do tempo nas culturas infectadas tratadas com citrato férrico amoniacal. O gene *TRF2* não amplificou nas amostras infectadas com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 tanto com ou sem tratamento com ferro (figuras 6 e 7).

4.1.3) Expressão dos genes relacionados a resposta imune celular

Alguns genes que codificam proteínas relevantes na resposta do macrófago contra patógenos intracelulares profissionais foram também avaliadas neste estudo com o intuito de compreender melhor o processo patológico das infecções com *M. tuberculosis* nos diferentes tratamentos. A seguir está representada a quantificação relativa dos genes escolhidos para este estudo:

H.1 **H.2** **I.1** **I.2** **J.1** **J.2**

S.1 **S.2** **T.1** **T.2** **U.1** **U.2**

Figura 8 Representação gráfica do perfil de genes (A.1-X.2) após infecção com micobactérias nos tempos 24, 48 e 72 horas com e sem suplementação com ferro. Os valores descritos correspondem à média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *Two way ANOVA* e teste de comparação múltipla de Bonferroni. Foi adotado nível de significância ($p \leq 0.05$); (*) = $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$.

Os genes representados na figura 8 foram normalizados com a média geométrica dos cinco genes endógenos descritos no item 1.5.2.2 e foram utilizados como calibradores da reação os controles 24, 48 e 72 horas sem tratamento com citrato férrico amoniacal. Os genes *AKT-1*, *BAX*, *BCL-2*, *CASPASE 3* não apresentaram diferença estatística entre as infecções com *M. tuberculosis* H37Rv e o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 nas amostras tratadas com ferro (figuras 8A, 8B, 8C, 8D). Já a transcrição do gene *IL12A* foi induzida seis vezes mais nas infecções com a micobactéria 1471 quando comparadas com a micobactéria H37Rv no tempo 48 horas após infecção das culturas tratadas com ferro (figura 8I). O gene *IL12B* foi expresso 15 vezes mais nos macrófagos infectados com H37Rv que nos macrófagos infectados com a Beijing 1471 (figura 8J). Os genes *TLR1* e *TLR6* não apresentaram variação de expressão gênica entre as infecções e no decorrer do tempo de infecção (figuras 8R, 8S). Esses resultados demonstram que existe uma resposta imunomodulatória dos macrófagos diferente entre os tratamentos, podendo estimular a expressão de genes anti-apoptóticos e pró-inflamatórios quando tratadas com ferro o que ativa a proliferação de micobactérias e a morte celular não programada dos macrófagos infectados.

4.2 Contagem de micobactérias intracelulares

O crescimento de micobactérias dentro de macrófagos humanos também foi avaliado neste estudo com o intuito de verificar se o tratamento influencia na proliferação dos bacilos dentro de macrófagos. Após 24 horas de infecção, as micobactérias se proliferam e mantiveram o crescimento estabilizado ao longo do tempo de infecção tanto nas culturas com ou sem tratamento. Isso implica dizer que a suplementação do ferro nas culturas infectadas não influencia na capacidade de crescimento das micobactérias em macrófagos humanos cultivados *in vitro*. As figuras 9 A e 9B abaixo demonstram curso de crescimento de micobactérias ao longo do tempo em macrófagos humanos sem e com tratamento com citrato férrico amoniacal, respectivamente:

Figura 9 Recuperação de micobactérias fagocitadas nos tempos 24, 48 e 72 horas com (B) e sem suplementação (A) com ferro em macrófagos ativados. Os valores estão representados como média e desvio padrão. Não houve diferença estatística entre as infecções e ao longo do tempo.

4.3 Dosagem do ferro no sobrenadante

Diante do fato que a presença de ferro pode alterar a expressão de proteínas responsáveis pela ativação da resposta imunológica frente a uma infecção foi sugerida neste estudo a quantificação do ferro existente no sobrenadante das culturas de células infectadas e não infectadas. Para isso foi utilizado a tecnologia de espectrometria de absorção atômica por chama que tem como princípio básico a mensuração da energia radiante absorvida do átomo de ferro após a estimulação com uma fonte luminosa (Krug, Nóbrega e Oliveira, 2004). As amostras utilizadas para este procedimento foram previamente filtradas para reter as micobactérias que estavam presentes no sobrenadante e armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso. Uma curva padrão linear foi construída com os seguintes pontos/valores estipulados:

Tabela 2 Valores utilizados para construção de curva padrão linear para dosagem do ferro

Pontos da curva (µg/mL)	Absorbância ($\lambda = 248,3$)
0,2	0,007
0,3	0,013
0,5	0,018
1,0	0,035
2,0	0,064
3,0	0,094
5,0	0,164

Figura 10 Representação gráfica da curva padrão linear e equação da reta formulada para esta metodologia

A solução calibradora utilizada neste experimento foi o meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Aldrich) suplementado com soro fetal bovino (Gibco). Foram analisadas pelo menos três amostras de cada tempo de infecção e tratamento com citrato férrico amoniacal. Não foi possível detectar por meio desta metodologia a presença de ferro no sobrenadante das células não infectadas e não tratadas com ferro. As amostras infectadas sem tratamento com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv não apresentaram variação na concentração de ferro no sobrenadante ao longo do tempo enquanto que as amostras infectadas com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 demonstrou

oscilações na concentração de ferro no decorrer do tempo e com relação à infecção com a cepa padrão (H37Rv) no tempo 72 horas, conforme representado na figura 11.

Figura 11 Representação gráfica da concentração de ferro no sobrenadante das culturas celulares não tratadas com citrato férrico amoniacal no decorrer do tempo. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Foi adotado nível de significância $p \leq 0.05$; (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$.

A detecção de ferro no sobrenadante das amostras tratadas com 500 µM de ferro foi confirmada tanto nas células não infectadas quanto nas células infectadas (figura 12). A quantidade de ferro livre no sobrenadante foi em média 20 µg/mL para todas as amostras o que demonstra que a incubação de citrato férrico amoniacal foi homogênea, entretanto, não houve diferença estatística da concentração deste metal ao longo do tempo e entre as células infectadas e não infectadas.

Figura 12 Representação gráfica da quantificação de ferro nas amostras tratadas com 500 µM de citrato férrico amoniacal.

4.4 Viabilidade celular após infecção com *M. tuberculosis*

A quantificação das células infectadas com a *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 foi determinada por meio da técnica de coloração com

Laranja de Acridina e Brometo de etídeo. Nas amostras não tratadas foi possível observar que no tempo 24 horas após a infecção a morte de macrófagos infectados foi maior comparado ao controle não infectado. No tempo 48 e 72 horas após a infecção a morte dos macrófagos infectados com o isolado clínico Beijing 1471 foi maior quando comparado com o controle e com a infecção com H37Rv (figuras 14 e 15). Nas amostras tratadas com citrato férrico amoniacal o perfil de morte foi semelhante com as amostras não tratadas com exceção do tempo 24 horas no qual não houve diferença estatística entre a infecção com *M. tuberculosis* H37Rv e o controle não infectado (figura 13). As ilustrações coradas com Laranja de acridina (LA) representam células vivas enquanto que células coradas com Brometo de etídeo (BE) representam células mortas (necrose). MERGE refere-se à intercalação dos dois corantes.

Figura 13 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$; Setas incompletas (↷) corresponde a células viáveis, setas completas (⇨) representam células em fase de morte prematura e setas incompletas preenchidas (➤) representam células mortas.

A

Tempo 48 horas

B

Figura 14 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. **A)** Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. **B)** Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$. Setas incompletas (▤) correspondem a células viáveis e setas incompletas preenchidas (▴) representam células mortas.

Figura 15 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. **A)** Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. **B)** Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *Kruskal Wallis* e pós-teste de Dunn; (*) = $p \leq 0.05$; (***) = $p \leq 0.001$. Setas incompletas (▬) correspondem a células viáveis e setas incompletas preenchidas (▬) representam células mortas.

A

Tratamento com citrato férrico amoniacal [500 μ M] – Tempo 24 horas

B

Tratamento com ferro [500 μ M]

Figura 16 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. A) Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. B) Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$; (**) = $p \leq 0.01$. Setas incompletas (□*) correspondem a células viáveis e setas incompletas preenchidas (■) representam células mortas.

A Tratamento com citrato férrico amoniacal [500 μ M] – Tempo 48 horas

B Tratamento com ferro [500 μ M]

Figura 17 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. **A)** Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. **B)** Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$. Setas incompletas ( ) correspondem a células viáveis e setas incompletas preenchidas ( ) representam células mortas.

Figura 18 Viabilidade das células THP-1 após infecção com as Micobactérias *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 tratadas com citrato férrico amoniacal. **A)** Microfotografia das células marcadas com Laranja de acridina (LA) e Brometo de etídeo (BE), visualização 20X. **B)** Representação gráfica da morte celular após a infecção. Estão representados a média e desvio padrão. Foi aplicado o teste *One way ANOVA* e pós-teste de Bonferroni; (***) = $p \leq 0.001$. Setas incompletas (☐) correspondem a células viáveis e setas incompletas preenchidas (▣) representam células mortas.

4.5 Dosagem de proteínas importantes para imunidade celular

Foram determinadas as proteínas solúveis MIP-1 β , MIP-1 α , MCP-1, IL-1RA, IL-1 β , IL-1 α , IL-10, IL-17, IL-2, IL-4, IL-8, IL-6 e TNF- α que representam parte de um grupo de citocinas e quimiocinas importantes no processo inflamatório e infeccioso no sobrenadante das células não infectadas e infectadas com as micobactérias ao longo do tempo de infecção. As figuras 19-25 demonstram o perfil observado das proteínas com ou sem tratamento com citrato férrico amoniacal. Nota-se que o fator de necrose tumoral (TNF - α) estava presente em maior quantidade nas amostras infectadas com a cepa Beijing 1471 do que nas amostras infectadas com a cepa H37Rv e o controle não infectado, nas amostras sem tratamento com ferro no tempo 72 horas. Nas amostras tratadas, houve aumento significativo desta molécula nos tempos 48 e 72 horas após infecção nas amostras infectadas com a micobactéria Beijing 1471.

Figura 19 Representação gráfica da concentração de TNF alfa no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. Os valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Kruskal Wallis* e teste de comparação múltipla de *Dunn*. Foi adotado nível de significância de $p \leq 0.05$; (*) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

A Interleucina 6 (IL-6) demonstrou perfil diferente entre os tratamentos e com relação as infecções conforme representado nas figura 20. O nível de significância localizado acima das barras corresponde à diferença estatística das amostras infectas com relação ao controle não infectado:

Figura 20 Representação gráfica da concentração de IL-6 no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

As infecções com a cepa H37Rv mostrou alta concentração de Interleucina 8 no tempo 24 horas quando comparas as infecções com o isolado clínico hipervirulento Beijing 1471, enquanto que após o tratamento com citrato férrico amoniacal foi possível observar o aumento significativo dessas amostras em relação ao controle no decorrer do tempo de infecção (figura 21 A e B).

Figura 21 Representação gráfica da concentração de IL-8 alfa no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471, sem e com tratamento com citrato férrico amoniacal. Os valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Kruskal Wallis* e teste de comparação múltipla de *Dunn*. Foi adotado nível de significância de $p \leq 0.05$; (*) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

As Interleucinas (IL) 2, 4, 10 e 17 foram também avaliadas, entretanto, todas não demonstraram variação significativa quando comparadas entre si. Não foram detectados níveis de IL-2, IL-4 e IL-10 no sobrenadante das culturas sem tratamento.

Figura 22 Representação gráfica da concentração de IL2, IL4, IL10 e IL17 no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471. Estão representados média e desvio padrão. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

Figura 23 Representação gráfica da concentração de IL-1 α e IL-1 β no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

Figura 24 Representação gráfica da concentração de IL-1 RA e MIP-1 α no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

Figura 25 Representação gráfica da concentração de MCP-1 e MIP-1 β no sobrenadante das culturas infectadas com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471 sem ou com tratamento com ferro. Valores representam média e desvio padrão. Foi aplicado teste *Mann-Whitney* e adotado nível de significância $p \leq 0.05$. (**) = $p \leq 0.01$; (***) = $p \leq 0.001$. Figura A corresponde aos macrófagos infectados e não infectados sem tratamento com ferro. Figura B corresponde aos macrófagos infectados e não infectados com tratamento com citrato férrico amoniacal.

5. DISCUSSÃO

O ferro possui papel importante na fisiologia humana. Por ser um metal de transição, ele possui propriedades que auxiliam no processo de respiração celular, processos de oxirredução como também está presente em inúmeras proteínas que são essenciais para sobrevivência humana. Além disso, está correlacionado com proliferação, síntese de DNA e tem papel importante no sistema imune. Embora este elemento seja imprescindível para manutenção da integridade fisiológica, é necessário um controle intensivo da sua concentração no organismo. Isso acontece porque o ferro na sua forma oxidada é nocivo para os tecidos, pois promove a síntese de radicais livres que causam peroxidação lipídica e dano celular.

A importância do ferro não se restringe apenas para organismos complexos. Sabe-se que grande parte dos microrganismos utiliza o ferro como substrato para vários mecanismos intracelulares. Ao longo da evolução, observou-se que tanto microrganismos quanto seres humanos desenvolveram e aprimoraram sua maquinaria biológica para utilizar o ferro em benefício próprio. Como o ferro livre ao entrar em contato com o oxigênio leva ao predomínio da sua forma nociva oxidada, proteínas que acoplam este metal em sua estrutura e proteínas designadas apenas para estocar moléculas de ferro foram desenvolvidas.

A interação entre hospedeiro e patógeno invasor é objeto de discussão em vários núcleos de pesquisa científica, pois a compreensão dos eventos decorrentes desta relação podem fornecer respostas valiosas quanto à patogênese de determinadas doenças infecciosas e também servir de base para criação de novas alternativas terapêuticas. A Tuberculose está inserida neste grupo de doenças e a interação do seu agente etiológico (*M. tuberculosis*) e o hospedeiro humano é bastante discutida atualmente. Um dos primeiros obstáculos enfrentados pelo bacilo está na capacidade de se desvencilhar das ações deletérias promovidas por macrófagos alveolares. Os macrófagos representam uma população heterogênea de células mononucleadas que são capazes de responder aos estímulos do microambiente onde estão localizados. Como descrito na primeira seção deste trabalho, os macrófagos possuem papel importante no controle e homeostase do ferro nos seres humanos. A reciclagem de células sanguíneas, principalmente eritrócitos são de extrema importância para obtenção de ferro suficiente para o desenvolvimento de novas células pela medula óssea (Eritropoiese).

O surgimento de micobactérias hipervirulentas é um dos problemas que impedem o controle efetivo da Tuberculose atualmente. As cepas de micobactérias denominadas W/Beijing estão disseminadas em vários países e caracterizam-se por ativar resposta imune exacerbada em humanos culminando em morte prematura, principalmente em adultos saudáveis, como também afetam rigorosamente pacientes imunossuprimidos. Estudo realizado por Reddy e colaboradores (2012) demonstrou que o *M. tuberculosis* necessita de proteínas que estocam ferro para sobreviver em células humanas e a quantidade de ferro dentro de macrófagos podem interferir no curso da doença. Outro estudo conduzido por Olakanmi e colaboradores (2013) comprovou que o *M. tuberculosis* pode captar ferro acoplado às proteínas do hospedeiro para sobreviver dentro de endossomos. Os mecanismos moleculares induzidos por isolados clínicos de

M. tuberculosis em macrófagos humanos e a importância do ferro nesse microambiente é pouco estudado. Diante disso, o presente trabalho avaliou a transcrição de genes relacionados ao metabolismo do ferro em macrófagos humanos infectados com uma cepa padrão de micobactéria e um isolado clínico hipervirulento.

O sistema teste utilizado foi monócito da linhagem THP-1. Essa célula após ativação com forbol miristato acetato, 1α -dihidroxi-vitamina D3 ou Interferon gama (IFN- γ) adquire morfologia e propriedades semelhantes aos macrófagos teciduais e após estímulo com LPS ou outros componentes bacterianos promove a ativação de cascatas de sinalização que resultam na produção de citocinas e quimiocinas. Estudos anteriores afirmam que este modelo celular é útil para avaliar taxa de crescimento microbiano, fatores de virulência bacterianos e ativação de moléculas após contato com micobactérias (Riendeau e Kornfeld, 2003; Iona et al, 2012). Os monócitos ativados também foram tratados com citrato férrico amoniacal (CFA) que promove o acúmulo de ferro intracelular sem inviabilizar as células. Estudos realizados com Hirsh e colaboradores mostraram que o tratamento dessas células com CFA não danifica as membranas celulares, produz efeitos semelhantes ao ferro não ligado a transferrina, é importante para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro em culturas de células além de ser facilmente disponível e metabolicamente ativo.

Para avaliar o impacto do ferro nas infecções com micobactérias foram selecionados para este estudo os principais genes relacionados ao metabolismo do ferro em macrófagos: *SLC40A1*; *NRAMP-1*; *TfR1/TFRC*; *TfR2*; *HAMP* e *LCN2*.

Este estudo demonstrou que tanto na presença quanto na ausência de ferro nas culturas de células infectadas existe a indução da transcrição do gene *HAMP* ao longo do tempo. O gene *HAMP* codifica a proteína Hecpidina que possui atividade antimicrobiana e sua síntese é induzida frente ao processo inflamatório ou infeccioso. A interação da Hecpidina com domínios da proteína exportadora de ferro, Ferroportina, na membrana plasmática promove a internalização e degradação deste exportador evitando a liberação ferro. Existem alguns mecanismos que favorecem a ativação Hecpidina no qual podemos citar:

- A sensibilização de ferro no microambiente por proteínas responsivas ao ferro (IRPs), que vão ligar-se nas fitas de RNA mensageiro promovendo a transcrição dos genes relacionados ao armazenamento de ferro (ferritina) e diminuição da transcrição de genes relacionados aos receptores de Transferrina plasmática (TfR1/TfR2) que, por sua vez, irá interferir na expressão da hepcidina e sua interação na membrana plasmática (Nairz et al, 2014);

- Através da ativação da via de sinalização de um grupo de moléculas solúveis que pertencem a superfamília de fator de crescimento do tipo beta (BMP) que a princípio foram identificadas como proteínas que induzem a formação de osso e cartilagem, mas que agora são reconhecidamente fatores parácrinos e autócrinos multifuncionais que regulam uma gama de processos intracelulares (Nairz et al, 2014);

- A produção de Interleucinas (IL-1 e IL-6) induz a transcrição de Hecpidina a partir da ativação de cascatas de sinalização mediada por $\text{INF}\gamma$ e padrões moleculares de patógenos invasores (Nairz et al, 2014).

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese sugerida por Rodriguez e colaboradores (2013), mostrando que em macrófagos existe uma regulação autócrina de Hecpidina que eleva a retenção de ferro e diminuição da expressão de Ferroportina em macrófagos e que esse mecanismo ativa mais seletivamente a resposta celular frente a processos inflamatórios e infecciosos. Outra hipótese sugerida por Sow e colaboradores (2009) mostrou que a hepcidina não é induzida por IL-6, mas sim pela presença de $\text{INF}\gamma$ e micobactéria e que isso ocorre por meio da ativação por STAT1 e TLR2 e TLR4. Os mesmos autores demonstraram que a indução de hepcidina por micobactérias e $\text{IFN}\gamma$ ocorre a nível transcricional e envolve os fatores de transcrição STAT1, $\text{NF}\kappa\text{B}$ e EBP β . Essa indução do RNA mensageiro da hepcidina em macrófagos é dependente da ativação da cascata de sinalização que envolve os receptores do tipo *Toll-like* 2 e 4.

Este estudo mostra que há um aumento gradual da hepcidina ao longo do tempo e que o tratamento com citrato férrico amoniacal não interfere nessa expressão indicando que a via de sinalização utilizada neste fenômeno observado pode ser a descrita por Rodriguez e colaboradores (2013), isso porque nossos dados mostram que há uma cinética na indução da transcrição de hepcidina ao longo do tempo nas culturas de macrófagos infectados com *M. tuberculosis* Beijing 1471 e a produção de IL-1 α , IL-1 β e IL-6. Desta forma, podemos inferir que a infecção com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 promove alta produção de Hecpidina e baixa produção de Ferroportina, limitando desta maneira a excreção de ferro para fora do macrófago e aumentando a disponibilidade de ferro para a micobactéria. As infecções com *M. tuberculosis* H37Rv essa cinética não foi observada, pelo contrário, é possível verificar nas figuras 20 e 23 que ocorre uma redução dessas proteínas ao longo do tempo que pode acarretar na ativação de cascata de sinalização via TLR2/TL4 e fatores de transcrição $\text{NF}\kappa\text{B}$ 1, STAT1 e EBP β , entretanto, para confirmação dessa hipótese estudos que avaliam a expressão de Hecpidina por *Western blot* torna-se necessário uma vez que existe uma regulação pós transcricional e pós translacional deste peptídeo.

O estudo realizado por Nairz e colaboradores (2013) mostra que a produção de óxido nítrico (NO) estimula a expressão de Ferroportina e excreção de ferro em macrófagos infectados com *Salmonella typhimurium*. Este estudo representa um novo mecanismo de reconhecimento de patógenos via NO. Embora o *M. tuberculosis* seja uma bactéria intracelular como a *Salmonella*, esse mecanismo pode não ser aplicado para infecções com micobactérias virulentas, evidenciando que aspectos intrínsecos do próprio microrganismo podem acarretar numa resposta diferente em macrófagos.

Outra molécula importante para o tráfego de ferro dentro de macrófagos é o transportador de metal divalente (SLC11A1). SLC11A1 é uma proteína de membrana expressa em fagolisossomos de macrófagos e compartimentos intracelulares de neutrófilos e células dendríticas. Essa proteína possui papel importante na ativação da

resposta imune em macrófagos, por meio da modulação da produção de quimiocinas e citocinas como, por exemplo, MIP-1 α , TNF- α , IL-1 β e a formação de espécies reativas de oxigênio. Estudo realizado em pacientes com Tuberculose e que apresentam polimorfismos no gene *SLC11A1* mostrou que indivíduos infectados com cepas de micobactérias *M. tuberculosis* que pertencem à família Beijing estão associados com falha no tratamento e com grande chance de progressão para Tuberculose ativa (Crevel et al, 2009). O presente estudo mostrou que macrófagos infectados com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 induz mais a transcrição do gene *SLC11A1* do que os macrófagos infectados com *M. tuberculosis* H37Rv e que o tratamento com citrato férrico interfere na modulação deste gene nos macrófagos infectados. Nas amostras sem tratamento o isolado clínico expressou mais o gene *SLC11A1* em todos os tempos de infecção, sendo mais expressivo no tempo 72 horas após a infecção com indução 5 vezes maior do que controle não infectado e 3 vezes maior quando comparado com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv. Estudos apresentam opiniões contraditórias quanto o papel da proteína SLC11A1 nas infecções. Estudo conduzido por Kuhn e colaboradores (2001) propôs que a proteína SLC11A1 atua na importação de ferro para dentro de fagossomos contendo *Mycobacterium avium* e inibe a proliferação desse microrganismo ao ativar a reação de Fenton que produz radicais superóxidos que são tóxicos para microrganismos intracelulares. Outros trabalhos conduzidos por Fritsche e colaboradores (2012) mostraram que macrófagos infectados com *Salmonella entérica* possui alta expressão da proteína SLC11A1 e está associada com alterações na homeostase do ferro no qual resulta em deficiência de ferro dentro de macrófagos.

Outro estudo realizado por Zandt e colaboradores (2008) propõe que a regulação do fluxo de ferro dentro de fagossomos é controlada pela ação conjunta da proteína SLC11A1 e da Ferroportina e é dependente da concentração de ferro intracelular. Eles sugerem que quando há concentração elevada de ferro dentro dos fagossomos a proteína SCL11A1 auxilia na exportação de ferro para o citoplasma. Nosso estudo mostra que a expressão de Ferroportina se mantém no nível basal ou está inibida nas infecções com *M. tuberculosis* H37Rv e *M. tuberculosis* Beijing 1471, ou seja, provavelmente não houve excreção de ferro do fagossomo para o citoplasma ou do citoplasma para o meio extracelular. Logo, é possível afirmar que o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 promove a internalização de ferro nos fagossomos mediado pela proteína SLC11A1 e que esse influxo pode estar associado com dano celular e diminuição da viabilidade dos macrófagos conforme demonstrado no item 4.4.

Embora seja possível observar que macrófagos infectados com *M. tuberculosis* Beijing 1471 promove a morte celular dentro de 72 horas de infecção, este estudo não mostrou diferença estatística no crescimento de micobactérias dentro dos macrófagos como também não houve aumento da taxa de crescimento intracelular nas amostras tratadas com citrato férrico amoniacal. Isso implica dizer que a natureza do sal complexado com ferro bem como a concentração utilizada pode interferir na capacidade de internalização de ferro dentro de macrófagos que seja suficiente para elevar a proliferação de bactérias intracelulares. Outra alternativa é a capacidade de células em

formar íons peroxinitrito que auxiliam na limitação do crescimento de bactérias mesmo na presença de alta concentração de ferro *in vitro* (Zwilling et al, 1999).

Os receptores de TfR1 (TFRC) e TfR2 mostraram perfil expressão diferente entre as infecções. O TFRC/TfR1 manteve o nível de expressão basal das culturas infectadas ou com reduzida expressão quando comparado ao controle não infectado (figuras 6 e 7). Nas amostras não tratadas com ferro, o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 mostrou aumento progressivo no decorrer do tempo o que permite dizer que essa micobactéria induz a internalização de ferro acoplado a Transferrina nos macrófagos elevando, desta forma, a quantidade de ferro intracelular disponível para as micobactérias. Interessantemente, nas amostras infectadas com *M. tuberculosis* Beijing 1471 não houve a detecção do sinal de amplificação do gene *TfR2*. Esse receptor está relacionado com a sensibilização de ferro em enterócitos e a sua ativação ou interação com a proteína HFE induzem a transcrição de hepcidina, entretanto, não foi verificado estudos que possam justificar essa variabilidade em macrófagos humanos THP-1.

A dosagem do ferro no sobrenadante das culturas de macrófagos não representou adequadamente a quantidade de ferro internalizado nos macrófagos. Para isso seria importante ter avaliado a saturação de transferrinas solúveis e a expressão do gene relacionado ao armazenamento de ferro intracelular (ferritina). Este resultado mostrou que não há variação significativa da quantidade de ferro presente no sobrenadante das culturas infectadas e tratadas com citrato férrico amoniacal, reafirmando assim que existe um controle rígido na captura de ferro extracelular pelas células THP-1 utilizadas neste estudo (figuras 11 e 12). A variação descrita na infecção com *M. tuberculosis* Beijing 1471 pode ter ocorrido devido ao alto número de macrófagos mortos nas culturas *in vitro*, já caracterizadas em estudos anteriores (AMARAL, 2012).

Outra abordagem discutida neste estudo refere-se na capacidade de desses macrófagos infectados em promover resposta pró ou anti-inflamatória e a capacidade de induzir apoptose. A resposta mediada por macrófagos deve ser controlada minuciosamente, pois a desregulação do mecanismo de defesa produzido por eles pode ocasionar em resposta imune exacerbada com elevada indução de citocinas pró-inflamatória e espécies reativas de oxigênio que danificam o tecido alvo. Já a ausência de resposta adequada e produção de moléculas anti-inflamatórias podem promover a resistência de patógenos no organismo hospedeiro o que pode levar a falha da antibioticoterapia e aumento de recorrência de doenças infecciosas e transmissibilidade (Xu et al, 2014).

Sabe-se que macrófagos são polarizados conforme estímulo gerado no microambiente onde estão inseridos. Macrófagos denominados M1 exibe um potencial antimicrobiano e promove a ativação de resposta Th1, enquanto que macrófagos M2 estão associados à ativação de resposta Th2 relacionada ao remodelamento tecidual e produção de proteínas anti-inflamatórias. Para resolução da infecção com micobactérias causadoras de Tuberculose é necessário à indução de resposta M1 e para que essa característica fenotípica em macrófagos seja definida a concentração de ferro detectado

é primordial. Macrófagos M1 apresentam altos níveis de moléculas inflamatórias como TNF α , IL-6, SLC11A1, SOD2 e baixa expressão do receptor de Transferrina do tipo 1 (TfR1). (Recalcati et al, 2012). Além disso, macrófagos M1 expressam ceruplasmina e pouca expressão de hepcidina enquanto que macrófagos M2 exibem alta expressão de TfR1, SLC11A1, SLC40A1, IL-4 e IL-13. Outra característica importante é que macrófagos M1 não apresentaram ferro lábil detectável e falham na internalização de ferro enquanto que macrófagos M2 internalizam o ferro eficientemente (Recalti et al, 2012).

Neste estudo foi verificada a expressão de alguns genes relacionados a apoptose em macrófagos humanos infectados (figura 8). AKT é uma proteína quinase serina/treonina que funciona como um regulador crítico para sobrevivência celular e proliferação. AKT possui papel importante em vias de sinalização em resposta ao fator de crescimento e outros estímulos extracelulares para controlar funções importantes como, por exemplo, metabolismo nutricional, crescimento celular e apoptose. Esta proteína interfere na ativação da via de sinalização da apoptose mediada por caspases ao fosforilar a proteína BAD.

O processo de ativação de apoptose ocorre quando há perda da integridade mitocondrial seguida da liberação de citocromo c. O citocromo c se liga ao fator apoptótico ativador de proteases (Apaf-1) ativando-o. Este fator ativa a protease Caspase 9 que por sua vez irá ativar uma cascata sinalização celular. (Li et al, 2002). Os reguladores desta via inclui as proteínas anti apoptóticas Bcl-2, Mcl-1, Bcl-XL e pró-apoptóticas Bad, Bid, Bik, Bax e Bak. A ativação de AKT é decorrente do estímulo por quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento. O presente estudo mostrou que existe a regulação dessas proteínas nos macrófagos infectados com a cepa *M. tuberculosis* H37Rv sugerindo que a forma de conter a infecção e proliferação da bactéria é pela indução de apoptose. Estudo realizado por Rojas e colaboradores (2002) afirma que a cepa *M. tuberculosis* H37Rv induz ativação de apoptose com aumento intracelular de cálcio no primeiro momento e promove a ativação de um segundo sinal no qual citocinas como, por exemplo, TNF- α e IL-10 apresentam expressão reduzida. As células tratadas com ferro mostraram níveis basais ou semelhantes ao controle não infectado o que permite dizer que o ferro não induz apoptose nas células tratadas.

Este estudo mostrou que o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 induz necrose em macrófagos confirmando as afirmações de outro estudo realizado por Ribeiro e colaboradores (2014). A morte celular mediada por necrose induz a produção de citocinas inflamatórias e o extravasamento do conteúdo celular causando dano tecidual. Estudo realizado por Amaral e colaboradores (2014) demonstrou que o receptor que detecta ATP extracelular, P2X7, induz mais rapidamente a morte por necrose em macrófagos infectados com este isolado clínico hipervirulento. Entretanto, novos processos de morte estão sendo elucidados e um deles que pode estar envolvido na resposta do macrófago frente à infecção com *M. tuberculosis* Beijing 1471 - Ferroptose que é caracterizada pelo acúmulo letal de espécies reativas de oxigênio (ROS) dependente de Ferro (Dixon et al, 2012).

Este trabalho foi útil para caracterização da resposta imune celular de macrófagos infectados com micobactérias virulentas, principalmente quanto à regulação do metabolismo do ferro em macrófagos. Estudos em animais e co-culturas podem elucidar outros mecanismos que envolvem ferro e infecção.

6. CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que:

- A expressão dos genes relacionados ao metabolismo do ferro em macrófagos mostrou que as infecções com *M. tuberculosis* Beijing 1471 pode promover a desregulação dos mecanismos que controlam a concentração de ferro dentro de macrófago aumentando a capacidade deste isolado clínico em se multiplicar;
- Macrófagos infectados com o isolado clínico *M. tuberculosis* Beijing 1471 induz morte por necrose enquanto que a cepa padrão *M. tuberculosis* induz apoptose nos macrófagos infectados nos tempos após a infecção (24, 48 e 72 horas);
- Não houve diferença estatística significativa com relação ao crescimento de micobactérias dentro de macrófagos entre os tratamentos com citrato férrico amoniacal das micobactérias *M. tuberculosis* Beijing 1471 e *M. tuberculosis* H37Rv;
- As interleucinas IL-6 e IL-1 estão correlacionadas com a quantidade de ferro intracelular;

7.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL EP, RIBEIRO SC, LANES VR, ALMEIDA FM, DE ANDRADE MR, BOMFIM CC, SALLES EM, BORTOLUCI KR, COUTINHO SILVA R, HIRATA MH, ALVAREZ JM, LASUNSKAIA EB, D'IMPERIO-LIMA MR. Pulmonary infection with hypervirulent mycobacteria reveals a crucial role for the P2X7 receptor in aggressive forms of Tuberculosis. PLoS Pathog. 2014.

ANDREWS S. C.; ROBINSON A. K; QUIÑONES F. R. Bacterial iron homeostasis. Microbiology Reviews, p. 215-237, 2003

BANERJEE, S.; FARHANA, A.; EHTESHAM, N.Z.; HASNAIN, S.E. Iron acquisition, assimilation and regulation in mycobacteria. Infection, Genetics and Evolution, v.11, n.5, p.825-838, 2011. [Review].

BHUSAL, Y.; SHIOHIRA, C.M.; YAMANE, N. Determination of in vitro synergy when three antimicrobial agents are combined against mycobacterium tuberculosis. International Journal of Antimicrobial Agents, v.26, p. 292–297, 2005.

BLASCHITZ, M.; HASANACEVIC, D.; HUFNAGL, P.; HASENBERGER, P.; PECAVAR, V.; MEIDLINGER, L.; KONRAD, M.; ALLERBERGER, F.; INDRA, A. Real-time pcr for single-nucleotide polymorphism detection in the 16s rrna gene as an indicator for extensive drug resistance in mycobacterium tuberculosis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.66, n.6, p.1243-6, 2011.

BOELAERT J. R.; VANDECASTEEL S. J.; APPELBERG R.; GORDEUK V. R. The effect of the host's iron status on Tuberculosis. Journal of infectious diseases. p.195:1745-53, 2007

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – especial Tuberculose. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, Vol. 43, Março 2012. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bolepi_v43_especial_tb_correto.pdf Acesso em: 20 mar. 2012.

BRASIL/Ministério da Saúde/Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de bacteriologia da tuberculose. 2TM ed. Rio de Janeiro: 1994.

CARDOSO OELEMAN, M.; GOMES, H.M.; WILLERY, E.; POSSUELO, L.; BATISTA, LIMA, K.V.; ALLIX-BÉGUEC, C.; LOCHT, C.; GOGUET DE LA SALMONIÈRE, Y.O.; GUTIERREZ, M.C.; SUFFYS, P.; SUPPLY, P. The forest behind the tree: phylogenetic exploration of a dominant mycobacterium tuberculosis

strain lineage from a high tuberculosis burden country. *Plos One*, v.6, n.3, p.e18256, 2011.

CHIPPERFIELD, J.R.; RATLEDGE, C. Salicylic acid is not a bacterial siderophore: a theoretical study. *Biometals*, v.13, n.2, p.165-8, 2000.

COLLINS H. L. Withholding iron as a cellular defense mechanism – friend or foe?. *Eur. J. Immunol.* p. 1803-1806, 2008

CROWLE, A.J.; ROSS, E.J. Inhibition by retinoic acid of multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infection and Immunity*, v.57, n.3, p.840-4, 1989.

DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, SKOUTA R, ZAITSEV EM, GLEASON CE, PATEL DN, BAUER AJ, CANTLEY AM, YANG WS, MORRISON B, STOCKWELL. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*. 2012

DRAKESMITH H.; PRENTICE M. Hepcidin and the Iron-Infection axis. *Science*. V.338, p. 768, 2012

GILLESPIE SH. Evolution of drug resistance in mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.2, p.267-74, 2002.

GOLD, B.; RODRIGUEZ, G.M.; MARRAS, S.A.; PENTECOST, M.; SMITH, I. The mycobacterium tuberculosis *ideR* is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*, v.42, n.3, p.851-65, 2001.

HÖNER, Z.U.; BENTRUP, K.; RUSSELL, D.G. Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends in Microbiology*, v.9, n.12, p.597-605, 2001. [Review].

HUITRIC, E.; VERHASSELT, P.; KOUL, A.; ANDRIES, K.; HOFFNER, S.; ANDERSSON, D.I. Rates and mechanisms of resistance development in mycobacterium tuberculosis to a novel diarylquinoline atp synthase inhibitor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.54, n.3, p.1022-1028, 2009.

JIANG, X.; LU, C.; GAO, F.; WANG, F.; ZHANG, W.; PORTUGAL, I.; XU, P.; WANG, H.; ZHANG, Y. A rapid and simple method for identifying mycobacterium tuberculosis w-beijing strains based on detection of a unique mutation in *rv0927c* by pcr-sscp. *Microbes and Infection*, v.11, n.3, p.419-423, 2009.

KEREN, I.; MINAMI, S.; RUBIN, E.; LEWIS, K. Characterization and transcriptome analysis of mycobacterium tuberculosis persisters. *mBio*, v.2, n.3, p.E00100-E00111, 2011.

KLEINNIJENHUIS, J.; OOSTING, M.; JOOSTEN, L.A.; NETEA, M.G.; VAN CREVEL, R. Innate immune recognition of mycobacterium tuberculosis. *Clinical and Developmental Immunology*, v.2011, id.405310, p.1-12, 2011.

KOO, M.S.; SUBBIAN, S.; KAPLAN, G. Strain specific transcriptional response in mycobacterium tuberculosis infected macrophages. *Cell Communication and Signaling*, v.10, n.1, p.2, 2012.

KOUL, A.; ARNOULT, E.; LOUNIS, N.; GUILLEMONT, J.; ANDRIES, K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*, v.469, n.7331, p.483-490, 2011.

LAMARCA, B.B.; ZHU, W.; ARCENEUX, J.E.; BYERS, B.R.; LUNDRIGAN, M.D. Participation of fad and mbt genes in synthesis of mycobactin in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*, v.186, n.2, p.374-382, 2004.

LIN, M.Y.; OTTENHOFF, T.H. Host-pathogen interactions in latent mycobacterium tuberculosis infection: identification of new targets for tuberculosis intervention. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders: Drug Targets*, v.8, n.1, p.15-29, 2008.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods*, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

LÖNNROTH, K.; RAVIGLIONE, M. Global epidemiology of tuberculosis: prospects for control. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, v.29, n.5, p.481-491, 2008.

LOUNIS N.; PERNOT C. T.; GROSSET J.; GORDEUK V. R.; BOELAERT J. R. Iron and Mycobacterium tuberculosis infection. *Journal of Clinical Virology*. p. 123-126, 2001

LOWRIE, D.B.; TASCONE, R.E.; BONATO, V.L.; LIMA, V.M.; FACCIOLI, L.H.; STAVROPOULOS, E.; COLSTON, M.J.; HEWINSON, R.G.; MOELLING, K.; SILVA, C.L. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination *Nature*, v.400, n.6741, p.269-271, 1999.

LU, C.; WU, J.; WANG, H.; WANG, S.; DIAO, N.; WANG, F.; GAO, Y.; CHEN, J.; SHAO, L.; WENG, X.; ZHANG, Y.; ZHANG, W. Novel biomarkers distinguishing active tuberculosis from latent infection identified by gene expression profile of peripheral blood mononuclear cells. *Plos One*, v.6, n.8, p.E24290, 2011.

MAARTENS G.; WILKINSON R. J. Tuberculosis. *Lancet*. V. 370 p. 2030-2043, 2007

MENZIES, D.; AL JAHDALI, H.; AL OTAIBI, B. Recent developments in treatment of latent tuberculosis infection. *Indian Journal of Medical Research*, v.133, n.3, p.257-266, 2011.

MURPHY, D.J.; BROWN, J.R. Identification of gene targets against dormant phase mycobacterium tuberculosis infections. *BMC Infectious Diseases*, v.7, p.84, 2007.

NICOL, M.P.; WILKINSON, R.J. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene*, v.102, n.10, p.955-965, 2008.

OPROMOLLA, D.V.A.; BAPTISTA, I.M.F.D. Micobactérias. Disponível em: <http://www.isaude.sp.gov.br/smartsitephp/media/isaude/file/dermatoses/nocoeshanse/03/microbacterias.pdf>. Acesso em: 05 maio 2011.

PALACI, M.; UEKI, S.Y.M.; CURCIO, M.; TELLES, M.A.S. Quimioterapia da tuberculose: fundamentos, regimes e resistência bacteriana. *Revista de Ciências Farmacêuticas (Araraquara)*, v.18, p.29-40, 1997.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.46, n.8, p.2720-2722, 2003.

PRAVICA, V.; ASDERAKIS, A.; PERREY, C.; HAJEER, A.; SINNOTT, P.J.; HUTCHINSON, I.V. In vitro production of ifn-gamma correlates with ca repeat polymorphism in the human IFN GAMMA gene. *European Journal of Immunogenetics*, v.26, n.1, p.1-3, 1999.

QUINLAN G.J.; CHEN Y.; EVANS T. W; GUTTERIDGE J.M.C. Iron signaling regulated and through oxygen: implications for sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Clinical Science*, p.169-182, 2011

RAJA, A. Immunology of tuberculosis. *Indian Journal of Medical Research*, v.120, n.4, p.213-32, 2004.

RECALCATI S; LOCATI M; GAMMELLA E; INVERNIZZI P, GAETANO C. Iron levels in polarized macrophages: regulation of immunity and autoimmunity. *Autoimmun Rev.*, 2012.

REDDY, P.V.; PURI, R.V.; KHERA, A.; TYAGI, A.K. Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of mycobacterium tuberculosis in thp-1 macrophages and the guinea pig model of infection. *Journal of Bacteriology*, v.194, n.3, p.567-575, 2012.

RESNICK M. W. The Irony of host defense. *Blood Journal*. p. 460, 2008

RIBEIRO SC; GOMES LL; AMARAL EP; ANDRADE MR; ALMEIDA FM REZENDE AL; LANES VR CARVALHO EC; SUFFYS PN; MOKRUSOV I; LASUNSKAIA EB. Mycobacterium tuberculosis strains of the modern sublineage of the Beijing family are more likely to display increased virulence than strains of the ancient sublineage. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014.

RODRIGUEZ, G.M.; SMITH, I. Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in mycobacterium tuberculosis. *Journal of Bacteriology*, v.188, n.2, p.424-430, 2006.

RODRIGUEZ, G.M.; SMITH, I. Mechanisms of iron regulation in mycobacteria: role in physiology and virulence. *Molecular Microbiology*, v.47, n.6, p.1485-1494, 2003.

SCHAIBLE U. E.; KAUFMANN S. H. E. Iron and microbial infection. *Nature*. V. 2, p. 946-953, 2004

RODRIGUEZ R, JUNG CL, GABAYAN V, DENG JC, GANZ T, NEMETH E, BULUT Y. Hecpudin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6. *Infect. Immun*, 2013.

SCHNAPPINGER, D.; EHRT, S.; VOSKUIL, M.I.; LIU, Y.; MANGAN, J.A.; MONAHAN, I.M.; DOLGANOV, G.; EFRON, B.; BUTCHER, P.D.; NATHAN, C.; SCHOOLNIK, G.K. Transcriptional adaptation of mycobacterium tuberculosis within macrophages: insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental Medicine*, v.198, n.5, p.693-704, 2003.

SINGH, A.; GUIDRY, L.; NARASIMHULU, K.V.; MAI, D.; TROMBLEY, J.; REDDING, K.E.; GILES, G.I.; LANCASTER Jr., J.R.; STEYN, A.J. Mycobacterium tuberculosis whib3 responds to O₂ and nitric oxide via its [4Fe-4S] cluster and is essential for nutrient starvation survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, n.28, p.11562-11567, 2007.

SINGH, J.P.; VERMA, R.; CHAUDHURI, P. Random amplified polymorphic dna (rapd) analysis of mycobacterium tuberculosis strains in India. *Journal of Veterinarian Science*, v.7, n.2, p.181-187, 2006.

SOW FB, ALVAREZ GR, GROSS RP, SATOSKAR AR, SCHESINGER LS, ZWILLING BS, LAFUSE WP. Role of STAT1, NF-KappaB, and C/EBPbeta in the macrophage transcriptional regulation of hepcidina by mycobacterial infection and IFN-gamma. *J Leukoc Biol*. 2009.

STAVRUM, R.; STAVRUM, A.K.; VALVATNE, H.; RILEY, L.W.; ULVESTAD, E.; JONASSEN, I.; ASSMUS, J.; DOHERTY, T.M.; GREWAL, H.M. Modulation of transcriptional and inflammatory responses in murine macrophages by

the mycobacterium tuberculosis mammalian cell entry (mce) 1 complex. PLoS One, v.6, n.10, p.E26295, 2011.

TANEJA, N.K.; DHINGRA, S.; MITTAL, A.; NARESH, M.; TYAGI, J.S. Mycobacterium tuberculosis transcriptional adaptation, growth arrest and dormancy phenotype development is triggered by vitamin C. PLoS One, v.5, n.5, p.E10860, 2010.

THEIL E. C. Iron homeostasis and nutritional iron deficiency. Journal of nutrition. Doi: 10.3945/Jn.110127639,2011

VENDRAMINI, F.H.SILVIA, VILLA, S.C. TEREZA, SANTOS, G.S.L. MARIA, GAZETTA, E. CLAUDIA. Aspectos epidemiológicos atuais da tuberculose e o impacto da estratégia dots no controle da doença. Revista Latino-Americana de Enfermagem, v.15, n.1, p.1-3, 2007.

GUANGHUA XU, JING WANG, GEORGE FU GAO, CU HUA LIU. Insights into battles between *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages. Revista Protein Cell, 2014.

WADA, T.; IWAMOTO, T.; MAEDA, S. Genetic diversity of the mycobacterium tuberculosis beijing family in east asia revealed through refined population structure analysis. FEMS Microbiology Letters, v.291, n.1, p.35-43, 2008. 2009.

WANG J.; PANTOPOULOS K. Regulation of cellular iron metabolism. Biochem. J, v. 434, p. 365-381, 2011

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Tuberculosis Control: WHO report 2010. Who library cataloguing-in publication data. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564069_eng.pdf. Acesso em: 05 maio 2011.

YING LI, DONALD DOWBENKO E LAURENCE A. LASKY. AKT/PKB phosphorylation of p21 Cip/WAF1 enhances protein stability of p21 Cip/WAF1 and promotes cell survival. J. Biol. Chem, 2002.

YANG, Z.; ROSENTHAL, M.; ROSENBERG, A.N.; TALARICO, S.; ZANGHI, L.; MARRS, C.; THOMSEN, O.V.; LILLEBAEK, T.; ANDERSEN, B.A. How dormant is mycobacterium tuberculosis during latency? a study integrating genomics and molecular epidemiology. Infection, Genetics and Evolution, v.11, n.5, p.1164-1167, 2011.

8. ANEXOS

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7293567/1 - Juliana Gonçalves dos Santos

Email: julsantos@usp.br
Data de Nascimento: 03/11/1987
Cédula de Identidade: RG - 33981400-7 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutica-bioquímica - Universidade Paulista - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Análises Clínicas)
Área: Análises Clínicas
Data de Matrícula: 09/03/2012
Início da Contagem de Prazo: 09/03/2012
Data Limite para o Depósito: 09/09/2014
Orientador: Prof(a). Dr(a). Irene da Silva Soares - 09/03/2012 a 02/07/2012 E.Mail: isoares@usp.br
Orientador: Prof(a). Dr(a). Mario Hiroyuki Hirata - 03/07/2012 até o presente. E.Mail: mhirata@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 09/03/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/04/2013
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 09/03/2012
 Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2014

Impresso em: 08/09/14 10:58:09

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 7293567/1 - Juliana Gonçalves dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5709-5/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	13/08/2012	16/09/2012	75	5	93	A	N	Concluída
FBC5802-3/1	Tópicos Avançados em Toxicologia I	14/08/2012	26/11/2012	15	1	75	A	N	Concluída

OBQ5710-8/1	Biologia Molecular do Gene (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	15/08/2012	07/11/2012	180	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
OBQ5749-7/6	Redação Científica (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	22/08/2012	09/10/2012	30	0	0	-	N	Pré-matricula indeferida
IBI5035-1/1	Biologia Molecular Computacional (Curso Interunidades: Bioinformática - Universidade de São Paulo)	23/08/2012	05/12/2012	120	8	100	B	N	Concluída
FBA5751-1/1	Minerais em Nutrição: Distribuição Compartimental e Mecanismos de Regulação de sua Homeostase	11/09/2012	01/10/2012	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BTC5772-1/3	Mecanismos de Interação Bactéria-Célula Hospedeira (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)	01/10/2012	02/12/2012	90	6	93	B	N	Concluída
TIC5012-2/1	Bioestatística (Curso Interunidades: Medicina /Tecnologia e Intervenção em Cardiologia - Universidade de São Paulo)	01/10/2012	09/12/2012	90	6	76	C	N	Concluída
FBC5751-3/2	Métodos de Avaliação da Atividade Antibacteriana Aplicados no Monitoramento da Resistência e na Pesquisa de Princípios Ativos com Potencial Farmacológico	21/11/2012	05/12/2012	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5705-4/2	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/12/2012	09/12/2012	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5761-6/1	Tópicos Avançados em Bioquímica Clínica	04/02/2013	03/03/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5712-2/1	Métodos Modernos de Proteômica na Pesquisa em Análises Clínicas e Toxicológicas	05/03/2013	15/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5793-11/1	Tópicos em Análises Clínicas I	05/03/2013	17/06/2013	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	95	B	N	Concluída
FBC5757-4/2	Tópicos em Análises Clínicas II	06/08/2013	18/11/2013	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/2	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	06/08/2013	19/08/2013	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	46
Estágios:			
Total:	0	25	46

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/07/2014

Impresso em: 08/09/14 10:58:10

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP