

**“COMPARAÇÃO ENTRE A SUSCEPTIBILIDADE AO
ÓXIDO NÍTRICO E O PERFIL GENÉTICO DE CEPAS
DE *Mycobacterium tuberculosis*.”**

VÂNIA TIEKO GUEDES INUMARU

Dissertação de mestrado apresentada na
área de concentração de Epidemiologia da
Faculdade de Saúde Pública da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Epidemiologia

ORIENTADOR: PROF. DR. PÉRICLES
ALVES NOGUEIRA

São Paulo
2004



44625/2004 cgr

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta tese, por processos
fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

Este trabalho foi desenvolvido no setor de Micobacterias
do Instituto Adolfo Lutz, e teve auxilio financeiro do
CNPq e Fogarty International Program in Training
In Research in Tuberculosis (TW00905)

Aos meus pais, Getúlio e Vera e ao meu irmão Hideki, que são o meu exemplo de amor, dedicação, perseverança e honestidade.

Ao meu namorado Tiago,
pelo apoio, pelo auxílio na informática
e por estar ao meu lado durante todo
o processo.

À Dra. Lucilaine Ferrazoli, pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, por todo o apoio, orientação, estímulo, dedicação, “bronca” e amizade que me tem honrado. Se não fosse por você eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada por tudo.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Péricles Alves Nogueira, agradeço por ter me acolhido e aceito este desafio profissional e, sobretudo, pela orientação prestada.

As amigas do Setor de micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, Maria Alice da Silva Telles, Maria Conceição Martins, Suely Y. M. Ueki e Erica Chimara, pelo apoio, amizade e por ter aceitado colaborar com esta pesquisa.

À amiga Carmen Giampaglia pela orientação sempre enriquecedora, pelo apoio e principalmente pela amizade, que é um exemplo.

As amigas Idelice V. Butuem e Danielle Vedovello pela colaboração e pela amizade.

Aos colegas da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz e em especial as minhas amigas do setor de Enterobactérias, Tânia, Célia, Maride, Kinue e Daniela por ter me acolhido em seu laboratório e me ensinado muito, tanto no lado profissional quanto pessoal.

Ao Prof. Dr. Lee W. Riley por ter financiado este projeto e pelo auxílio na execução do experimento e na interpretação dos resultados.

À professora Dra. Sabina Lea D. Gotlieb pelo auxílio nas tabelas e gráficos.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de Mestrado.

As minhas amigas Luciana e Raquel pela força.

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Tuberculose	
1.1.1 Características gerais da doença	1
1.1.2 Etiologia e transmissão	1
1.1.3 Aspectos epidemiológicos	2
1.1.4 Imunopatologia	3
1.1.5 Virulência	6
1.2 Modelos experimentais para avaliação da ação do óxido nítrico	6
1.2.1 Estudos em humanos sobre a ação do óxido nítrico	8
1.3 Utilização da epidemiologia molecular para identificação de subtipos genéticos com características específicas de virulência	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Geral	10
2.2 Específicos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Identificação e caracterização das cepas	11
3.2 Diagnóstico laboratorial da tuberculose	11
3.3 Caracterização das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , quanto ao perfil genético pelo método de RFLP-IS6110	12
3.3.1 Extração e purificação do DNA bacteriano	12
3.3.2 Quantificação e digestão	13
3.3.3 Separação e transferência para membrana	14
3.3.4 Preparo da sonda genética	15
3.3.5 Purificação e marcação da sonda de DNA	16
3.3.6 Quantificação da sonda de DNA marcada	16
3.3.7 Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada	17

3.3.8	Análise do perfil genético das cepas	18
3.4	Caracterização das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> quanto ao perfil de susceptibilidade ao óxido nítrico (ON)	19
3.4.1	Preparo da suspensão bacteriana	19
3.4.2	Preparação dos meios de cultura	20
3.4.3	Exposição ao óxido nítrico	20
3.4.4	Avaliação da sobrevivência das cepas expostas ao óxido nítrico	20
3.4.5	Cálculo da taxa de sobrevivência	21
3.4.6	Análise dos dados	21
3.5	Aspectos éticos	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	41
7	REFERÊNCIA	42
ANEXOS		
Anexo I	Meio de cultura	I
Anexo II	Soluções utilizadas no método RFLP-IS6110	II
Anexo III	Soluções utilizadas nos ensaios experimentais para avaliar a susceptibilidade ao óxido nítrico	VI
Anexo IV	Placas de Midlebrook 7H11 com crescimento de <i>M. tuberculosis</i> cepa de referência H37Rv, placa controle e teste nas diluições 10^1 , 10^2 e 10^3 .	VIII
Anexo V	Formulário utilizado para a contagem de colônias	IX
Anexo VI	Distribuição dos perfis genéticos segundo taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico, valor mínimo, máximo e desvio padrão	X

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E UNIDADES

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
ADC	Albumina, dextrose, catalase
BCG	“Bacille Calmette-Guérin”
CRT- DST/AIDS	Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS
CTAB	Hexadecil trimetil brometo de amônio
DIG	Digoxigenina
dATP	“2’-Deoxyadenosine 5’- triphosphate”
dCTP	“2’-Deoxycytidine 5’- triphosphate”
dGTP	“2’-Deoxyguanosine 5’- triphosphate”
dTTP	“2’-Deoxythymidine 5’- triphosphate”
dUTP	“2’-Deoxyuridine 5’- triphosphate”
DNA	“Deoxyribonucleic acid”
DPI	“Dots per inch” (por polegadas)
DSS	Dodecil sulfato de sódio
DST	Doenças sexualmente transmissíveis
DTT	“Dithiothreitol”
EUA	Estados Unidos da América
HIV	Vírus da imunodeficiência adquirida
H₂O₂	Peroxinitrito
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFN-γ	Interferon gama
INOS	Óxido nítrico sintase induzível
kb	Quilobase (10 ³ pares de bases)
L-J	Löwenstein-Jensen
M	Molar

mbar	Milibar (1bar = 10 ⁵ pascais)
MDR	Multi drug resistant (multi drogas resistentes)
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
Mt	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
N	Normal
NMT	Micobacterias não tuberculosas
NO₂-	Nitrito
NO₃-	Nitrato
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
O₂	Oxigênio
OADC	Ácido oléico, albumina, dextrose e catalase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso molecular
RFLP	“Restriction Fragment Length Polymorphism”
ROI	Reactive-Oxygen Intermediates (Reativo de oxigênio intermediário)
RNI	Reactive Nitrogen Intermediates (Reativo de nitrogênio intermediário)
Rpm	Rotações por minuto

SSC	Solução salina com citrato
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	Tuberculose
TE	Tris-EDTA
TNF - α	Tumor necrose factor α (Fator necrose tumoral alfa)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
U	Unidade
UFC	Unidade formadora de colônias
X	Veze

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1** Número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* segundo número de cópias da IS6110, unidade de saúde da zona norte da cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002. **24**
- FIGURA 2** Perfis genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* definidos por RFLP IS6110, de cepas provenientes de unidades de saúde da zona norte da cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002. **25 e 26**
- FIGURA 3** Número de cepas de *M. tuberculosis* segundo grupos genéticos (detectados pelo método de RFLP-IS6110), unidades de saúde da zona norte da cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **27**
- FIGURA 4** Número de cepas de *M. tuberculosis* encontrados em cada um dos cinco grupos predominantes (definidos pelo método de RFLP-IS6110), de unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP de 2.000 a 2.002. **30**
- FIGURA 5** Taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico segundo grupos genéticos detectados pelo método de RFLP - IS6110 (de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*), unidades de saúde da zona norte da cidade de São Paulo, SP 2.000 – 2.002. **35**
- FIGURA 6** Taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico das cepas de *M. tuberculosis* segundo famílias genéticas predominantes e as cepas de referência H37R a e H37Rv unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **36**

FIGURA 7 Taxa média de sobrevivência (%) ao óxido nítrico das cepas de *M. tuberculosis* segundo grupos genéticos com média acima das cepas de referência, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002 37

FIGURA 8 Número de cepas pertencentes aos grupos genéticos com taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico superior à cepa de referência H37Ra, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP de 2.000 a 2002. 37

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1** Distribuição do número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* segundo grupo genético e família (definido pelo método de RFLP-IS6110), unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **28 e 29**
- TABELA 2** Número e proporção (%) de cepas de *M. tuberculosis* submetidas ao teste de susceptibilidade ao óxido nítrico e ao RFLP-IS6110, segundo grupos e famílias genéticas, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **31 e 32**
- TABELA 3** Número e proporção (%) de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que apresentaram resultado igual a zero nos testes de susceptibilidade ao óxido nítrico e número total de cepas segundo grupos genéticos, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **33**
- TABELA 4** Número e proporção (%) das cepas de *M. tuberculosis* segundo taxas de sobrevivência ao óxido nítrico, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002. **34**

RESUMO

Inumaru VTG. **Comparação entre a susceptibilidade ao óxido nítrico e o perfil genético de cepas de *Mycobacterium tuberculosis***. São Paulo; 2.003 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo]

Entre os fatores que contribuem para o sucesso do *Mycobacterium tuberculosis* como um patógeno, inclui-se sua capacidade em resistir e se multiplicar nos macrófagos. Vários estudos *in vitro* têm demonstrado que cepas de *M. tuberculosis* diferem quanto à sua susceptibilidade aos compostos nitrogenados (RNI). Dentre eles, o óxido nítrico (ON) tem sido muito estudado devido a sua capacidade em controlar a multiplicação do *M. tuberculosis* no interior dos macrófagos. Foram estudadas 419 cepas isoladas de pacientes com tuberculose pulmonar residentes na zona norte do Município de São Paulo no período de 1º de março de 2.000 a 31 de maio de 2.002. As cepas foram avaliadas quanto a susceptibilidade "in vitro" ao óxido nítrico 6mM e quanto ao perfil genético pelo método de RFLP-IS6110. Entre as cepas testadas, foi observada uma variação na taxa de resistência ao ON entre 0 - 85%, apresentando uma média de 15,5% d.p. \pm 16.7. A caracterização molecular pelo método de RFLP-IS6110 revelou a presença de cinco grupos genéticos predominantes (A, A7, F, SP, SP1). A taxa de resistência ao óxido nítrico destas cepas foi inferior a taxa observada na cepa avirulenta H37Ra (27,9%). Dentre os 59 grupos genéticos identificados, somente cepas dos grupos (5A, B3, F4, G2, S2, U) apresentaram taxa de resistência superior a cepa de referência H37Ra. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que não houve correlação entre grupos genéticos predominantes e resistência ao óxido nítrico, sugerindo que a resistência ao óxido nítrico não é um fator determinante da expansão de grupos genéticos predominantes.

Descritores: *Mycobacterium tuberculosis*. Óxido Nítrico. Susceptibilidade

SUMMARY

Inumaru VTG. **Comparação entre a susceptibilidade ao óxido nítrico e o perfil genético de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*** [Comparison of oxide nitric susceptibility and clustered pattern of *Mycobacterium tuberculosis* strains]. São Paulo (BR); 2.003 [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública da Universidade São Paulo Brazil].

Among factors that contribute to the success of *M. tuberculosis* as a pathogen, its ability to resist and multiply inside the host macrophage. Numerous studies "in vitro" have demonstrated that *M. tuberculosis* strains differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates (RNI). The oxide nitric (ON) have been studied concerning its capacity in controlling the *M. tuberculosis* multiplication within macrophages. It was isolated 419 strains from tuberculosis patients from north zone of São Paulo city from March 1st 2.000 to May 31st 2.002. The strains tested was for nitric oxide 6mM susceptibility "in vitro" and to determine clustered patterns by RFLP-IS6110 method. The variation in nitric oxide resistants levels observed was between 0 to 85%, average 15,5% s.d. \pm 16.7. The clusters identification by RFLP-IS6110 method showed that five clustered patterns were predominant (A, A7, F, SP, SP1). Nitric oxide susceptibility levels was lower for the avirulent strain H37Ra (27,9%) . Among 59 clustered patterns, only six clustered patterns (5A, B3, F4, G2, S2, U) showed higher nitric oxide susceptibility levels compared to the avirulent strain H37Ra. The results obtained in this study could not demonstrated the relationship between clustered patterns and nitric oxide resistant levels, suggesting that nitric oxide resistant levels were not a determining factor for the expansion of predominant clustered patterns.

Descriptors: *Mycobacterium tuberculosis*. Nitric Oxide. Susceptibility

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tuberculose

1.1.1 Características gerais da doença

A tuberculose (TB) é uma doença infecciosa caracterizada por apresentar evolução crônica e predominante comprometimento dos pulmões, podendo atingir outros órgãos. Os principais sintomas são tosse, febre, suores noturnos e emagrecimento, podendo incluir ainda outras manifestações como dispnéia, dor torácica, hemoptise, inapetência, linfangite e emagrecimento (FIÚZA DE MELO e AFIUNE 1993).

As formas extrapulmonares mais freqüentes são: pleural, linfática, urinária, geniturinária feminina, osteoarticular e meningoencefálica (FIÚZA DE MELO e AFIUNE 1993).

Dentre os fatores intrínsecos ao organismo humano que constituem riscos para o desenvolvimento de ambos os tipos de TB, estão algumas condições debilitantes (desnutrição, idade avançada e estresse), dependência química (alcoolismo e drogas), doenças degenerativas e doenças imunossupressoras (FIÚZA DE MELO e AFIUNE 1993).

1.1.2 Etiologia e transmissão

Em 1.882, o *Mycobacterium tuberculosis* foi isolado pela primeira vez por Robert Koch que demonstrou ser esta bactéria o agente etiológico da TB humana, recebendo assim o nome do seu descobridor. Porém, o bacilo de Koch foi classificado no gênero *Mycobacterium* somente em 1.896 (WAYNE e KUBICA 1984).

O gênero é constituído por bacilos retos ou ligeiramente curvos com dimensões que variam entre 0.2 – 0.7 μm de largura por 1 – 10 μm de comprimento, aeróbios, imóveis e não formadores de esporos ou cápsulas (HOLT et al 1994). Das espécies existentes no gênero, somente poucas se adaptaram a algum tipo de

hospedeiro e dessas, um número menor se tornou patogênicas para animais e humanos (WOLINSKY 1979). Nenhuma influenciou, tão drasticamente, a história da humanidade como o *M. tuberculosis*. Sem hospedeiros intermediários, reservatórios no meio ambiente ou vetores, o *M. tuberculosis* encontrou no homem o seu reservatório natural e mantenedor da espécie (WOLINSKY 1979):

O gênero *Mycobacterium* apresenta mais de 100 espécies (EUZEBY 1999), classificadas em três grupos de acordo com a capacidade de causar doença no homem: patogênicas clássicas, patogênicas oportunistas e não patogênicas (COLLINS et al 1997):

No grupo das micobactérias patogênicas estão incluídas as espécies *M. leprae* e do complexo *M. tuberculosis*, ou seja, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis* e *M. africanum*. As demais espécies, patogênicas oportunistas e não patogênicas, atualmente denominadas de micobactérias não tuberculosas (NMT) apresentam patogenicidade variável podendo causar doença no homem e animais (COLLINS et al 1997):

A principal fonte de infecção humana pelo bacilo da TB é o indivíduo portador de TB pulmonar bacilífera, ou seja, aquele que está eliminando o bacilo no escarro. Ao falar ou tossir, esse indivíduo geralmente emite gotículas contendo bacilos que podem ser inaladas imediatamente, pelas pessoas que se encontram próximas (contactantes) ou depois de algum tempo de permanência no ar ambiente (TARANTINO e LEITÃO DE OLIVEIRA 1990):

Apenas as gotículas com diâmetro de dois a 10 μm e por esta razão contendo poucos bacilos (um ou dois) conseguem alcançar os alvéolos pulmonares, e as maiores são depositadas na árvore traqueobrônquica e eliminadas pelo sistema de defesa mucociliar (TARANTINO e LEITÃO DE OLIVEIRA 1990).

1.1.3 Aspectos epidemiológicos

A Organização Mundial de Saúde estimava que um terço da população mundial, esteja infectada pelo *M. tuberculosis* e que anualmente ocorram cerca de oito milhões de casos de TB com saldo de 2,9 milhões de mortes, sobretudo em grupos etários reprodutivos e economicamente ativos (SUDRE et al 1992, DOLIN et al 1994, WHO 1997).

Nas primeiras décadas do século XX, a introdução da pasteurização do leite e melhorias nas condições de vida da população de países mais ricos resultaram na diminuição da incidência e da mortalidade ocasionadas pela TB. Esse decréscimo foi ainda mais acentuado a partir da introdução da quimioterapia na década de 40 (SHIMAO 1983, RAVIGLIONE et al 1995). A comunidade médica e científica, assim como, as autoridades sanitárias passaram a acreditar que melhorias nas condições de vida e a quimioterapia iriam manter a tendência de redução progressiva da incidência de tuberculose até o seu controle (MURRAY 1991).

A partir da segunda metade da década de 80, assistimos em boa parte do mundo um recrudescimento da morbi-mortalidade por TB atingindo inclusive os países industrializados. Diferentes fatores parecem ter influenciado esta nova tendência, entre eles a co-infecção HIV (Vírus da imunodeficiência adquirida)/ *M. tuberculosis*, o aumento da frequência de cepas de micobactérias multi-resistentes às drogas habitualmente utilizadas no tratamento da TB, a queda na qualidade dos programas de controle desta doença, as crises políticas e econômicas que geraram correntes migratórias de áreas endêmicas de TB para regiões economicamente mais desenvolvidas (KOCHI 1994, MURRAY 1997; RAVIGLIONE et al 1993).

A região das Américas alberga 7% do total mundial de casos de TB. No Brasil, estima-se que ocorram cerca de 129.000 casos novos por ano, dos quais apenas 90.000 casos novos são notificados oficialmente. O Estado de São Paulo, responsável pelo maior número absoluto de casos novos, notificou 20.125 casos novos no ano de 2.001, com um coeficiente de incidência de 50/100.000 habitantes e cerca de 1.500 óbitos por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE 2002; CENTRO DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA 2002).

1.1.4 Imunopatologia

A infecção pelo *M. tuberculosis*, freqüentemente, se inicia no parênquima dos lobos pulmonares após a inalação de núcleos secos de gotículas (núcleo de Wells) contendo este microorganismo, passando a seguir para os nódulos linfáticos da região hilar, de onde pode ser disseminada para diversos tecidos e órgãos, pela corrente hematogênica ou linfática (DANNENBERG 1999).

A infecção do parênquima pulmonar e dos nódulos linfáticos da região hilar é denominada de complexo primário e este, juntamente com os focos infecciosos que se formam nos diferentes órgãos e tecidos são denominados de infecção primária (DANNENBERG 1999).

Durante o curso da infecção e desenvolvimento da doença, diferentes componentes antigênicos do bacilo estimulam os linfócitos B induzindo sua mitose e sua transformação em plasmócitos secretores de imunoglobulinas contra esses antígenos (SULTZER 1988). No entanto, essa resposta imunológica humoral não desempenha um papel importante na defesa contra o adoecimento por tuberculose, porque os anticorpos não conseguem destruir os bacilos e estes também não produzem toxinas que possam ser neutralizadas (IVANYI e THOLE 1994). Assim, cabe aos linfócitos T CD4+ (linfócitos T helper ou auxiliares) e às células fagocíticas mononucleadas (macrófago, monócitos, células de Kupfer, histócitos) a grande responsabilidade pelo processo de destruição do bacilo e do desenvolvimento da TB (DANNENBERG 1999). Os macrófagos secretam interleucina (IL) 1, que irá ativar linfócitos T que, por sua vez, ao secretarem linfocinas (fator de quimiotaxia de macrófagos, fator de inibição e migração de macrófagos e outros), irão atuar sobre macrófagos, tornando-os ativados, ou seja, com maior atividade microbicida.

Desta interação patógeno-hospedeiro (*M. tuberculosis* versus sistema imunológico celular), podem ocorrer três tipos básicos de reações inflamatórias:

- (i) Inflamação exsudativa, observada durante o processo de infecção primária antes do desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo tardia;
- (ii) reação produtiva, caracterizada pela formação de granulomas, basicamente através de macrófagos, células epitelióides e linfócitos, quando a quantidade de bacilos ou antígenos, no local da infecção é baixa e a hipersensibilidade tardia elevada e
- (iii) reação necrótica, desencadeada no estágio mais avançado do processo inflamatório, quando a quantidade de antígeno no local da infecção e a hipersensibilidade dos tecidos encontram-se bastante elevadas, dando origem a uma lesão escavada denominada caverna tuberculosa (DANNENBERG 1999).

A reação inflamatória depende de dois tipos de resposta linfocitária, mediadas pelos linfócitos TH1 e TH2. No primeiro caso há liberação de gama-interferon e IL 2,

que atuam contendo a multiplicação celular e no segundo, com a atuação das IL 4, 5, 6 e 10, ocorre a coalescência dos granulomas, liberação do fator de necrose tumoral e conseqüente disseminação da infecção (SCHLUGER e ROM 1998, FLYNN e CHAN 2001).

De acordo com RICH (1951), a probabilidade de ocorrência de lesão tuberculosa é diretamente proporcional ao número de bacilos infectantes, à virulência desses bacilos e ao grau de hipersensibilidade que induzem no hospedeiro. Por outro lado, é inversamente proporcional à resistência natural e à resistência adquirida no hospedeiro.

Na década de 90 foi demonstrado que em resposta a estímulos antigênicos, os macrófagos são ativados por células T, especialmente CD4, que secretam IFN γ (Interferon gama), IL2 (RHOADES e ORME 1997) e IL4 (WANG et al 1998), os quais estimularão a produção da óxido nítrico sintase (iNOS) (CHAN et al 1995, RHOADES e ORME 1997).

Dessa forma, a atividade antimicrobiana está relacionada com a produção de compostos nitrogenados (RNI), produzidos pela ação da iNOS sobre a L-arginina. Esta enzima quebra o terminal guanidino da L-arginina liberando óxido nítrico (ON) e outros compostos, tais como: nitrito (NO $_2^-$) e nitrato (NO $_3^-$), os quais são relativamente estáveis sob condições fisiológicas (RHOADES e ORME 1997).

A base bioquímica de resistência dos microorganismos ao ROI (Reativo de Oxigênio Intermediário), tem sido objeto de estudos nos últimos 100 anos, desde que a caracterização da catalase no campo da enzimologia. Porém, estudos sobre a resistência ao RNI (Reativo Nitrogênio Intermediário) são relativamente recentes (NATHAN e SHILOH 2000) e tem demonstrado que apenas o ROI pode ser insuficiente para destruir o *M. tuberculosis*, mas ele combinado com RNI pode ter uma significativa ação micobacteriana (SCHNEEMANN et al 1993, VALWAY et al 1998).

Além da atividade antimicrobiana, foi demonstrado que os produtos RNI são importantes mensageiros fisiológicos intracelulares, pois mediam uma variedade de funções, incluindo regulação da dilatação de músculos lisos e a neurotransmissão (CHAN et al 1992, LOWENSTEIN et al 1994, NICHOLSON et al 1996, WANG et al 1998).

Os mecanismos potenciais pelos quais o ON e outros compostos de RNI atuam no controle de infecções intracelulares são: modificação do DNA, proteínas e lipídeos, presentes tanto na superfície como no interior da célula (CHAN et al 2001). Outros mecanismos de destruição pelo ON incluem interação com proteínas acessórias, tais como: grupos heme, tiols, resíduos aromáticos ou fenólicos, radicais tirosil e aminas, resultando em inativação enzimática e outras funções proteicas do microorganismo (GOW et al 1999).

1.1.5 Virulência

A capacidade do *M. tuberculosis* causar doença, ou seja, sua virulência é uma característica mediada por múltiplos fatores biológicos (JACOBS e BLOOM 1994) e depende, como descrito anteriormente, da resposta imunológica celular (DANNENBERG 1999, FLYNN e ERNST 2000).

Os mecanismos específicos que possibilitam a sobrevivência do *M. tuberculosis* no interior dos fagócitos são pobremente compreendidos, embora se saiba que podem estar relacionados à sua capacidade de inibir a fusão do lisossoma com o fagossoma ou, até mesmo, de resistir ou evitar a ação de enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas e de outras substâncias tóxicas tais como H_2O_2 e O_2 , radicais hidroxilas, NO e NO_2^- , presentes no interior do fagolisossomo (KORNFELD 1987). De modo geral, resta ainda saber, quais fatores de virulência, seriam realmente preponderantes e quando e como interagiriam com as estruturas químicas específicas das células do hospedeiro, para exercer a sua ação sobre as mesmas.

Um dos fatores que contribuem para o sucesso do *M. tuberculosis* como um patógeno incluem, sobretudo, sua capacidade em resistir e se multiplicar nos macrófagos. Os macrófagos ativados produzem compostos formados de oxigênio e nitrogênio denominados de ROI e RNI (CHAN et al 2001, FIRMANI e RILEY a,b 2002, GOW et al 1999, LIEW e COX 1991, NATHAN e HIBBS 1991, NATHAN 1992).

1.2 Modelos experimentais para avaliação da ação do óxido nítrico

Vários estudos “in vitro”, mostraram que o RNI possui atividade inibitória para uma ampla variedade de bactérias, incluindo as micobactérias (CHAN et al

1992, FIRMANI e RILEY 2002a,b, LIEW e COX 1991, LOWENSTEIN et al 1994 NATHAN e HIBBS 1991, NATHAN 1992). Dentre os RNIs, o ON tem sido muito estudado em razão de sua capacidade em controlar a multiplicação do *M. tuberculosis* no interior dos macrófagos (FIRMANI e RILEY 2002a).

Pesquisadores utilizaram para tais estudos “in vitro” o nitrito de sódio em meio de cultura com pH ácido. Sabe-se que nestas condições, o nitrito de sódio é convertido em ácido nitroso e sua subsequente decomposição em ácido nitroso que gera o ON e outros compostos nitrogenados (FIRMANI E RILEY 2002a, O'BRIEN et al 1994).

CHAN et al (1992) demonstraram que o RNI produzido quimicamente em concentrações de 1,0 a 10,0 mM é bactericida para *M. tuberculosis* “in vitro”.

Em modelos animais, o ON produzido pelos macrófagos, exerce importante função na destruição de *M. tuberculosis* (CHAN et al 1992, 1995). O'BRIEN et al (1994), demonstraram a correlação da resistência “in vitro” de várias cepas de *M. tuberculosis* ao ON com a virulência para cobaias. Cobaias infectados por *M. tuberculosis*, tratados com inibidores de iNOS, apresentaram um aumento na mortalidade, entre outros danos, confirmando a importância do RNI na resistência à infecção tuberculosa (CHAN et al 1995).

Em um outro estudo pode-se observar que os macrófagos de cobaias infectados por *M. tuberculosis* (28 dias) produziram de três a quatro vezes mais ON que os macrófagos obtidos no 7º dia da infecção (NABESHIMA et al 1999).

A administração de inibidores de iNOS em camundongos reduziu sua sobrevivência de 120 dias para 28 dias (CHAN et al 1995). Em outro estudo, camundongos com TB latente foram inoculados por seis meses com inibidores de iNOS, aminoguanidina, resultando no recrudescimento da infecção crônica e evoluindo para morte (FLYNN et al 1998).

O'BRIEN et al (1994) demonstraram que ocorrem diferenças de cepas para cepas na susceptibilidade a produtos químicos de RNI de isolados clínicos de *M. tuberculosis* e que sua resistência relativa “in vitro” correlaciona-se bem com sua virulência em cobaias.

1.2.1 Estudos em humanos sobre a ação do óxido nítrico

As células fagocíticas são a primeira linha de defesa contra as micobactérias e suas capacidades em inibir o crescimento ou matar *M. tuberculosis* podem determinar o curso da infecção. As células humanas envolvidas nesta resposta são os neutrófilos, monócitos e os macrófagos alveolares (ASTON et al 1998).

Até 1.993 havia uma controvérsia sobre a importância do RNI no controle de patógenos em humanos (SCHNEEMANN et al 1993). No entanto, alguns estudos têm detectado ON em macrófagos humanos (FRIEDMAN et al 1997). NICHOLSON et al (1996), demonstraram que macrófagos alveolares humanos de pacientes com TB induzem a iNOS, uma enzima responsável pela produção de RNI, sugerindo que RNI pode exercer uma função no controle do bacilo da TB por esses macrófagos. NOZAKI et al (1997), mostraram que iNOS produzida em macrófagos alveolares humanos podiam controlar a replicação de *M. bovis* BCG “in vitro”.

MANCA et al (1999) demonstraram que as diferenças observadas na resposta ao hospedeiro em cobaias também são observadas em monócitos humanos.

WANG et al (1998), encontraram um aumento de ON em pacientes com TB pulmonar ativa e mostraram que isso ocorre devido à regulação da iNOS em macrófagos alveolares.

1.3 Utilização da epidemiologia molecular para identificação de subtipos genéticos com características específicas de virulência

A caracterização molecular de cepas de *M. tuberculosis* pelo método de “Restriction Fragment Length Polymorphism” RFLP (polimorfismo ao comprimento dos fragmentos obtidos, após digestão com enzimas de restrição), tem sido utilizada por mais de uma década. Este método tem permitido compreender a transmissão da TB em surtos e em comunidades abertas, como também na investigação da expansão de cepas virulentas de *M. tuberculosis* (ALLAND et al 1994, FRIEDMAN et al 1997, SMALL et al 1994, VALWAY et al 1998).

Esse método tem se mostrado um excelente instrumento para o rastreamento de marcadores biológicos encontrados em cepas com maior capacidade de disseminação em populações humanas. Estudos têm demonstrado que certas cepas de *M. tuberculosis*, obtidas de humanos, tem maior capacidade de disseminação em

áreas geograficamente limitadas, sendo que uma dessas cepas mostrou-se altamente resistente ao RNI, sugerindo que essa característica seja um marcador associado a maior capacidade de disseminação de cepa mais virulenta (FRIEDMAN et al 1997, VALWAY et al 1998). Portanto, já existem evidências de que a resistência ao RNI pode exercer um importante papel na capacidade do microorganismo em disseminar-se numa comunidade.

Um estudo epidemiológico realizado na cidade de Nova York, entre 1.992 e 1.993, demonstrou que a “cepa denominada C” de *M. tuberculosis* sensível à todas as drogas anti tuberculose e mais freqüentemente encontrada em circulação pela cidade (9%) era altamente resistente ao ON (FRIEDMAN et al 1997).

Em outro estudo, efetuado entre pacientes portadores de TB, HIV positivos e negativos, atendidos em dois ambulatórios de referência da cidade de São Paulo sugere que um número limitado de cepas de *M. tuberculosis*, identificadas pelo método de RFLP-IS6110 tendem a predominar entre os pacientes de TB nesta cidade (FERRAZOLI et al 2000). Nesse mesmo estudo foi detectada a existência de dois grupos geneticamente distintos de *M. tuberculosis* denominados A e SP, que abrangem cerca de 26% dos isolamentos independentemente, dos pacientes serem ou não infectados por HIV. Como mencionado anteriormente fato semelhante, também, foi observado em outras metrópoles como é o caso de Nova York, onde a alta taxa de TB causada por micobactérias multi-resistentes a drogas (TB-MDR) foi atribuída a um número limitado de cepas (FRIEDMAN et al 1997).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar a susceptibilidade ao óxido nítrico com os perfis genéticos de cepas de *M. tuberculosis*.

2.2 Específicos

Identificar e caracterizar cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes residentes na cidade de São Paulo pelo método de RFLP-IS6110, analisando o perfil genético.

Determinar os níveis de resistência ao marcador biológico “óxido nítrico”, de cepas de *M. tuberculosis*, isoladas de pacientes residentes na cidade de São Paulo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Identificação e caracterização das cepas

Foram estudadas cepas de *M. tuberculosis* isoladas de escarro de pacientes com TB pulmonar (uma de cada paciente), durante o período de 1º de março de 2000 a 30 de maio de 2002, atendidos em três instituições localizadas na zona norte do município de São Paulo, (CRT-DST/AIDS municipal de Santana, CRT-DST/AIDS municipal de Freguesia do Ó e Complexo Hospitalar do Mandaqui). Essas instituições atendem pacientes residentes na zona norte do município, composta por 13 subdistritos (Tremembé, Tucuruvi, Santana, Jaçanã, Vila Medeiros, Vila Guilherme, Mandaqui, Casa Verde, Vila Maria, Freguesia do Ó, Limão e Vila Nova Cachoeirinha).

A cepa de referência de *M. tuberculosis* utilizada no ensaio genético foi a Mt 14323 (van EMBDEN *et al* 1993) e no teste de susceptibilidade ao óxido nítrico, foram utilizadas como controle as cepas H37Rv - ATCC 27294 e H37Ra- ATCC 25177.

3.2 Diagnóstico laboratorial da tuberculose

Os exames bacteriológicos para o diagnóstico de TB pulmonar foram realizados nos laboratórios do CRT-DST/AIDS da Freguesia do Ó e do Complexo Hospitalar do Mandaqui.

As amostras de escarro foram submetidas a exames microscópicos (baciloscopias) após coloração pela técnica de Ziehl Neelsen (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994) e a cultura para o isolamento do *M. tuberculosis* pela técnica de Ogawa-Kudoh (SUSEMICH I *et al* 1993).

As culturas positivas foram submetidas aos testes de identificação (COLLINS *et al* 1997). Para a realização destes testes as culturas foram subcultivadas em dois tubos contendo o meio de Löwenstein Jensen (L-J) (MINISTÉRIO DA SAÚDE 1994), sendo um deles acrescido de 500 µg/ml de ácido para-nitrobenzoico (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, EUA) e outro de 2 µg/ml de hidrazida do ácido tiofeno-2-carboxílico. A identificação do *M. tuberculosis* foi feita com base nas

características das culturas e na inibição do crescimento pelo ácido para-nitrobenzoico, e não inibição pelo ácido tiofeno-2-carboxílico (COLLINS et al 1997).

Para conservação das cepas, uma alçada de cada cultura de *M. tuberculosis* foi inoculada em criotubos de 2 ml contendo miçangas de vidro imersas em 500 µl de meio de Sauton acrescido de 10% glicerol (anexo I). Após homogeneização o meio foi retirado e as miçangas mantidas a -70°C (KIRSOP e DOYLE 1999).

3.3 Caracterização das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, quanto ao perfil genético pelo método de RFLP-IS6110

As cepas identificadas no período de 26 meses do estudo foram submetidas ao método de RFLP-IS6110, de acordo com as recomendações propostas por van EMBDEN et al 1993, seguindo os seguintes passos:

3.3.1 Extração e purificação do DNA bacteriano

Uma porção da cultura (aproximadamente 40 mg, peso úmido) de cada uma das cepas de *M. tuberculosis* isoladas e da cepa de referência Mt 14323 foi transferida, com o auxílio de uma alça descartável para um tubo tipo Eppendorf contendo 500 µl de água ultrapura, obtida por filtração pelo aparelho Milli Q Millipore, esterilizada e incubada em banho-maria a 80°C por 30 min.

Após a centrifugação a 12.000 rpm durante um minuto em microcentrifuga (Fisher Scientific Company, Springfield, NJ, EUA), o sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram acrescentados 500 µl de solução tampão TE (anexo II-a) e 50 µl de solução de lisozima (anexo II-b) e a solução foi incubada a 37°C por 18 hs (“solução 1”). Um volume de 6 µl da solução de proteinase K (anexo II-c) e 70 µl da solução de DSS (anexo II-d) foram adicionados a “solução 1” e as preparações foram incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos, (“solução 2”).

Em seguida, foram adicionados 100 µl de uma solução de NaCl 5M e 80 µl da solução CTAB-NaCl (anexo II-e), previamente aquecida (“solução 3”). As preparações foram novamente incubadas em banho-maria a 65°C por 10 minutos. Posteriormente, foram adicionados 700 µl de uma mistura de clorofórmio/álcool

isoamílico na proporção de 24:1, e as preparações foram centrifugadas a 12.000 rpm por 1 minuto, onde se observou a formação de duas fases de densidade diferentes (“solução 4”).

A fase superior de cada preparação foi transferida para tubos do tipo Eppendorf esterilizados contendo 450µl de isopropanol. A mistura foi homogeneizada delicadamente e, após precipitação do DNA a -20°C por 18 hs, os tubos foram submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Os sedimentos foram lavados com etanol a 70% (previamente resfriado a -20°C) e submetidos à centrifugação a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Após a secagem à temperatura ambiente, os sedimentos foram suspensos em 30 µl de solução tampão TE (anexo II-a), mantidos sob refrigeração por 2 hs e em seguida armazenados a -20°C.

Para verificar a integridade do DNA obtido, 1 µl de cada preparação foi diluído em 10 µl de solução tampão TE (anexo II-a), acrescido de 4 µl de solução de arraste (anexo II-g) e submetido à eletroforese em gel de agarose (Invitrogen life technologies, Nova Zelândia) a 1,0% em solução tampão TAE uma vez concentrado (anexo II-f).

A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Sigma) a 50 volts (fonte EPS 200, Pharmacia Biothec, Uppsala, Suécia) até a introdução do material no gel e, posteriormente, a 100 volts por 40 minutos. Após este período, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (anexo II-q) por 15 minutos e examinado sobre uma fonte de luz ultra violeta de 254 nm (Pharmacia Biothec).

O gel foi fotografado com câmera instantânea (Polaroid, modelo MP-4 Land, Polaroid Corporation, Cambridge, MA, EUA), utilizando-se um filme de alta sensibilidade (Polaroid 667) e um filtro laranja (Kodak Eastman). Quando o DNA não foi visualizado como uma faixa compacta na parte superior do gel, os procedimentos de extração e purificação foram novamente efetuados.

3.3.2 Quantificação e digestão

Para determinar a concentração de DNA, 2 µl das preparações purificadas como descrito no item 3.3.1. foram diluídos em 200 µl de solução tampão TE (anexo II-a) e submetidos à leitura da absorbância em espectrofotômetro específico

(GeneQuant II, Pharmacia Biotech). Aproximadamente 3 μg de DNA de cada preparação foram transferidos para tubos tipo Eppendorf esterilizados e foram adicionados: 5 unidades (U) da enzima de restrição *Pvu* II, 2 μl da solução tampão específica (NaCl 50 mM, Tris- HCl 10 mM, MgCl_2 10 mM, DTT 1 mM, pH 7,9 – New England – Biolabs, Beverly, MA, EUA) e água purificada esterilizada para completar o volume final de 20 μl . Os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 4 hs.

3.3.3 Separação e transferência para membrana

A mistura de DNA e enzima preparada como descrito no item 3.3.1 foram acrescidos 6 μl da solução de arraste (anexo II-g) e estas preparações foram aplicadas nos orifícios de gel de agarose (20X20cm) a 1% em solução tampão TAE (anexo II-f) uma vez concentrado. Em cada gel, foi incluído o DNA da cepa de referência Mt 14323 em ambas as posições laterais e uma na região central. A separação por eletroforese foi realizada a 30 volts durante o período de 17 hs e à temperatura ambiente. A coloração do gel, a visualização do DNA e o registro fotográfico foram realizados como descrito no item 3.3.1.

Os procedimentos para despurinação, desnaturação, neutralização e transferência dos fragmentos de DNA separados no gel de agarose para as membranas de náilon foram realizados sob pressão de 50 mbar, utilizando-se o equipamento Vacu Gene XL Vaccum Blotting System (Pharmacia Biotech). Cada gel foi colocado sobre uma membrana de náilon (Boehringer Mannheim), coberto com 20 ml das seguintes soluções: a) solução de despurinação (anexo II-i) por sete minutos, b) solução desnaturante (anexo II-j) por sete minutos; c) solução neutralizante (anexo II-l) por sete minutos, e d) solução SSC 20X (anexo II-h) por 30 minutos.

Em seguida, as membranas foram lavadas rapidamente em solução SSC (anexo II-h) diluída dez vezes e mantida a 37°C por 30 minutos para secagem. Para a fixação dos fragmentos de DNA, as membranas foram expostas a 120.000 μjoules de radiação ultravioleta (Stratalinker UV crosslinker, modelo 1800, Stratagene, La Jolla, CA, EUA) por aproximadamente 20 segundos.

3.3.4 Preparo da sonda genética

O DNA utilizado como sonda consiste em uma seqüência de 245 pb do elemento de inserção *IS6110* e foi preparado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos oligonucleotídeos iniciadores: INS1 - 5' CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC e INS2- 5' GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA, (van EMBDEN et al 1993).

Uma pequena porção da cultura da cepa de Mt 14323 em meio de L-J foi transferida para um tubo tipo Eppendorf, contendo 500 µl de água ultrapura esterilizada, fervida por dez minutos, congelada a -20°C e descongelada no momento da reação.

Um volume de 5 µl desta preparação foi adicionado a 11 tubos com capacidade para 200 µl, mantidos em banho de gelo em uma câmara de fluxo laminar, contendo os seguintes reagentes para PCR (Pharmacia Biotech): solução tampão (Tris-HCl 10 mM-pH8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM), MgCl₂ 1mM, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfatado (dATP, DCTP, dGTP, dTTP), 25 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador (INS1 e INS2), 1,0 U de *Taq* DNA-polimerase e água ultrapura esterilizada para completar o volume de 50 µl. Em um tubo, em lugar da preparação de DNA da cepa de referência, foram colocados 5 µl de água ultrapura esterilizada como controle negativo da reação.

Os tubos foram transferidos para um termociclador (GeneAmp PCR System 9600, Perkin Elmer Company, Norwalk, CT, EUA), e foram aquecidos a 94°C por dez minutos para a desnaturação do DNA e submetidos a 30 ciclos de amplificação, constituídos de um minuto a 94°C (desnaturação), dois minutos a 56°C (hibridação) e 1 minuto a 72°C (extensão).

Um volume de 10 µl da preparação foi submetido à eletroforese em gel de agarose como descrito no item 3.3.1. Como padrão de tamanho molecular foi adotado o marcador de DNA "Ladder" de 100 pb (Pharmacia Biotech). A coloração, visualização e documentação do produto amplificado foram considerados corretos, quando uma banda de 245 pb foi observada contra o marcador de DNA "Ladder" 100 pb acima mencionado.

3.3.5 Purificação e marcação da sonda de DNA

Um volume de 500 µl do material amplificado (item 3.3.4) foi acrescido de 50 µl de uma solução esterilizada de acetato de sódio (3 M, pH 5,2) e 1,1 ml de etanol previamente refrigerado a -20°C e a mistura foi mantida a -20°C por 18 hs.

Após centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos em microcentrifuga (Fisher Scientific), o sedimento foi lavado com etanol 70% refrigerado, mantido à temperatura ambiente até a completa secagem e suspenso em 500 µl de solução tampão TE (anexo II-a). Para a marcação com digoxigenina (DIG) 11-dUTP (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim), aproximadamente 1 µg da sonda de DNA, cuja concentração foi determinada como descrito no item 3.3.2, foi desnaturado pela fervura por 10 minutos e resfriamento rápido em banho de gelo.

A seguir foram adicionados os seguintes reagentes: 2 µl da mistura de hexanucleotideo, 2 µl da mistura de desoxirribonucleotideo, 1 µl do reagente contendo o fragmento Klenow da DNA Polimerase I (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) e água ultrapura esterilizada para completar o volume para 20 µl. Após incubação do tubo em banho-maria a 37°C por 18 hs, foram adicionados 2,5 µl de uma solução de LiCl₂ 4 M e 75 µl de etanol 95% refrigerado e a preparação foi mantida a -20°C por 18 hs.

O sedimento obtido pela centrifugação a 12.000 rpm por 20 minutos foi, então, lavado com etanol 70% refrigerado, mantido à temperatura ambiente para secagem, suspenso em 50 µl de solução tampão TE (anexo II-a) e armazenado a -20°C.

3.3.6 Quantificação da sonda de DNA marcada

Para a determinação da concentração da sonda de DNA marcado, as preparações obtidas como descrito no item 3.3.5 foram diluídas em séries (razão 10) em solução tampão específica (Genius DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) e 1 µl de cada diluição foi aplicado em uma membrana de náilon (Boehringer Mannheim).

Após a fixação do DNA como descrito no item 3.3.3, a membrana foi colocada em uma placa de Petri, umedecida com solução tampão 1 (anexo II-m) e imersa em 10 ml da solução tampão 2 (anexo II-p) por cinco minutos.

O anticorpo contra DIG (DIG DNA Labelling and Detection Kit, Boehringer Mannheim) conjugado a fosfatase alcalina, diluído 1:5.000 em solução tampão 2 (anexo II-p), foi adicionado e, após 5 minutos, retirado com a realização de duas lavagens consecutivas da membrana com solução tampão 1 (anexo II-m) por cinco minutos.

A solução tampão 3 (anexo II-r) foi adicionada e retirada após dois minutos. A revelação da reação antígeno-anticorpo foi realizada pela adição de 10 ml da solução de revelação (anexo II-s). A membrana foi mantida ao abrigo da luz e examinada periodicamente quanto ao aparecimento de cor. Após secagem da membrana, foi feita a estimativa da concentração de DNA seguindo a escala de cores fornecida pelo fabricante.

3.3.7 Hibridação do DNA bacteriano com a sonda de DNA marcada

As membranas contendo os fragmentos de DNA preparadas como descrito no item 3.3.3 foram envoltas em uma tela de náilon colocadas em tubos de vidro específicos, com a face contendo DNA voltada para cima.

Depois de umidificadas por dois minutos com a solução SSC (anexo II-h) diluída dez vezes, as membranas foram incubadas com 10 ml da solução de hibridação, contendo aproximadamente 15 η g de sonda de DNA marcada, previamente, desnaturada (100°C por dez minutos e resfriamento em banho de gelo por cinco minutos).

Após hibridação a 42°C por um período de 16-18 hs, as membranas foram lavadas quatro vezes. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 50 ml de solução tampão A (anexo II-n) à temperatura ambiente por cinco minutos e as demais lavagens com 50 ml de solução tampão B (anexo II-o) a 68°C por quinze minutos. Após o tratamento com 50 ml da solução tampão 1 (anexo II-m) por 3 minutos, as membranas foram mantidas em 80 ml da solução tampão 2 (anexo II-p) à temperatura ambiente por 30 minutos. Esta solução foi substituída por 20 ml da

solução tampão 2 (anexo II-p) e 4 µl do anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina.

Após incubação à temperatura ambiente por 30 minutos, as membranas foram submetidas a duas lavagens em 50 ml de solução tampão 1 (anexo II-m) à temperatura ambiente por 15 minutos, retiradas do tubo de vidro e colocadas em um recipiente de vidro pirex contendo 20 ml de solução tampão 3 (anexo II-r) por três minutos.

Após revelação colorimétrica realizada como descrito no item 3.3.6, as membranas foram mantidas a 37°C para secagem e armazenadas ao abrigo de luz.

3.3.8 Análise do perfil genético das cepas

O perfil genético de cada cepa de *M. tuberculosis* foi analisado visualmente e com o auxílio do programa de computação GelCompar II, versão 2.0 para “Windows” (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

A análise com este programa foi feita com base na cópia das membranas obtidas por um equipamento programado para 75 DPI (“scanner”, Sharp, Mahwah, NJ, EUA), após o alinhamento dos fragmentos de DNA das preparações teste com os da preparação da cepa de referência Mt 14323 (PM = 14.4, 7.2, 7.0, 4.4, 3.6, 3.0, 2.3, 2.0, 1.8, 1.5, 1.4, 1.0 kb), aplicados na posição central e em ambas às posições laterais de cada gel.

O número de cópias da IS6110 foi determinado de acordo com o número de fragmentos de DNA hibridados com a respectiva sonda e visualizados em forma de banda compacta na membrana de náilon. Para cada banda visualizada, considerou-se uma cópia da IS6110.

A comparação dos perfis genéticos designados aleatoriamente, por números e/ou letras do alfabeto, resultou na classificação das cepas em pertencentes ou não a um grupo genético. Cepas que apresentavam bandas de DNA idênticas em número e peso molecular, consideradas, portanto, de mesmo perfil genético foram classificadas como pertencentes a um determinado grupo genético.

Grupos genéticos que apresentavam mais que 70% de similaridade, foram considerados como pertencentes a uma família de grupos genéticos. Cepas com perfil genético únicos foram caracterizadas como não pertencentes a um grupo genético.

Para a construção do dendograma, os perfis genéticos foram comparados com base no peso molecular e no número de cópias de fragmentos hibridados com a sonda IS6110 pelo método UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Dice, seguindo as instruções do manual do Programa GelCompar II, versão 2.0 (Applied Maths).

3.4 Caracterização das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* quanto ao perfil de susceptibilidade ao óxido nítrico (ON)

A avaliação da susceptibilidade ao ON foi feita de acordo com o método descrito anteriormente por FRIEDMAN et al 1997.

3.4.1 Preparo da suspensão bacteriana

A partir de um primo-isolamento em meio de L-J, foi retirada uma porção de cultura (aproximadamente 40mg, peso úmido) e transferida com o auxílio de uma alça descartável para um tubo de rosca (12X120mm) esterilizado contendo 3ml do meio de Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit Michigan, USA) com glicerol (Lab Synth Produtos Laboratórios, SP, BRA), tween 80 (Vetec Química Fina Ltda, RJ, BRA) e o enriquecimento ADC (Difco Laboratories, anexo III-a) e estas incubadas a 37°C por aproximadamente sete dias.

Após este período, as culturas foram transferidas (sem os grumos visíveis de bactérias) para frascos de vidro com tampa de rosca esterilizados contendo 30 ml do mesmo meio (anexo III - a). Para controle da contaminação, uma gota de cada cultura foi semeada em meio de agar chocolate e incubados a 37°C por 24 horas (anexo III-b).

Os frascos foram então incubados 37°C por aproximadamente dez dias. Aproximadamente 3 ml dessas culturas foram submetidas a leitura da densidade óptica em espectrofotômetro, no comprimento de onda 540nm. As culturas que alcançaram uma densidade óptica entre 0,25 e 0,30 com turbidez equivalente a aproximadamente $4,0 \times 10^7$ bactérias/ml, foram transferidas para vênulas de polipropileno esterilizadas de 50 ml e centrifugadas (Fanen, SP, BRA) a 4.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e 7,5 ml do meio de Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) com glicerol (Lab Synth, anexo III-

c) foi adicionado ao sedimento. Em seguida, os tubos foram homogeneizados em agitador tipo “vortex” (Fanen) e as suspensões filtradas em membrana de poro de 5 µm (Pall, Gelman Laboratory, Michigan USA). Para este procedimento foi utilizada uma seringa descartável de 10 ml. As suspensões obtidas foram divididas em volumes de 500 µl em quatro tubos tipo Eppendorf e congeladas a -70°C .

3.4.2 Preparação dos meios de cultura

De cada cepa estudada, foram preparados dois tubos, um para controle e outro para teste. No tubo controle foi adicionados 900 µl do meio de Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) que foi acrescido de glicerol (Lab Synth) e do enriquecimento ADC (Difco Laboratories), com pH 5,2 (anexo III-d).

No tubo teste foi adicionado 894 µl do meio de Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories) que foi acrescido de glicerol e do enriquecimento ADC (Difco Laboratories), com pH 5,2 (anexo III-d) e mais 6 µl de uma solução esterilizada por filtração, com filtro de poro de 0,22 µm (Millipore Ind. e Com. Ltda, BRA) de NaNO_2 a 1 M (anexo III-e), obtendo um concentração final de 6 mM neste tubo.

3.4.3 Exposição ao óxido nítrico

Duas alíquotas de 100 µl, previamente descongeladas, de cada suspensão de 500 µl (item 3.5.1) foram homogeneizadas em vortex (Fanen) e adicionadas respectivamente nos tubos controle e teste (item 3.5.2). Ambos os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas.

3.4.4 Avaliação da sobrevivência das cepas expostas ao óxido nítrico

A avaliação da sobrevivência das cepas de *M. tuberculosis* expostas ao ON foi realizada por meio do subcultivo das amostras controle e teste em meio de Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, anexo III-f), após diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-3} .

Para o preparo das diluições de 10^{-1} , tanto do tubo controle quanto o de teste (item 3.4.3) foi realizada diluições com a adição de 100 µl da amostra controle e 100 µl da amostra teste, previamente homogeneizada em vortex (Fanen) em um tubo

contendo 900µl de água ultrapura esterilizada. Duas outras diluições foram feitas a partir desta, para obtenção das diluições 10^{-2} e da 10^{-3} .

As placas contendo meio de Middlebrook 7H11 (Difco Laboratories, anexo III-f) acrescido de enriquecimento OADC (Difco Laboratories) foram divididas em quadrantes devidamente marcados com as diluições (10^{-1} a 10^{-3}). Em cada quadrante foram inoculadas três gotas de 20 µl de cada uma das diluições. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, e examinadas com 7, 15 e 20 dias (Anexo IV). As unidades formadoras de colônias (UFC) foram enumeradas, tanto nas placas controles quanto nas placas testes. A contagem foi realizada na diluição que apresentou crescimento igual ou superior a 50 UFC na placa teste (Anexo V).

Quando o controle não apresentava o crescimento maior ou igual a 50 UFC, o experimento foi repetido.

3.4.5 Cálculo da taxa de sobrevivência

Para o cálculo das taxas de sobrevivência, os resultados obtidos no (item 3.4.4) foram anotados em um formulário padronizado e posteriormente digitados no programa de computação Excel (Microsoft , USA) configurado para os cálculos a seguir:

$$\text{UFC/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de colônias nos } 60 \mu\text{l (três gotas)} \times 16.7 (1.000\mu\text{l}/60\mu\text{l}) \times 1/\text{fator da diluição}$$
$$\text{Taxa de sobrevivência} = \text{UFC-Teste}/\text{UFC-Controle} \times 100$$

3.4.6 Análise dos dados

A análise foi realizada utilizando o programa de computador Epi-info versão 6.04C (Center for Disease Control and Prevention, GA, Atlanta, EUA) onde foram armazenados os dados sobre os perfis genéticos obtidos pelo método de RFLP-IS6110 e as taxas de sobrevivência das cepas de *M. tuberculosis* expostas ao óxido nítrico.

3.5 Aspectos éticos

Este projeto utilizou cepas identificadas por números, não envolvendo diretamente seres humanos e estas cepas fazem parte do Projeto Epidemiologia Molecular e Patogênese da Tuberculose em Área Metropolitana de São Paulo, que foi aprovado pelo Conselho Nacional de Saúde - CONEP. Parecer n.º 509/2001. Este projeto foi também aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo-COEP, no dia 11/03/03, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96, o protocolo de Pesquisa n.º 920.

4 RESULTADOS

4.1 Cepas bacterianas

No período de 1º de março de 2.000 a 30 de maio de 2.002 foram obtidas 419 cepas de *M. tuberculosis*. Todas as 419 cepas foram avaliadas quanto ao perfil genético pelo método de RFLP- IS6110 e quanto ao perfil de susceptibilidade ao ON.

Para 39 cepas não foi possível a obtenção dos resultados das taxas de sobrevivência ao ON pelas seguintes razões: 10 cepas estavam contaminadas, 14 não cresceram nos subcultivos e 15 cresceram em número menor do que 50 UFCs. Para essas 39 cepas foram realizadas várias tentativas para sua recuperação, todas sem sucesso.

Das 380 cepas (90,7%) que foram obtidas as taxas de sobrevivência ao ON, 167 foram isoladas de pacientes atendidos no CRT-DST Municipal da Freguesia do Ó, 126 do Complexo Hospitalar do Mandaqui e 87 do CRT-DST Municipal de Santana.

4.2 Perfil genético das cepas de *M. tuberculosis* definido pelo método de RFLP-IS6110

A análise do perfil genético das 419 cepas de *M. tuberculosis* pelo método de RFLP-IS6110 revelou que o número de cópias (bandas) da IS6110 variou de 3 a 19 (Figura 1). A grande maioria das cepas, 405 (96.6%) apresentou mais do que cinco cópias, tendo como mais predominante 8, 9, 10, 11, 12 e 13 cópias.

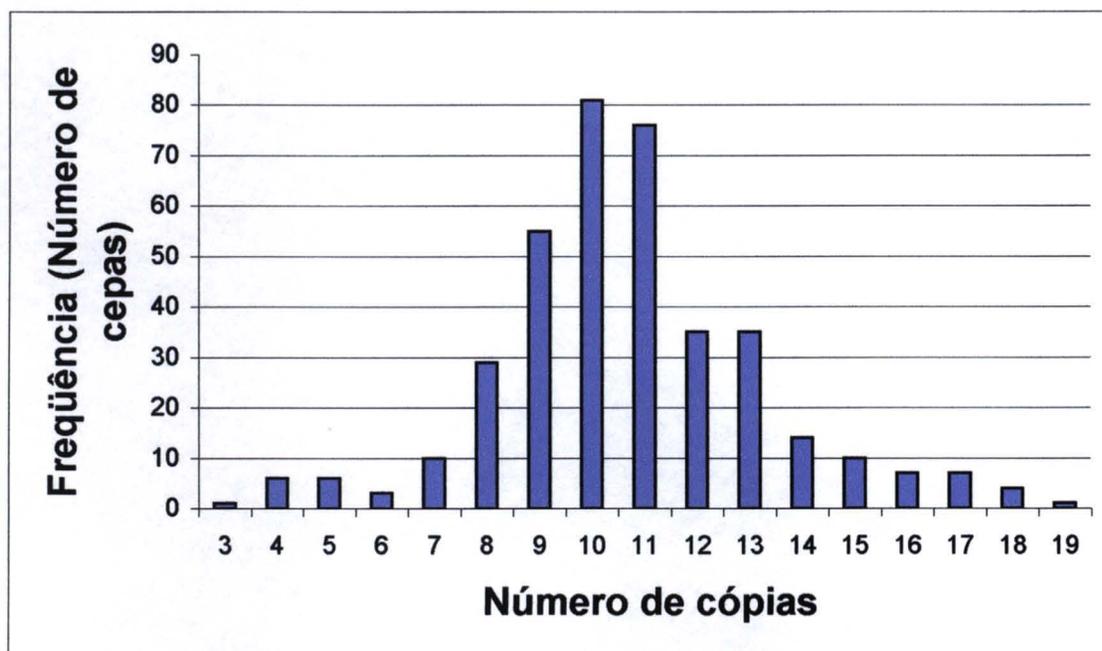


FIGURA 1 Número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, segundo número de cópias da IS6110, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002.

Entre as 419 cepas estudadas, foram detectados 270 perfis genéticos distintos e 208 cepas (49,6%) puderam ser classificadas em 59 grupos genéticos (Figura 2).

Os perfis genéticos (um de cada grupo) estão organizados por similaridade de acordo com o dendograma localizado à esquerda da Figura 2 e as bandas foram alinhadas, utilizando-se como referência a cepa Mt 14323, no programa Gelcompar II – V. 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica).

O número de cepas em cada grupo genético variou de 2 a 11 e 31 grupos genéticos foram compostos por mais de duas cepas como apresentados na Tabela 1 podendo ser melhor visualizada na Figura 3.

Dice (Tol 2.0%-2.0%) (P>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
RFLP

RFLP

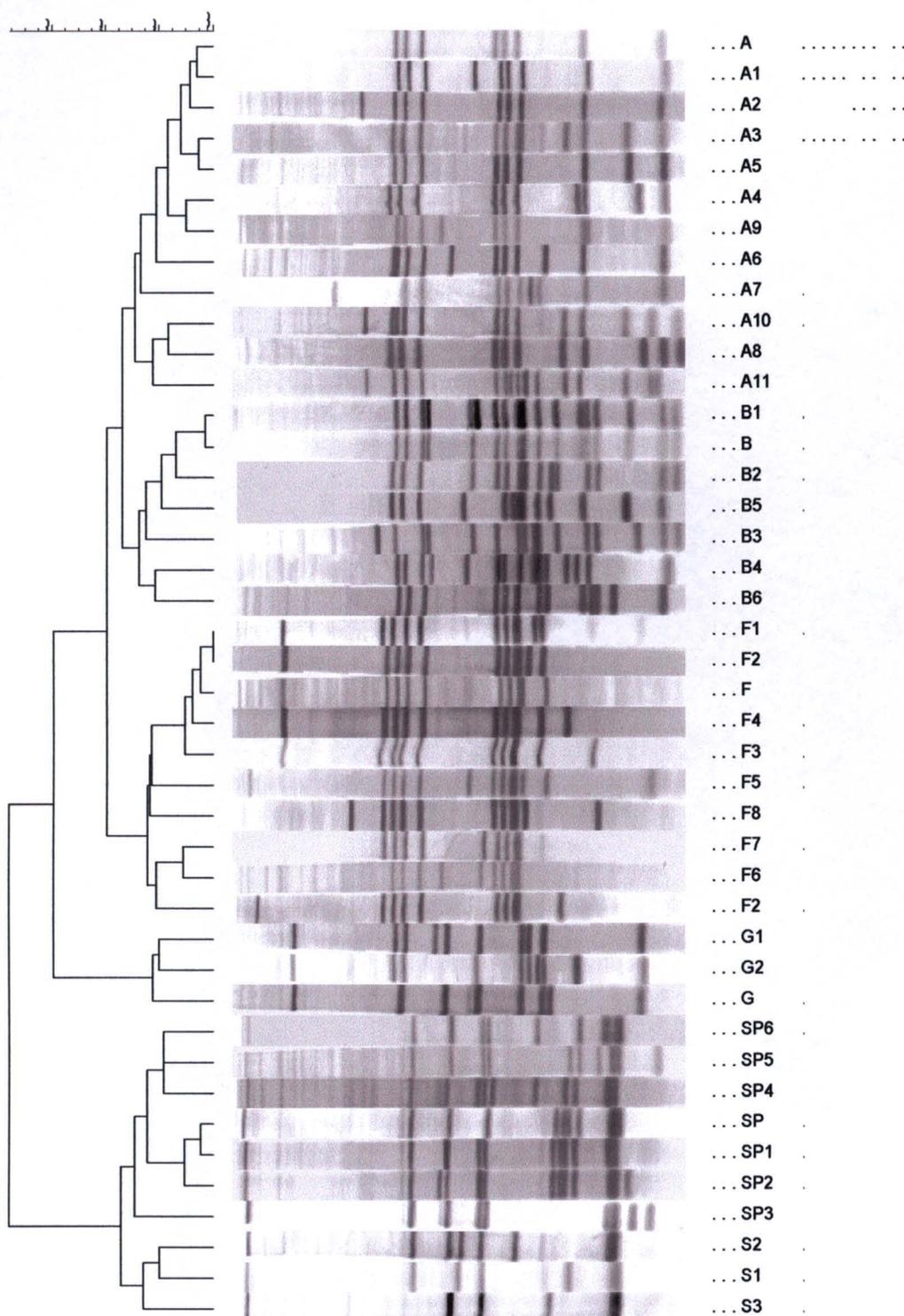


FIGURA 2 Perfis genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* definidos por RFLP-IS6110, de cepas provenientes de unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002.
(continua)

Dice (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-
RFLP**

RFLP

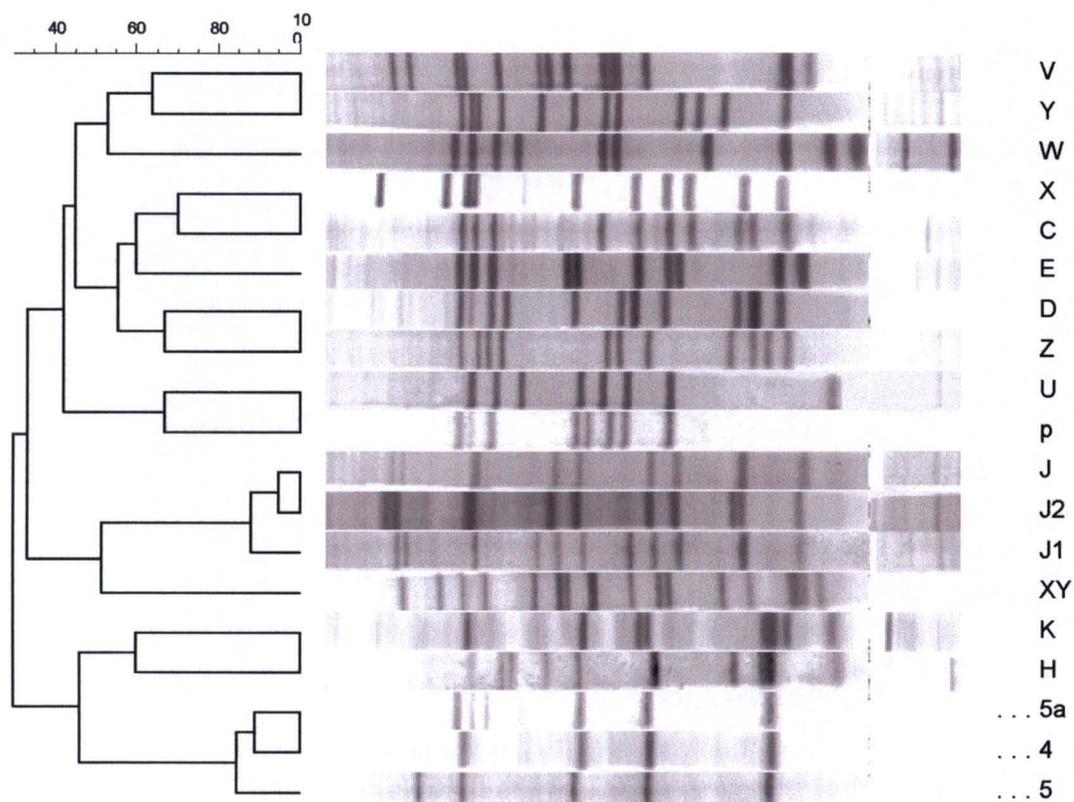


FIGURA 2 Perfis genéticos de *Mycobacterium tuberculosis* definidos por RFLP-IS6110, provenientes de unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002. (Continuação)

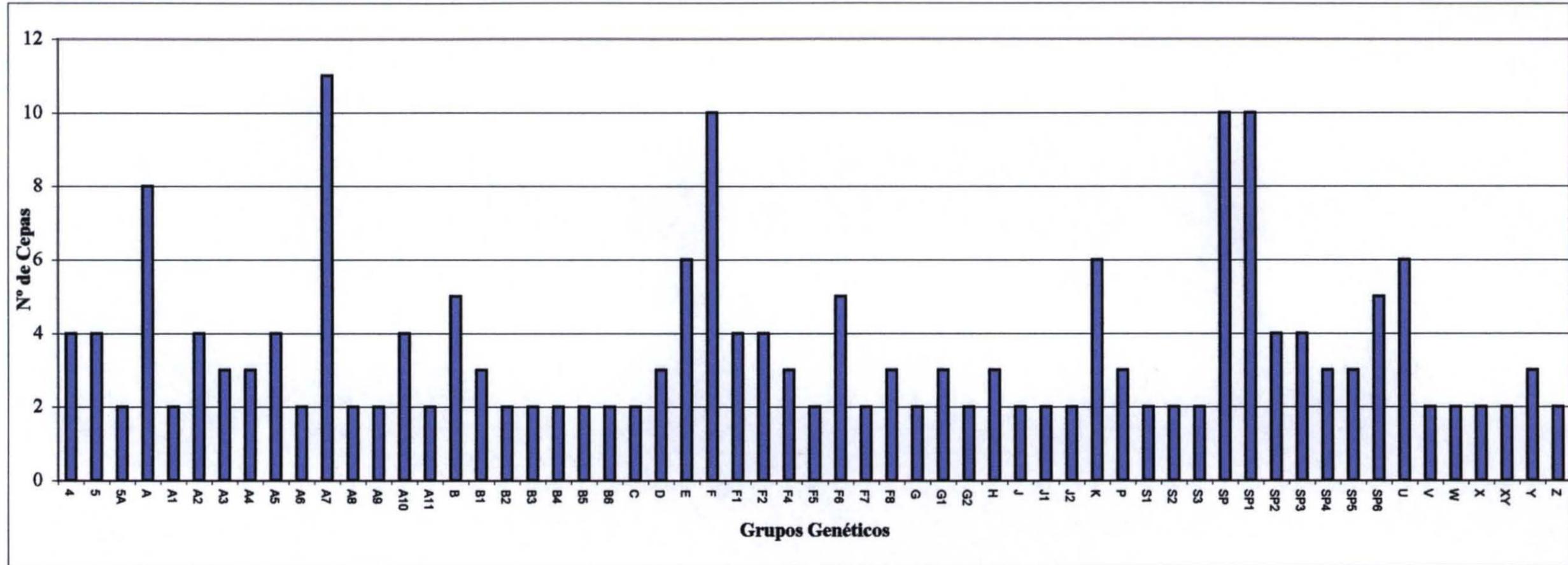


FIGURA 3 Número de cepas de *M. tuberculosis* segundo grupos genéticos (detectados pelo método de RFLP-IS6110), unidades de saúde da zona norte da cidade de São Paulo, SP - 2.000 a 2.002.

TABELA 1 Distribuição do número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* Segundo grupo genético e família (definidos pelo método de RFLP-IS6110), unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP de 2.000 a 2.002.

Grupos genéticos RFLP-IS6110	Famílias de grupos genéticos	Nº total de cepas
4	PB	4
5	PB	4
5A	PB	2
A	A	8
A1		2
A2		4
A3		3
A4		3
A5		4
A6		2
A7		11
A8		2
A9		2
A10		4
A11		2
B	B	5
B1		3
B2		2
B3		2
B4		2
B5		2
B6		2
C	-	2
D	-	3
E	-	6
F	F	10
F1		4
F2		4
F4		3
F5		2
F6		5
F7		2
F8		3

(Continua)

TABELA 1 Distribuição do número de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* segundo grupo genético e família (definidos pelo método de RFLP IS6110), unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, de 2.000 a 2.002. (Continuação)

Grupos genéticos RFLP-IS6110	Famílias de grupos Genéticos	Nº total de cepas
G	G	2
G1		3
G2		2
H	-	3
J	J	2
J1		2
J2		2
K	-	6
P	-	3
S1	S	2
S2		2
S3		2
SP	SP	10
SP1		10
SP2		4
SP3		4
SP4		3
SP5		3
SP6		5
U	-	6
V	-	2
W	-	2
X	-	2
XY	-	2
Y	-	3
Z	-	2
Sub-total		208
Perfil Único		211
Total		419

Avaliando a distribuição dos perfis genéticos das 419 cepas, observou-se que 188 (44,9%) pertenciam a três famílias de grupos genéticos (A, SP, F).

Entre as 208 cepas pertencentes a grupos genéticos (Tabela 1), 49 (23,5%) pertenciam a 5 grupos predominantes que apresentaram número de cepas maior ou igual a 8. Estes grupos são: A com 8 cepas, A7 com 11 cepas, F com 10 cepas, SP com 10 cepas e SP1 com 10 cepas conforme Figura 4.

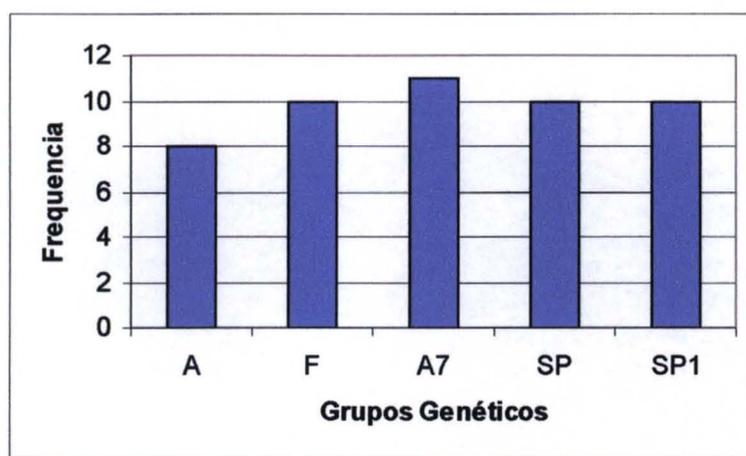


FIGURA 4 Número de cepas de *M. tuberculosis* encontrados em cada um dos cinco grupos predominantes (definidos pelo método de RFLP-IS6110), de unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP de 2.000 a 2.002.

4.3 Perfil de susceptibilidade das cepas de *Mycobacterium tuberculosis* ao óxido nítrico.

Das 419 cepas recebidas, foram obtidas as taxas de sobrevivência ao ON de 380 cepas. A distribuição destas cepas segundo o perfil genético e a taxa de sobrevivência ao ON está apresentado na Tabela 2.

TABELA 2 Número e proporção (%) de cepas de *M. tuberculosis* submetidas ao teste de susceptibilidade ao óxido nítrico e ao RFLP-IS6110, segundo grupos e famílias genéticas, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 a 2.002.

Grupos genéticos	Famílias de grupos genéticos	Nº de cepas submetidas aos testes de		
		RFLP-IS6110	ON	%
4	PB	4	4	100,0
5	PB	4	4	100,0
5A	PB	2	2	100,0
A	A	8	8	100,0
A1		2	2	100,0
A2		4	4	100,0
A3		3	3	100,0
A4		3	3	100,0
A5		4	4	100,0
A6		2	2	100,0
A7		11	11	100,0
A8		2	2	100,0
A9		2	2	100,0
A10		4	4	100,0
A11		2	2	100,0
B	B	5	2	40,0
B1		3	3	100,0
B2		2	2	100,0
B3		2	2	100,0
B4		2	2	100,0
B5		2	1	50,0
B6		2	2	100,0
C		2	2	100,0
D		3	3	100,0
E		6	6	100,0
F	F	10	10	100,0
F1		4	4	100,0
F2		4	4	100,0
F4		3	3	100,0
F5		2	2	100,0
F6	F	5	4	80,0
F7		2	2	100,0
F8		3	3	100,0
G	G	2	2	100,0
G1		3	3	100,0
G2		2	2	100,0
H		3	2	66,6

(Continua)

TABELA 2 Número e proporção (%) de cepas de *M. tuberculosis* submetidas ao teste de susceptibilidade ao óxido nítrico e ao RFLP - IS6110, segundo grupo e famílias genéticas, unidade de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002. (Continuação)

Grupos genéticos	Família de grupos genéticos	Nº de cepas submetidas aos testes de		
		RFLP	ON	%
J	J	2	2	100,0
J1		2	1	50,0
J2	J	2	2	100,0
K		6	6	100,0
P		3	3	100,0
S1	S	2	2	100,0
S2		2	2	100,0
S3		2	2	100,0
SP	SP	10	10	100,0
SP1		10	10	100,0
SP2		4	4	100,0
SP3		4	2	50,0
SP4		3	3	100,0
SP5		3	3	100,0
SP6		5	5	100,0
U		6	6	100,0
V		2	2	100,0
W		2	2	100,0
X		2	2	100,0
XY		2	1	50,0
Y		3	3	100,0
Z		2	2	100,0
Perfil Único		211	175	83,0
Total		419	380	91,0

RFLP = Restriction fragments length polymorphism

ON = óxido nítrico

Das 380 cepas que foram submetidas a exposição ao ON, 50 (13,2%) obtiveram como resultado 0.00, ou seja, não sobreviveram a exposição. Estas 50 cepas, como se pode observar na Tabela 3, não possuem uma frequência em nenhum grupo genético específico, estando espalhadas em 24 grupos genéticos e em 26 perfis únicos.

TABELA 3 Número e proporção (%) de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* que apresentaram resultado igual a zero nos testes de susceptibilidade ao óxido nítrico e número total de cepas segundo grupos genéticos, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP - 2.000 a 2.002.

GRUPOS GENÉTICOS	Nº TOTAL DE CEPAS	Nº de CEPAS ON = ZERO	%
A	8	1	12,5
A11	2	1	50,0
A2	4	1	25,0
A4	3	1	33,3
A5	4	1	25,0
A6	2	1	50,0
A7	11	2	18,0
F	10	1	10,0
F2	4	1	25,0
F5	2	1	50,0
F6	4	1	25,0
F7	2	1	50,0
F8	3	1	33,3
G	2	1	50,0
S1	2	1	50,0
SP	10	1	10,0
SP1	10	2	20,0
SP3	2	1	50,0
SP4	3	1	33,3
SP5	3	1	33,3
SP6	5	2	40,0
Subtotal	96	24	25,0
Perfil Único	26	26	100,0
TOTAL	122	50	25,2

ON = óxido nítrico

Entre as outras 330 cepas que foram avaliadas quanto ao perfil genético, a taxa média de sobrevivência, valor mínimo, valor máximo e o desvio padrão estão apresentados no Anexo VI, a taxa de sobrevivência variou entre 0,2 e 85%, com média de 15,5 d.p. \pm 16,7, como demonstrado na Tabela 4.(Anexo VI)

TABELA 4 Número e proporção (%) das cepas de *M. tuberculosis* segundo taxas de sobrevivência ao óxido nítrico, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP – 2.000 a 2.002.

TAXAS DE SOBREVIVENCIA Nº CEPAS %		
0.0	50	11,9%
0.1 - 5.0	111	26,4%
5.1 - 10.00	53	12,6%
10.1 - 15.0	43	10,2%
15.1 - 20.0	28	6,6%
20.1 - 25.0	27	6,4%
25.1 - 30.0	21	5,0%
30.1 - 35.0	16	3,8%
35.1 - 40.0	6	1,4%
40.1 - 45.0	2	0,5%
45.1 - 50.0	4	1,0%
50.1 - 55.0	2	0,5%
55.1 - 60.0	3	0,7%
60.1 - 65.0	5	1,2%
65.1 - 70.0	4	1,0%
70.1 - 75.0	3	0,7%
80.1 - 85.0	2	0,5%
Total	380	

Média = 15,5 % desvio padrão = 16,7%

As cepas de referência H37Ra e H37Rv também foram submetidos aos testes de susceptibilidade ao ON e apresentaram taxa de sobrevivência de 27,9% e 55,8%, respectivamente.

Os seus resultados foram comparados com as médias das taxas de sobrevivência de todos os grupos genéticos identificados pelo método de RFLP-IS6110 (Figura 5) e com as cepas predominantes como pode-se observar na Figura 6.

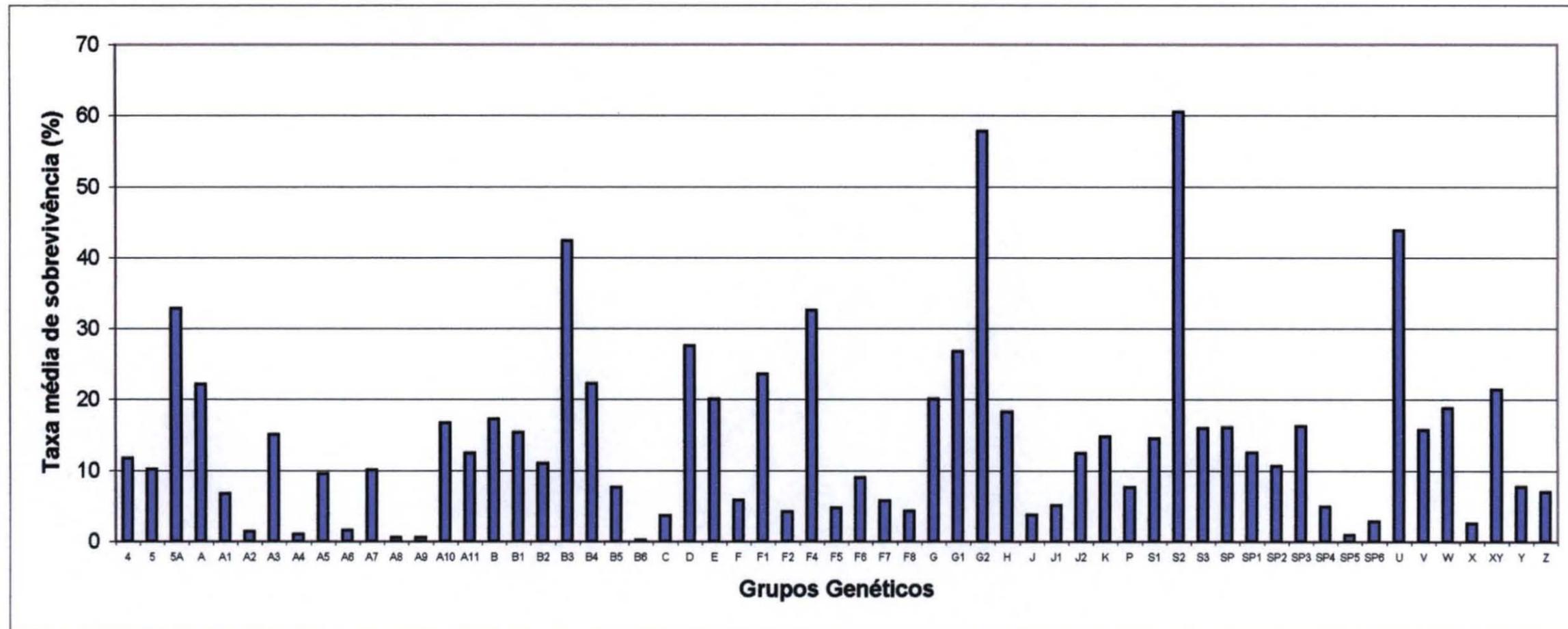


FIGURA 5 Taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico segundo grupos genéticos detectados pelo método de RFLP-IS6110 (de cepas de *M. tuberculosis*), unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP 2.000 – 2.002.

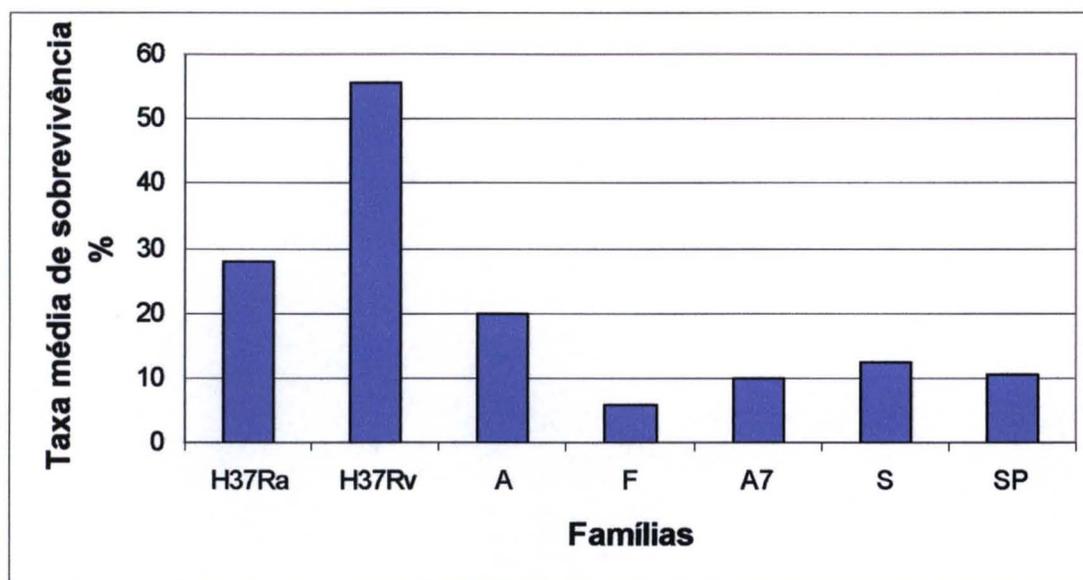


FIGURA 6 Taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico das cepas de *M. tuberculosis* segundo famílias genéticas predominantes e as cepas de referência H37Ra e H37Rv, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP - 2.000 a 2.002.

A taxa de sobrevivência à exposição ao ON das 49 cepas pertencentes a estes cinco grupos variou de 0 a 75% com média de $11,4 \pm d.p. 14,2$ (Figura 6).

A distribuição das médias de cada família está demonstrado na Figura 6, onde podemos observar que a família F apresentou uma menor taxa de sobrevivência ao ON, enquanto que a família A apresentou uma maior taxa.

A média da taxa de sobrevivência de cada um destes cinco grupos predominantes foi inferior a taxa de sobrevivência da cepa de referência avirulenta, H37Ra.

Entre os 59 grupos genéticos, 6 (10%) (5A, B3, F4, G2, S2 e U) apresentaram taxa média de sobrevivência à exposição ao ON superior a da cepa de referência H37Ra como observado na Figura 7. Três destes grupos apresentaram ainda, a taxa de sobrevivência ao ON ainda maior que a cepa de referência virulenta H37Rv.

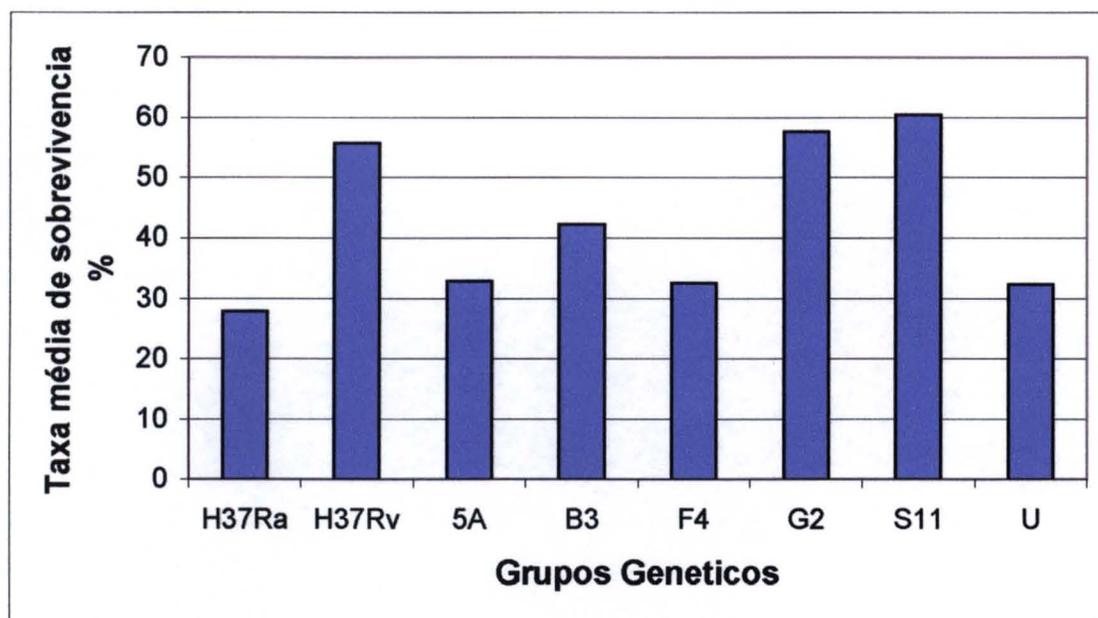


FIGURA 7 Taxa média de sobrevivência (%) ao óxido nítrico das cepas de *M. tuberculosis* segundo grupos genéticos com média acima das cepas de referência, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP - 2.000 a 2.002.

O número de cepas pertencentes a estes 6 grupos variou de dois a seis tendo um total de 17 cepas (Figura 8).

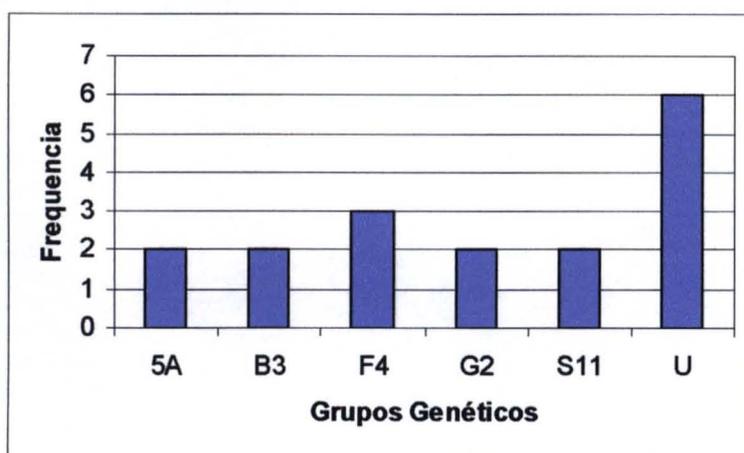


FIGURA 8 Número de cepas pertencentes aos grupos genéticos com taxa média de sobrevivência ao óxido nítrico superior à cepa de referência H37Ra, unidades de saúde da zona norte da Cidade de São Paulo, SP - 2.000 a 2002.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi proposta a identificação dos perfis genéticos predominantes de cepas de *M. tuberculosis* isoladas de pacientes residentes na cidade de São Paulo, e correlacioná-los com os níveis de resistência ao ON.

A realização da caracterização genética das cepas de *M. tuberculosis* foi realizada pelo método de RFLP-IS6110, segundo recomendações de van EMBDEN et al 1993. Neste estudo, verificou-se que, das 419 cepas analisadas por este método, 96,6% continham número superior a cinco cópias.

O perfil de cópias da IS6110 das cepas de *M. tuberculosis* analisadas neste estudo, assemelha-se ao encontrado em outros estudos realizados no Brasil (IVENS-de-ARAUJO et al 1998; FANDINHO et al 2000; FERRAZOLI et al 2000; CALUINE et al 2003) que se assemelham também aos perfis encontrados em países da Europa e Américas (SMALL et al 1994; HERMANS et al 1995; TORREA et al 1995, 1996; PINEDA-GARCIA et al 1997). Por outro lado difere do observado em alguns países da África e da Ásia onde 20-40% das cepas apresentam nenhuma ou poucas cópias da IS6110 (YUEN et al 1993; DAS et al 1995; YANG et al 1995; PALITTAPONGARNPIM et al 1997; PARK et al 2000).

Neste estudo foram identificados 59 grupos genéticos compostos por 208 cepas e dentre estes, foram encontrados 5 grupos predominantes (A, A7, F, SP, SP1) que juntos somam 23% de todas as 208 cepas agrupadas.

FERRAZOLI et al (2000), detectou em seu estudo a existência de dois grupos geneticamente distintos de *M. tuberculosis*, denominados de A e SP que abrangem 26% dos isolamentos na cidade de São Paulo. Estes mesmos perfis foram os encontrados neste estudo, evidenciando que as mesmas cepas continuam em circulação na cidade de São Paulo.

Estes dados estão de acordo com a literatura que tem demonstrado que em países onde a TB é endêmica há predominância de determinados grupos genéticos, sugerindo que onde a TB é endêmica haveria menos diversidade genética (van SOOLINGEN et al 1991; HERMANS et al 1995; KÄLLENIUS et al 1999).

As razões que contribuem para a seleção e disseminação de determinados grupos genéticos não estão completamente esclarecidas. HERMANS et al (1995) sugerem que a ampla vacinação com BCG poderia favorecer a seleção de determinadas cepas de *M. tuberculosis* por resistirem à proteção imunológica adquirida com essa vacina. Outros autores, porém, têm sugerido que fatores de virulência intrínsecos ao *M. tuberculosis* poderiam ser responsáveis por sua disseminação em uma comunidade (FRIEDMAN et al 1997, VALWAY et al 1998, ZHANG et al, 1999).

Então, baseando-se no conceito de que a capacidade dos fagócitos mononucleares destruírem ou controlarem a multiplicação de bactérias intracelulares, depende fundamentalmente de suas atividades microbicidas relacionadas à explosão respiratória, produção de ON e da resistência da tolerância bacteriana à ação tóxica destes metabólitos (KORNFELD et al 1987; KRAHENBUHL 1995; RILEY 1996; FRIEDMAN et al 1997).

Até o momento, há poucos estudos de base populacional, correlacionando resistência ao ON com determinada cepa de *M. tuberculosis* e um desses estudos foi realizado em Nova York, no ano de 1997, o qual demonstrou que a cepa predominante de *M. tuberculosis* era resistente ao ON. No entanto, neste estudo foi avaliado apenas uma cepa predominante, denominada C, responsável por 9% dos casos de TB demonstrando ser esta mais resistente que as cepas controles (FRIEDMAN et al 1997).

ZHANG et al (1999) em um estudo utilizando a cepa designada 210, que foi responsável por um grande número de casos de TB em Los Angeles demonstraram não apresentar resistência ao nitrito, em contraste com o demonstrado em Nova York com a cepa C. Sendo consistente com WALLIS et al (2001) que encontraram uma porcentagem de sobrevivência frente aos compostos nitrogenados inferiores àqueles demonstrados por FRIEDMAN et al (1997) para a cepa com maior disseminação na cidade de Nova York.

FIRMANI e RILEY (2002a) demonstraram que algumas cepas de *M. tuberculosis* foram resistentes a altas concentrações de ON, quando comparados com as cepas de referência H37R, H37Ra e BCG. Estes isolados clínicos foram

obtidos de dois surtos de TB nos Estados Unidos da América (surto em Kentucky – Tennessee e em Nova York).

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a resistência ao ON em um grande número de cepas de *M. tuberculosis* que foram isoladas no município de São Paulo em um período de 26 meses. Neste estudo não foi evidenciada nenhuma associação entre as cepas pertencentes aos grupos genéticos mais freqüentes em circulação na zona norte da cidade de São Paulo com a sua taxa de resistência ao ON, como representado na Figura 7.

Entre as 380 cepas estudadas, 50 não sobreviveram a exposição ao ON, sendo consideradas altamente sensíveis ao ON. Estas 50 cepas não apresentaram uma freqüência significativa em nenhum grupo genético, como demonstra a Tabela 3.

De um modo geral, conforme demonstrado em literatura (O'BRIEN et al 1994; RHOADES e ORME 1997; FIRMANI e RILEY 2002a), os resultados sugerem que os produtos RNI em altas concentrações são bactericidas. E o resultado encontrado neste estudo também demonstra isso, visto que as taxas de sobrevivência ao óxido nítrico obtidas pela maioria das cepas foram baixas, com média de 15,5% d.p. \pm 16,7, ficando abaixo da taxa apresentada pela cepa avirulenta H37Ra que foi 27,9%.

Seis grupos genéticos apresentaram uma taxa de sobrevivência ao ON acima da taxa obtida pela cepa avirulenta H37Ra e acima da média obtida entre todas as cepas estudadas 15,5% d.p. \pm 16,7 (Figura 7). Estes grupos são: 5A, B3, F4, G2, S11, U).

Apesar de apresentar uma taxa de sobrevivência ao ON elevada, estes grupos não apresentam um número grande de cepas, pois como pode-se observar na Figura 9, são 17 (0,04%) ao total, não sendo considerados grupos genéticos predominantes. Diferentemente da cepa denominada C que foi altamente resistente ao RNI e representou 9% dos isolamentos da cidade de Nova York entre 1.991 e 1.994 (FRIEDMAN et al 1997).

6 CONCLUSÕES

1. A análise das 419 cepas de *M. tuberculosis* pelo método de RFLP-IS6110, revelou 270 perfis genéticos, sendo que 211 (78,2%) apresentaram distintos perfis genéticos e 59 (21,8%) perfis comuns agrupados em grupos genéticos. Sendo cinco predominantes (A, A7, F, SP, SP1).
2. As taxas de sobrevivência ao ON das 380 cepas de *M. tuberculosis* obtidas variou de 0.0 a 85 %, com média de 15,5% d.p. \pm 16.7.
3. As taxas de resistencia ao ON das cepas predominantes, variaram de 0 a 75, apresentando uma média de 11,4% d.p. \pm 14,2, ficando abaixo da cepa de referência H37Ra e da média de todas as cepas analisadas. Portanto a expansão das cepas predominantes no município de São Paulo, não ocorre em razão de sua resistencia ao ON.
4. Dentre os grupos genéticos, seis não predominantes (5A, B3, F4, G2, S11 e U), apresentaram taxas de resistencia ao ON superior a cepa de referência H37Ra. Outros estudos são necessários para investigar a virulência dessas cepas.

7 REFERÊNCIAS*

Alland D, Kalkut GE, Moss AR, McAdam RA, Hahn JA, Bosworth W, et al. Transmission of tuberculosis in New York City: an analysis by DNA fingerprinting and conventional epidemiologic methods. **N Engl J Med** 1994; 330: 1710-6.

Aston C, Rom WN, Talbot AT, Reibman J. Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157: 1943-50.

Caluine ALR, Roscani GN, Villares MCB, Soini H, Grawiss EA, Ramos MC. IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from patients with pulmonary tuberculosis in Campinas, Brazil. Evidence of intercontinental distribution of strains. **Mem Inst Oswaldo Cruz, RJ** 2003; 98: 01-04.

Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Divisão de Tuberculose. **Manual de orientação para coleta de escarro e outros materiais para baciloscopia e cultura para diagnóstico e controle da tuberculose**. São Paulo, 2002, 26p.

Chan ED, Chan J, Schluger NW. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? **Am J Respir Cell Mol Biol** 2001; 25: 606-12.

* De acordo com Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública Biblioteca/CIR.

Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom BR. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun** 1995; 63: 736-740.

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J Exp Med** 1992; 175: 1111-22.

Collins CH, Grange JM, Yates MD. **Tuberculosis bacteriology: organization and practice**. 2 ed. Oxford: Butterworth – Heinemann; 1997.

Dannenberg AM. Pathophysiology: Basic aspects. In: Schlossberg, editor. **Tuberculosis and nontuberculosis mycobacterial infections**. Philadelphia: W.B. Saunders; 1999. p. 17-47.

Das S, Paramasivan CN, Lowrie DB, Prabhakar R, Narayanom. IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, South India. **Tuberc Lung dis** 1995; 76: 550-4.

Dolin PJ, Raviglione MC, Kochi A. Global tuberculosis incidence and mortality during 1990-2000. **Bull World Health Organ** 1994; 72: 213-20.

Euzéby JP. **List of bacterial names with standing in nomenclature [on line]**. Available from: <URL: [http:// www-sv.cict.fr/bacteriol/](http://www-sv.cict.fr/bacteriol/)>. [1999 Oct]

Fandinho FCO, Kritski AL, Hofer C, Conde H, Ferrera RMC, Saad MHF et al. RFLP and risk factors for recent tuberculosis transmission among hospitalized tuberculosis patients in Rio de Janeiro, Brazil. **Trans R Soc Trop Med HYG** 2000; 94: 271-5.

Ferrazoli L, Palaci M, Marques LRM, Jamal LF, Afiune JB, Chimara E, et al. Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2000; 4: 18-25.

Fiúza de Melo FA, Afiune JB. Transmissão e imunopatogenia da tuberculose. **J Pneumol** 1993; 19: 19-24.

Firmani MA, Riley LW. Mycobacterium tuberculosis CDC1551 is resistant to reactive nitrogen and oxygen intermediates in vitro. **Infect Immun** 2002a; 70:3965-8.

Firmani MA, Riley LW. Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro. **J Clin Microbiol** 2002b; 40: 3162-6.

Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. **Annu Rev Immunol** 2001; 19: 93-129.

Flynn JL, Ernst JD. Immune response in tuberculosis. **Curr Opin Immunol** 2000; 12: 432-6.

Flynn JL, CA Scanga, KE Tanaka and J Chan. Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis. **J Immunol** 1998; 160: 1796-803

Friedman CR, Quinn GC, Kreiswerth BN, Pearlman DC, Salomon N, Shluger N, et al. Widespread dissemination of a drug susceptible strain of *M. tuberculosis*. **J Infect Dis** 1997; 176: 478-84.

Gow AJ, Foust R, Malcolm S, Gole M, Ischiropoulos H. Biochemical regulation of nitric oxide cytotoxicity. In: Fang FC, editor. **Nitric Oxide and Infection**. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers; 1999 p. 175-187.

Hermans PWM, Messadi F, Guebrexabher H, van Soolingen D, de Has PEW, Heersma H, et al. Analysis of the population structure of *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia, Tunisia and the Netherland: usefulness of DNA typing for global tuberculosis epidemiology. **J Infect Dis** 1995; 171: 1504-13.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Willians ST. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Wilkins; 1994. p. 597-603.

Ivanyi J & Thole J. Specificity and function of T-and B cell recognition. In: Bloom BR, editor. **Tuberculosis pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press; 1994. p. 459-83.

Ivens-de-Araujo ME, Fandinho FC, Werneck-Barreto AM, Gonçalves-Veloso V, Grinstejn B, Lourenço MK, et al. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with and without AIDS in Rio de Janeiro. **Braz J Med Biol Res** 1998; 31: 368-72.

Jacobs J.R., Bloom BR Molecular genetic strategies for identifying virulence determinants of *Mycobacterium tuberculosis*. In: Bloom BR, editor. **Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control**. Washington: ASM Press; 1994. p. 253-68

Källennius G, Koivula T, Ghebremichael S, Hoffner SE, Norberg R, Svensson E, et al. Evolution and clonal traits of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Guinea-Bissau. **J Clin Microbial** 1999; 37: 3872-8.

Krahenbuhl JL. **Role of mycobacterial constituents in regulation of macrophages effector function**. In: Roth JA, Bolin CA, Brogden KA, Miniom FC, Wannemuehler MJ, editors. **Virulence mechanisms of bacterial pathogens**. Washington.: ASM Press, 1995; p. 97-114.

Kirsop BE and Doyle A. **Maintenance of microorganisms and cultured cells: a manual of laboratory methods**. 2. ed. San Diego, CA. Academic Press; 1999. p. 308.

Kochi A. Tuberculosis: distribution, risk factors, mortality. **Immunobiology** 1994; 191: 325-36.

Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. **FASEB J** 1987; 1: 462-8.

Liew FY, Cox FEG. Nonspecific defense mechanism: role of nitric oxide. **Immunol Today** 1991; 12: A17-A24.

Lowenstein CJ, Dinerman YL, Shyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Ann Intern Med** 1994; 120: 227-37.

Manca M, Tsenova L, CE Barry III, A Bergtold, S Freeman, PAT Haslett, et al. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. **J Immunol** 1999; 162: 6740-6

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de referência Prof. Hélio Fraga. **Manual de bacteriologia da tuberculose**. 2. ed. Rio de Janeiro, 1994.

Ministério da Saúde. Secretária de políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Manual Técnico para o Controle da Tuberculose**. Cadernos de Atenção Básica nº 6. série A. Normas e Manuais Técnicos. Nº 148, 1ª ed. Brasília, 2002, 64p.

Murray JF. An emerging global program against tuberculosis: agenda for research, including the impact of HIV. **Bull Int Union Tuberc Lung Dis**. 1991; 66: 207-10.

Murray JF. Tuberculosis and HIV infection: global perspectives. **Respirology** 1997; 2: 209-13

Nabeshima S, M Nomoto, G Matsuzaki, K Kishihara, H Taniguchi, S Yoshida and K Nomoto. T- cell hyporesponsiveness induced by activated macrophages through nitric oxide production in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun** 1999 67: 3221-6

Nathan C, Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Curr Opin Immunol**. 1991; 3: 65-75.

Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J** 1992; 6: 3051-64.

Nathan C, Shiloh MV. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between hosts and microbial pathogens. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97: 8841-48.

Nicholson S, Bonecini- Almeida MG, Silva JRL, Nathan C, Xie Q, Mumford R, et al. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. **J Exp Med** 1996; 183: 2293-302.

Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. Mechanism of nitric oxide dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. **Infect Immun** 1997; 65: 3644-7.

O'Brien L, Carmichael J, Lowrie DB, Andrew PW. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differ in susceptibility to reactive nitrogen intermediates in vitro. **Infect Immun** 1994; 62: 5187-90.

Palittapongarnpim P, Luangsook P, Tarsuphaswadikul S, Chuchottaworn C, Prachaktam R, Sathapatayavongs B. Restriction Fragment Length Polymorphism study of *Mycobacterium tuberculosis* in Thailand using IS6110 as probe. **Int J Tuberc Lung Dis** 1997; 1: 370-6.

Park YK, Bai GH, Kim SJ. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from countries in the Western Pacific region. **J Clin Microbiol** 2000; 38: 191-7

Pineda-Garcia L, Ferrera A, Hoffner SE. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains from patients with pulmonary tuberculosis in Honduras. **J Clin Microbiol** 1997; 35: 2393-7.

Raviglione MC, Sudre P, Rieder HL, Spinaci S, Kochi A. A secular trends of tuberculosis in Western Europe. **Bull World Health Organ** 1993; 71: 297-306.

Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **JAMA** 1995; 27: 220-6.

Rich AR. **The pathogenesis of tuberculosis**, 2. ed. Springfield: Charles C Thomas; 1951.

Riley LW. **Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis***. In: Rom WN, Garey SM, editors. **Tuberculosis**. Boston: Little Brown, 1996 p. 281-9.

Rhoades ER, Orme IM. Susceptibility of a panel of virulent strains of *Mycobacterium tuberculosis* to reactive nitrogen intermediates. **Infect Immun** 1997; 65: 1189-95.

Schluger NW, Rom WN. The host immune response to tuberculosis. **Am J Respir Crit Care Med** 1998; 157: 679-91.

Schneemann M, Schoendon G, Hofers G, Blau N, Guerrero L, Schaffner A. Nitric oxide synthase is not a constituent of the antimicrobial armature of human mononuclear phagocytes. **J Infect Dis** 1993; 167: 1358-63.

Shimao T. Lessons we have learned from the fight against tuberculosis during the past 100 years and problems of tuberculosis research control programs to be resolved in the future. **Asian Med J** 1983; 26: 226-35.

Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, et al. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco: a population-based study using conventional and molecular methods. **N Engl J Med** 1994; 330: 1703-9.

Sudre P, Tem Dam G, Kochi A. Tuberculosis: a global overview of the situation today. **Bull World Health Organ** 1992; 70: 149-59.

Sultzer BM. **Policlonal lymphocyte activation by *Mycobacterium tuberculosis* and its products**. In: Bendinelli M, Freedman H, editors. *Mycobacterium tuberculosis: interactions with the immune system*. New York: Plenum Press; 1988. p. 277-304.

Susemichi MAMM, Ferrazoli L, Ueki SYM, Gimenez RD, Palaci M. Avaliação do método de Ogawa-kudoh para o cultivo de micobacterias. **Rev Bras Patol Clin** 1993; 29: 51-3.

Tarantino AB, Leitão de Oliveira MC. Tuberculose. **Arq Bras Med**. 1990; 64: 123-31.

Torrea G, Levee G, Grimont P, Martin C, Chanteau S, Gicquel B. Chromosomal DNA fingerprinting analysis using the insertion sequence IS6110 and the repetitive element DR as strain-specific markers for epidemiological study of tuberculosis in French Polynesia. **J Clin Microbiol** 1995; 33: 1899-904.

Torrea G, Offredo C, Simoneti M, Gicquel B, Berche B, Pierre-Audigier C. Evaluation of tuberculosis transmission in a community by one year of systematic typing of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. **J Clin Microbiol** 1996; 34: 1043-9.

Valway SE, Sanchez MP, Schinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, et al. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **N Engl J Med** 1998; 338: 633-9.

van Embden JDA, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. **J Clin Microbiol** 1993; 31: 406-9.

van Soolingen D, Hermans PWM, de Haas PEW, Sole DR, van Embden JDA. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. **J Clin Microbiol** 1991; 29: 2578-86.

Wallis RS, Palaci M, Vinhas S, Hise AG, Ribeiro FC, Londen K et al. A whole blood bactericidal activity assay for tuberculosis. **J Infect Dis** 2001; 183: 1300-3.

Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. **Eur Respir J** 1998; 11: 809-15.

Wayne LG, Kubica GP. The mycobacteria. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, editors. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: The Williams & Wilkins; 1984. p. 1435-57.

Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. **Am Rev Respir Dis** 1979; 119: 107-59.

[WHO] World Health Organization. **Tuberculosis programme: guidelines for management of drug-resistant tuberculosis**. Geneva; 1997. World Health Organization Publication (WHO/TB/ 96.210 Rev 1)

Yang ZH, Mtoni I, Chonde M, Mwasekaga M, Fuursted K, Askgard DS, et al. DNA fingerprinting and phenotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients in Tanzania. **J Clin Microbiol** 1995; 33: 1064-9.

Yuen LKY, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from vietnamese patients by southern blot hybridization. **J Clin Microbiol** 1993; 31: 1615-8.

Zhang M, Gong J, Yang Z, Santem B, Cave D, Barnes PF. Enhanced capacity of a widespread strain of *Mycobacterium tuberculosis* to grow in human macrophages. **J Infect Dis** 1999; 179: 1213-7.

ANEXOS

Exceto quando especificado, os reagentes utilizados foram das marcas Sigma (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, EUA), Merck (Merck AS, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), Synth (Labsynth, Prods. para laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil) ou Boehringer (Mannheim, Biochemicals, Alemanha).

Anexo I. Meio de cultura

Anexo I. Meio Sauton com glicerol 10%

Asparagina	4,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Ácido Cítrico	2,0 g
Citrato de Ferro Amoniacal	0,05 g
Glicerina	100 ml
Água destilada q.s.p.	1000ml

Dissolver todos os reagentes em água destilada fervente, exceto o citrato de ferro amoniacal. Este deve ser acrescentado separadamente (com o meio mais frio). Ajustar o pH para 7,2 adicionando aos poucos NaOH. Autoclavar à 121°C por 15 minutos.

Anexo II. Soluções utilizadas no método RFLP-IS6110

Anexo II-a. Solução tampão tris – EDTA (TE)

Tris (hidroximetil) aminometano (Trisbase)	10 mM
Sal dissódico do ácido etilenodiamino tetra acético (Na ₂ EDTA)	1mM

Após a dissolução dos sais em água destilada, o pH da solução foi ajustado para 8,0. Em seguida a solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-b. Solução de lisozima

Lisozima	10 mg
Água ultrapura esterilizada	1 ml

A enzima foi dissolvida em água ultrapura esterilizada, obtida do Sistema Milli Q de purificação de água (Millipore Corporation). A solução foi distribuída em tubos tipo Eppendorf e armazenada a – 20°C.

Anexo II-c. Solução de proteinase K

Proteinase K	10 mg
Água ultrapura esterilizada	1 ml

Após completa dissolução da enzima, a solução foi distribuída em tubos tipo Eppendorf e armazenada a –20°C.

Anexo II-d. Solução de dodecil sulfato de sódio (DSS)

DSS	10 g
Água destilada esterilizada	100 ml

O DSS foi dissolvido em água destilada esterilizada e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-e. Solução de CTAB – NaCl

Hexadecil trimetil brometo de amônio (CTAB)	10 %
Cloreto de sódio (NaCl)	0,7 M

O CTAB foi adicionado à solução de NaCl, e a mistura foi aquecida a 65°C ate completa dissolução. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C por 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-f. Solução tampão tris-acetato EDTA (TAE) – 50 vezes

Tris base	0,004 M
Na ₂ EDTA	0,002 M
Acido acético glacial	0,02 M

Após a dissolução dos sais em água destilada, acrescentou-se o acido acético glacial e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-g. Solução de arraste

Ficoll 400	20 %
Azul de bromofenol	0,07 %
DSS	7,0 %

Após dissolução de ficoll 400 e DSS em água destilada esterilizada, adicionou-se o azul de bromofenol e a solução foi armazenada a -20°C. A solução de uso foi preparada misturando-se 1,8 ml desta solução com 360µl da solução tampão TAE 50 vezes (anexo II-f).

Anexo II-h. Solução salina com citrato (SSC) – 20 vezes

NaCl	3,0 M
Citrato trissódico	0,3 M

Os sais foram dissolvidos em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com acido cítrico e o volume da solução completado para 1000 ml. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C durante 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-i. Solução de despurinação (HCl 0,25M)

O ácido foi adicionado cuidadosamente à água, e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-j. Solução desnaturante

NaCl	1,5 M
NaOH	0,5 M

Os sais foram adicionados em água destilada, e a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-l. Solução neutralizante

NaCl	1,5 M
Tris base	0,5 M
Na ₂ EDTA	0,001 M

Após dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,0 com HCl 4 N. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-m. Solução tampão 1

Ácido maléico	100 mM
NaCl	150 mM

Após a dissolução dos sais em água destilada, o pH foi ajustado para 7,5 com NaOH. A solução foi esterilizada em autoclave a 120°C, durante 15 minutos e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-n. Solução A

Solução SSC – 2 vezes	1000 ml
Solução de DSS (anexo II-d)	10 ml

A solução SSC (anexo II-h) foi diluída dez vezes em água destilada e acrescida da solução de DSS. Depois a solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-o. Solução B

Solução de SSC – 0,5 vezes	1000 ml
Solução de DSS (item II-d)	10 ml

A solução SSC (item II-h) foi diluída 40 vezes em água destilada e acrescida da solução de DSS. A solução foi armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-p. Solução tampão 2

Solução tampão 1 (anexo II-m)	90 ml
Solução bloqueadora (anexo II-q).....	10 ml

As soluções foram misturadas no momento do uso.

Anexo II-q. Brometo de etídio

Brometo de etídio	50 mg
Água destilada esterilizada	10 ml

O brometo de etídio foi diluído em água destilada e a solução foi armazenada em frasco escuro à temperatura ambiente. No momento do uso, duas a três gotas desta solução foram diluídas em dois litros água destilada.

Anexo II-r. Solução tampão 3

Tris base	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	50 mM

Os dois primeiros sais foram dissolvidos em 900 ml de água ultrapura, o pH foi ajustado para 9,5 com HCl 4N e, após a adição do MgCl₂ o volume da solução foi completado para 1.000 ml. A solução foi esterilizada por filtração em membrana com poro de 0,45 µm (Millipore Corporation) e armazenada à temperatura ambiente.

Anexo II-s. Solução de revelação

Solução de NBT (anexo II-t)	45 µl
Solução BCIP (anexo II-u)	35 µl
Tampão 3 (anexo II-r)	10,0 ml

A solução foi preparada no momento do uso.

Anexo III. Soluções utilizadas nos ensaios experimentais para avaliar a susceptibilidade ao óxido nítrico

Anexo III-a. Middlebrok 7H9 com ADC, T80 e glicerol

Base desidratada	4,7 g
Glicerol	2,0 ml
Tween 80	0,5 ml
Água destilada	900,0 ml

A base em pó do meio de cultura Middlebrok 7H9 (Difco Laboratories, MI, EUA) foi dissolvida em 900 ml de água destilada e foi acrescentado o Glicerol e o Tween 80 e, foi esterilizada em autoclave a 120°C por 10 minutos. Após total resfriamento, foi acrescentado 100 ml do suplemento ADC (Difco Laboratories, MI, EUA) ao meio de cultura. Foi armazenado refrigerado.

Anexo III-b. Agar chocolate

5% base Mueller Hunton (NH)

10% base Brain Heart Infusion Agar (BHI)

Preparar a base conforme instruções do fabricante. Autoclavar a 120°C por 15 minutos, esfriar até 45-50°C, medir o pH (7,3 +/- 0,2) e adicionar 5% a 10% de sangue desfibrinado estéril de coelho, cavalo ou carneiro.

Anexo III-c. Middlebrok 7H9 com ADC e Glicerol

Base desidratada	4,7 g
Glicerol	2,0 ml
Água destilada	900,0 ml

A base em pó do meio de cultura Middlebrok 7H9 (Difco Laboratories, MI, EUA) foi dissolvida em 900 ml de água destilada e acrescentada de glicerol, a seguir foi esterilizada em autoclave a 120°C por 10 minutos. Após total resfriamento, foi acrescentado 100 ml do suplemento ADC (Difco Laboratories, MI, EUA), e foi mantido sob refrigeração.

Anexo III-d. Middlebrook 7H9 com ADC e glicerol com pH 5,2

Base desidratada	4,7 g
Glicerol	2,0 ml
Água destilada	900,0 ml

A base em pó do meio de cultura Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, MI, EUA) foi dissolvido em 900 ml de água destilada e acrescido de glicerol, o pH foi ajustado para 4,7 com HCl 4N, a seguir foi esterilizado em autoclave a 120°C por 10 minutos. Após total resfriamento, foi acrescido 100 ml do suplemento ADC (Difco Laboratories, MI, EUA), e medido o pH novamente para confirmar. Manter refrigerado.

Anexo III-e. NaNO₂

NaNO ₂	0,0690 g
Água ultrapura esterilizada	1,0 ml

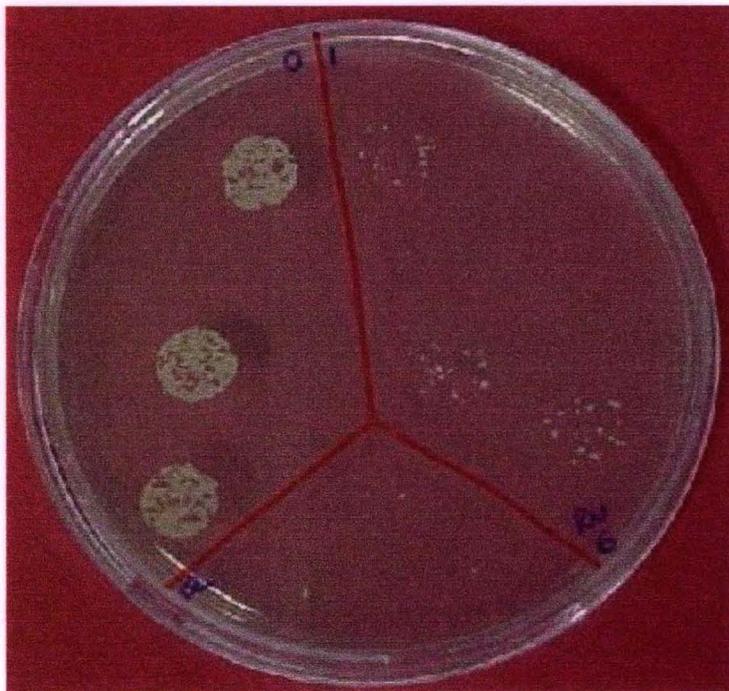
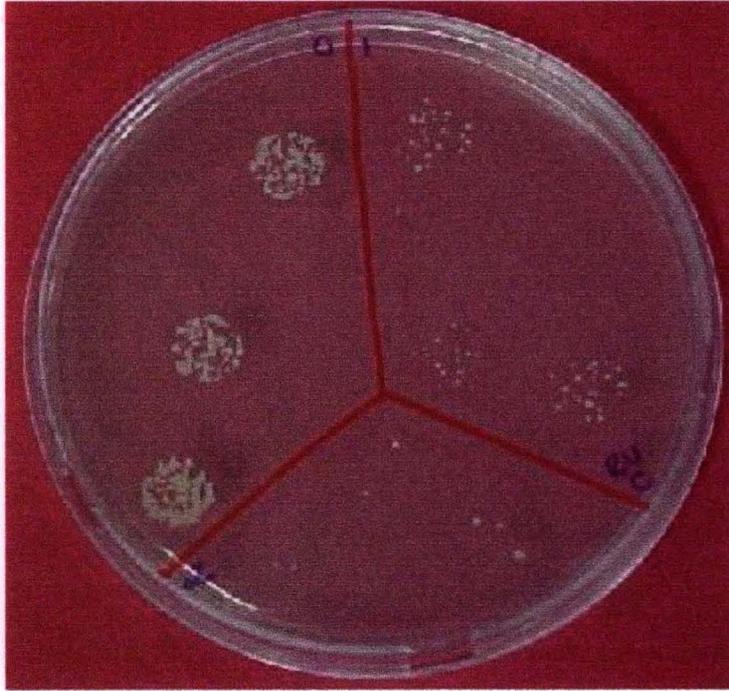
O NaNO₂ foi completamente dissolvido na água ultrapura esterilizada e a solução foi esterilizada por filtração em membrana de poro 0,22 um estéril (Millipore Corporation) com o auxílio de uma seringa descartável de 5 ml. A suspensão foi preparada no momento do uso.

Anexo III-f. Agar 7H11

Base desidratada	21 g
Glicerol	5 ml
Água destilada	900,0 ml

A base desidratada foi suspensa em água destilada, acrescentou-se o glicerol e o meio foi fundido até estar completamente dissolvido. O meio foi esterilizado em autoclave a 120°C por 15 minutos. Após resfriamento do meio a 50 – 55°C, foi adicionado assepticamente 100 ml de enriquecimento Middlebrook OADC (Becton, Dickinson and Company, EUA), homogeneizou-se e foi distribuído em placas de petri descartáveis (90 x 15) aproximadamente 10 ml por placa.

Anexo IV Placas de Midlebrook 7H11 com crescimento de *M. tuberculosis*, cepa de referência H37Rv, placa controle e teste, nas diluições 10^1 , 10^2 , 10^3 .



Anexo V. Formulário utilizado para a contagem de colônias

NZTB	Dias		Controle			6MM		
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
		1						
Data do Inóculo		2						
		3						
Total								
UFC								
%								

NZTB	Dias		Controle			6MM		
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
		1						
Data do Inóculo		2						
		3						
Total								
UFC								
%								

NZTB	Dias		Controle			6MM		
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
		1						
Data do Inóculo		2						
		3						
Total								
UFC								
%								

NZTB	Dias		Controle			6MM		
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
		1						
Data do Inóculo		2						
		3						
Total								
UFC								
%								

ANEXO VI Distribuição dos Perfis Genéticos Segundo Taxa Média de Sobrevivência ao Óxido Nítrico, Valor Mínimo, Máximo e Desvio Padrão

GRUPO GENÉTICO	Nº CEPAS	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	D.P.
4	6	2,00	26,80	11,72	9,49
5	4	0,90	20,60	10,18	9,28
5A	2	19,00	46,70	32,85	19,59
A	9	0,00	75,00	22,14	24,55
A1	2	6,70	6,70	6,70	0
A10	4	1,50	30,00	16,70	11,69
A11	2	0,00	24,9	12,45	17,61
A2	4	0,00	3,9	1,38	1,73
A3	3	7,30	27,60	15,07	10,96
A4	3	0,00	1,80	1,03	0,93
A5	4	0,00	28,20	9,55	12,69
A6	2	0,00	3,10	1,55	2,19
A7	11	0,00	29,00	10,07	11,18
A8	2	0,40	0,60	0,50	0,14
A9	2	0,50	0,50	0,50	0
B	5	2,60	31,70	17,20	11,15
B1	3	2,30	39,10	15,30	20,64
B2	2	11,00	11,00	11,00	0
B3	2	14,80	69,90	42,35	38,96
B4	2	12,00	32,50	22,25	14,5
B5	2	1,00	14,20	7,60	9,33
B6	2	0,20	0,20	0,20	0
C	2	3,60	3,70	3,65	0,07
D	3	17,10	47,10	27,53	16,96
E	6	6,60	31,50	20,04	9,99
F	10	0,00	30,50	5,77	9,73
F1	4	0,00	66,00	23,55	30,17
F2	4	0,00	10,40	4,18	4,91
F4	3	10,10	71,00	32,53	33,47
F5	2	4,70	4,70	4,70	0
F6	5	0,00	30,30	8,95	14,38
F7	2	0,00	11,40	5,70	8,06
F8	3	0,00	11,90	4,30	6,6
G	2	0,00	40,00	20,00	28,28
G1	3	14,00	51,00	26,77	21

ANEXO VI - CONTINUAÇÃO **Distribuição dos Perfis Genéticos**
Segundo Taxa Média de Sobrevivência ao Óxido Nítrico, Valor Mínimo,
Máximo e Desvio Padrão

GRUPO GENÉTICO	Nº CEPAS	MÍNIMO	MÁXIMO	MÉDIA	D.P.
G2	2	46,90	68,60	57,75	15,34
H	3	4,80	30,50	18,23	12,89
J	2	0,90	6,50	3,70	3,96
J1	2	5,10	5,10	5,10	0
J2	2	12,40	12,40	12,40	0
K	6	2,10	44,10	14,78	15,32
P	3	0,80	18,10	7,63	9,2
S1	2	0,00	29,00	14,50	20,51
S2	2	58,00	63,00	60,50	3,54
S3	2	1,00	31,00	16,00	21,21
SP	11	0,00	69,90	16,09	20,57
SP1	10	0,00	31,00	12,48	12,81
SP2	4	3,20	22,00	10,60	8,51
SP3	4	0,00	25,40	16,20	14,07
SP4	3	0,00	13,50	4,90	7,47
SP5	3	0,00	1,50	0,93	0,81
SP6	5	0,00	9,00	2,83	4,26
U	7	14,70	85,00	43,76	26,48
V	2	8,70	22,60	15,65	9,83
W	2	1,10	36,50	18,8	25,03
X	2	2,50	2,50	2,50	0
XY	2	21,40	21,40	21,40	0
Y	3	1,30	12,50	7,70	5,77
Z	2	0,90	13,10	7,00	8,63
PU	206	0,00	74,00	15,43	16,86

quitado por D. Aguiar
anclador
necedor Sec. de Asesoramiento
ebido em 01.03.04