

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, DE GENÓTIPOS PREVALENTES NO BRASIL, QUANTO A VIRULÊNCIA E A RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS A ESTAS MICOBACTÉRIAS.

SIMONE CRESPO MORAIS RIBEIRO

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE**  
**DARCY RIBEIRO - UENF**  
Campos dos Goytacazes - RJ  
Novembro - 2007

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SIMONE CRESPO MORAIS RIBEIRO

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, DE GENÓTIPOS PREVALENTES NO BRASIL, QUANTO A VIRULÊNCIA E A RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS A ESTAS MICOBACTÉRIAS.

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

Campos dos Goytacazes - RJ

Novembro - 2007

CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*, DE GENÓTIPOS PREVALENTES NO BRASIL, QUANTO A VIRULÊNCIA E A RESPOSTA DOS MACRÓFAGOS A ESTAS MICOBACTÉRIAS.

SIMONE CRESPO MORAIS RIBEIRO

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 27 de novembro de 2007.

Comissão examinadora:

---

Dr. Wilmar Dias da Silva (Doutor em Fisiologia Celular) – UENF

---

Dr. Marília Amorim Berbert de Molina (Doutora em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – UENF

---

Philip Noel Suffys (Doutor em Biologia Molecular) - FIOCRUZ

---

Elena Lassounskaia (Doutora em Ciências Médicas) - UENF  
**ORIENTADORA**

*Dedico este trabalho a  
Deus, autor e  
consumador da minha  
fé. Ao meu querido  
esposo Júnior, meu  
grande incentivador, e a  
minha amiga Verônica,  
por toda ajuda e  
dedicação.*

# AGRADECIMENTOS

---

❖ Primeiramente a Deus, porque “posso todas as coisas naquele que me fortalece”. Ele me fez reagir mediante os problemas e das dificuldades, me colocou no colo e me deu o carinho que precisava, num momento em que por minhas próprias forças eu não poderia caminhar. Gosto muito de uma frase que diz: "Deus não prometeu dias sem dor, risos sem sofrimento, sol sem chuva, mas Ele prometeu força para o dia, conforto para as lágrimas e luz para o caminho".

❖ Ao meu esposo Júnior, que mesmo não entendendo nada de Biologia nunca me desanimou e pelo contrário foi meu grande incentivador, aquele que me dizia: “você precisa estudar!”, “não vai à UENF hoje não?”. Ajudou-me e viveu junto comigo um dos melhores e piores momentos da minha vida. Deixo aqui uma declaração que você já conhece: “Separados nós somos fortes, juntos nós somos imbatíveis!” Te amo muito!

❖ Agradeço aos meus pais, por terem me dado à vida e instrução para hoje poder estar onde estou. Pela criação que me destes e o pelo amor e carinho. Agradeço a minha irmã, meus avós, tios, primos, à família que ganhei: minha sogra, meu sogro, minhas cunhadas e cunhados, a todos que, mesmo de longe, sei que torcem por mim.

❖ A minha orientadora Elena, porque se não fosse por ela, nem a metade desta tese teria saído. Foram lutas diárias: corre atrás de material, é o aparelho que quebrou, o dinheiro que acabou, documentos para assinar, experimentos para fazer, projetos para escrever, além de ter tempo para ler uma dezena de artigos, dar aulas e corrigir provas. UFA! Apesar da correria ela não deixa ninguém na mão, socorre todos os seus alunos (somos dez ao todo) e todos tem a sua atenção. Além de uma excelente orientação científica. Obrigada, não sei como agradecer tudo o que a senhora faz. Espero nunca decepcioná-la.

❖ Quero agradecer de todo meu coração a uma pessoa muito especial, que era para ser apenas mais uma técnica do laboratório, mas que se tornou amiga e mãe

de todos nós. Verônica tem um versículo em provérbios que diz: “Em todo o tempo ama o amigo e para a hora da angústia nasce um irmão”. Quero te agradecer, por toda sua ajuda, porque todos os experimentos realizados neste trabalho foram feitos a quatro mãos. Minha companheira de ELISA, que cuidava das células para mim, além de muito mais que você fazia. Não tenho palavras para agradecê-la. Nossa amizade é algo que nunca vai acabar.

❖ A todos os alunos da Elena (não vou falar Elenetes em respeito aos meninos): Mariana, Marcelle, Fabrício, Giliane, Eduardo, Thatiana, Tanara, Tati Dutra e Karla. Somos amigos e cúmplices, ou melhor, uma família. Obrigada pelo carinho de vocês, pelas risadas que damos juntos, pelo companheirismo e pela ajuda mútua.

❖ A Prof<sup>a</sup>. Tereza (*in memoriam*), que sempre esteve pronta a nos ensinar, por sua dedicação os alunos e ao laboratório, pelo seu amor a Ciência, este que todos nós deveríamos admirar.

❖ A todos do LBR, professores, alunos e técnicos, pois este trabalho só pôde ser realizado graças ao suporte dado por vocês.

❖ Aos professores Dr. Wilmar Dias da Silva, Dr<sup>a</sup>. Marília Amorim Berbert de Molina e Dr. Philip Noel Suffys por terem aceitado a participar da banca. À Dr. Mariana Novo Nunes Campos pela revisão desta Dissertação de Mestrado.

❖ Ao apoio financeiro da FAPERJ e do CNPq para a realização deste projeto.

❖ E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

# SUMÁRIO

---

LISTA DE FIGURAS .....	iii
ABREVIATURAS .....	v
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. A Tuberculose .....	1
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	4
1.3. Resposta imune contra a micobactéria .....	5
1.4. Genotipagem micobacteriana .....	13
1.4.1. RFLP- <i>IS6110</i> .....	14
1.4.2. Spoligotipagem .....	15
1.4.3. MIRU-VNTR .....	17
1.4.5. Principais famílias genóticas de <i>M. tuberculosis</i> .....	18
1.5. Virulência micobacteriana .....	21
2. OBJETIVOS .....	24
2.1. Objetivo geral .....	24
2.2. Objetivos específicos .....	24
3. METODOLOGIA .....	25
3.1. Cultura de células humanas .....	25
3.2. Micobactérias .....	25
3.3. Infecção dos macrófagos .....	26
3.4. Quantificação do crescimento intracelular das micobactérias .....	27
3.5. Quantificação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 .....	27
3.6. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados .....	27
3.7. Quantificação de citocinas .....	28
3.8. Forma de análise dos resultados .....	28
3.9. Modelo de pesquisa .....	28

3.10. Conduta de trabalho e instruções em caso de acidentes .....	29
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1. Genotipagem das cepas de Mtb .....	31
4.2. Avaliação do crescimento em meio de cultura 7H9 das cepas de Mtb .....	33
4.3. Avaliação do crescimento intracelular das cepas de Mtb em macrófagos infectados.....	35
4.4. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb .....	39
4.5. Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb .....	43
4.5.1. Produção do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	43
4.5.2. Produção do Fator do crescimento de transformação (TGF- $\beta$ ) .....	44
4.5.3. Produção da Interleucina 13 (IL-13).....	45
4.5.4. Produção das citocinas IL-12 e IL-10 .....	47
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>57</b>

# LISTA DE FIGURAS E TABELAS

---

Figura 1 - Forma de transmissão da tuberculose .....	1
Figura 2 - Estrutura da parede celular das micobactérias .....	5
Figura 3 - Fagocitose e reconhecimento imunológico de <i>M. tuberculosis</i> ..	7
Figura 4 - Principais características da tuberculose: da infecção a defesa .	13
Figura 5 - Esquema representativo da técnica de RFLP .....	15
Figura 6 - Fragmento da região DR .....	15
Figura 7 - Padrões de alguns isolados através da spoligotipagem .....	16
Figura 8 - Representação esquemática dos espaçadores característicos das principais famílias de cepas de <i>M. tuberculosis</i> .....	17
Figura 9 - Localização dos 41 MIRU-loci no genoma da cepa H37Rv de Mtb .....	18
Figura 10 - Prevalência das principais famílias genéticas de Mtb no mundo .....	20
Figura 11 - Fluxograma da seqüência experimental utilizada .....	29
Tabela 1 – Perfil das cepas de Mtb utilizadas neste trabalho .....	31
Figura 12 - Crescimento das diferentes famílias genéticas de Mtb em meio de cultura Middlebrook 7H9 .....	34
Figura 13 - Crescimento das diferentes cepas de Mtb em meio de cultura Middlebrook 7H9 .....	35
Figura 14 - Crescimento intracelular das diferentes famílias genéticas de Mtb em macrófagos infectados .....	36
Figura 15 - Crescimento intracelular das diferentes cepas de Mtb em macrófagos infectados .....	37

<b>Tabela 2 - Representação dos dados de crescimento intracelular .....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 16 - Cinética de morte celular nas culturas de macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 17 - Porcentagem de células mortas na cultura de macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 18 - Porcentagem de células mortas na cultura de macrófagos infectados para cada família genética de Mtb .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 19 - Morfologia das células infectadas com cepas Beijing de Mtb ...</b>	<b>42</b>
<b>Figura 20 - Produção de TNF<math>\alpha</math> pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb .....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 21 - Indução de TGF-<math>\beta</math> pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb .....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 22 - Indução de IL-13 pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb .....</b>	<b>46</b>

# ABREVIATURAS

---

- ❖ ADC – suplemento de albumina, dextrose, catalase
- ❖ AIDS – síndrome da imunodeficiência adquirida
- ❖ APC – célula apresentadora de antígenos
- ❖ ATP – adenosina trifosfato
- ❖ BCG – *Bacillus Calmette-Guérin*
- ❖ BP – pares de bases
- ❖ CFU – unidade formadora de colônias
- ❖ CR – receptor de complemento
- ❖ DNA – ácido desoxirribonucléico
- ❖ DO – densidade ótica
- ❖ DR – *direct repeats*
- ❖ EAI – *East African-Indian strain*
- ❖ FcR – receptor Fc
- ❖ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de oxigênio
- ❖ HIV – vírus da imunodeficiência adquirida
- ❖ IFN- $\gamma$  – interferon  $\gamma$
- ❖ IL – interleucina
- ❖ KO – knock-out - nocaute
- ❖ LAM – lipoarabinomanana
- ❖ LAM – *Latin American-Mediterranean strain*
- ❖ MDM – monócitos derivados de medula
- ❖ MDR-TB – tuberculose multidroga resistente
- ❖ MIP1 – proteína inflamatória de macrófagos-1
- ❖ MIP2 - proteína inflamatória de macrófagos-2
- ❖ MIRU – *mycobacterial interspersed repetitive units* – unidades micobacterianas intercaladas repetitivas
- ❖ Mtb – *Mycobacterium tuberculosis*
- ❖ NK – célula *natural killer*
- ❖ NO – óxido nítrico
- ❖ NOS2 – óxido nítrico sintase induzível 2
- ❖ OMS – Organização Mundial de Saúde

- ❖ PBS – salina fosfatada tamponada
- ❖ PCR – *Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia por polimerase
- ❖ PGL – peptídeoglicano
- ❖ PMA – phorbol 12-myristate 13-acetate
- ❖ PPD – derivado protéico purificado
- ❖ RANTES – *Regulated upon Activation of Normal T cell Expressed and Secreted* – quimiocina
- ❖ RFLP – *restriction fragment length polymorphism*
- ❖ RHZ – rifampicina(R), isoniazida(H) e pirazinamida(Z)
- ❖ RNI – intermediário reativo do nitrogênio
- ❖ ROI – intermediário reativo do oxigênio
- ❖ TACO – *tryptophan-aspartate containing coat protein*
- ❖ TGF- $\beta$  – fator de crescimento tumoral- $\beta$
- ❖ TH – célula T *helper*
- ❖ TLR – receptor de Toll-Like
- ❖ TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral  $\alpha$
- ❖ VNTR – *variable numbers of tandem repeats* – números variáveis simultâneos repetitivos

## RESUMO

---

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares foi possível detectar as diferenças genéticas existentes dentro da espécie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), permitindo a diferenciação de isolados clínicos e identificação de cepas individuais. Foi possível a partir disto a caracterização das diferenças existentes na virulência e imunogenicidade entre as micobactérias de genótipos distintos. A análise dos dados obtidos através da infecção dos macrófagos humanos THP-1 junto com os dados de genotipagem e características clínicas e epidemiológicas das cepas de micobactéria permite a avaliação relativa da virulência destas. A família genética Beijing, prevalente em regiões da Ásia e na Rússia, está associada com alta virulência, taxa de transmissão e resistência a drogas e é responsável por cerca de 60% dos casos de tuberculose nestas regiões, enquanto que no Brasil estas cepas só foram detectadas recentemente e ainda são raras. A Família genética LAM predomina entre as populações de Mtb no Brasil, acompanhada de cepas das famílias Haarlem e T1. O objetivo deste estudo foi caracterizar as cepas de Mtb de genótipos diferentes dentre as famílias prevalentes no Brasil, em relação a sua virulência e resposta antibacteriana dos macrófagos humanos *in vitro*. A taxa de crescimento de Mtb intracelular e em cultura, indução de citocinas e morte dos macrófagos foram analisadas como parâmetros para a determinação da virulência das cepas estudadas. Os resultados obtidos demonstram menor virulência das cepas Beijing isoladas no Brasil em comparação com uma cepa Beijing de alta virulência isolada na Rússia. Entretanto, algumas cepas das famílias prevalentes no Brasil, LAM, Haarlem e T1, apresentaram virulência compatível com a cepa Beijing da Rússia, e superior em comparação com a cepa padrão H37Rv. Os dados sugerem que o fator de prevalência de determinadas famílias genéticas de Mtb numa região geográfica favorece a seleção dos sub-tipos mais competitivos e virulentos dentro destas famílias predominantes.

**Palavras chave:** *Mycobacterium tuberculosis*, virulência, macrófagos humanos, famílias genéticas.

# ABSTRACT

---

The development of molecular techniques allowed to detect genetic differences between the species of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) enabling the differentiation of clinical isolates and identification of individual strains. The next step is a determination of the differences in a virulence and immunogenicity between the mycobacterian strains of different genotypes. The genetic family Beijing, prevalent in Asia and Russia, is thought to be associated with higher virulence, transmission rate and resistance to drugs in comparison with other Mtb genotypes. Beijing strains are responsible for about 60% of all cases of tuberculosis in Russia, whereas in Brazil these strains were detected only recently and are still rare. The family LAM predominates among Mtb populations in Brazil, accompanied by Haarlem and T1 genotypes. The properties of these strains related to the virulence have not been evaluated yet. The aim of this study was to characterize Mtb clinical isolates with genotypes prevailed in Brazil, for their virulence and macrophage response to bacteria employing *in vitro* model of human THP-1 macrophage infection. The Mtb growth in macrophages and in Middlebrook broth, cell death and cytokine production by infected macrophages were examined to determine the virulence of the strains. The results demonstrated lower virulence of Beijing strains isolated in Brazil in comparison with the hypervirulent Beijing strain isolated in Russia. Nevertheless, some strains of the genetic families prevailed in Brazil, LAM, Haarlem and T1, presented the virulence properties similar to the Russian Beijing strain, and significantly superior to that of reference H37Rv strain. The data suggest that the prevalence of certain Mtb genetic families in the given geographical region favors the selection of more competitive and virulent genetic sub-types within these predominant families.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, virulence, human macrophages, genetic families.

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. A tuberculose

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa causada, principalmente, pelo agente infeccioso *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), a doença apresentava mundialmente, em 2005, cerca de 8,8 milhões de novos casos por ano, com um total de 1,6 milhões de óbitos, incluindo pacientes infectados com HIV (WHO, 2007).

O Brasil é o país das Américas que concentra o maior número absoluto de casos notificados de tuberculose, estando na 15ª posição no ranking dos 22 países emergentes em tuberculose, segundo dados da OMS em 2004. Estima-se que no Brasil, mais de 50 milhões de pessoas estejam infectadas, com aproximadamente 85 mil novos casos e 5 mil óbitos por ano. O Estado do Rio de Janeiro apresenta uma das mais altas taxas de incidência de tuberculose em todo Brasil. A cada ano, em média, são notificados 16.000 casos de tuberculose (BOLETIM INFORMATIVO, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Esta doença atinge todos os grupos etários, com maior predomínio de indivíduos economicamente ativos na faixa etária de 15 a 54 anos e do sexo masculino. É prevalente em áreas de grande concentração populacional e com condições socioeconômicas e sanitárias precárias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A tuberculose é transmitida através do ar, de uma pessoa para a outra. Uma pessoa com a doença ativa, ao tossir ou espirrar, libera partículas contendo bactérias, que podem ser respiradas por outras pessoas, infectando-as. As bactérias se instalam no pulmão e iniciam sua multiplicação (CDC, 2005)

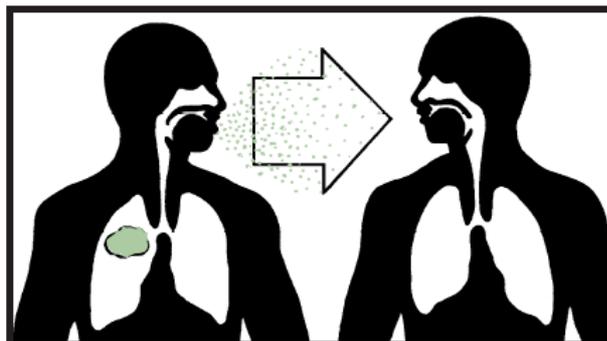


Figura 1 – Forma de transmissão da tuberculose. (CDC, 2005)

A infecção, em adultos, atinge principalmente os pulmões, mas pode afetar qualquer outro órgão ou tecido, como pleura, linfonodos, ossos, sistema urinário, cérebro, meninges, olhos, entre outros. A infecção extrapulmonar é mais comum em indivíduos com baixa imunidade, atingindo principalmente crianças e indivíduos infectados com HIV. Em 90% dos indivíduos infectados, o sistema imune consegue impedir o desenvolvimento da doença. Nos 10% dos indivíduos que desenvolvem a doença, a metade desenvolve um quadro de tuberculose primária, logo após a implantação das bactérias no pulmão, e a outra metade desenvolve a doença devido a uma reativação de uma tuberculose latente ou através de uma reinfecção pela bactéria (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Durante o processo infeccioso da tuberculose, ocorre a formação de granulomas, que é caracterizado por um número de macrófagos infectados rodeados por outras células do sistema imune como linfócitos, monócitos e células epiteliais. Se o sistema imune tiver sucesso em eliminar a bactéria, o granuloma encolhe e pode eventualmente se calcificar. No entanto, se a resposta imune não tiver sucesso, o granuloma continuará aumentando em tamanho e em número de células, podendo levar a uma destruição do pulmão por necrose, num processo chamado cavitação. Nesta fase, o paciente é altamente infeccioso (DOHERTY e ANDERSEN, 2005).

Os sintomas mais freqüentes são o comprometimento da saúde do paciente, febre baixa com sudorese pela manhã, falta de apetite e emagrecimento. Pode ocorrer também dor torácica, tosse inicialmente seca e depois acompanhada ou não de escarros com presença de sangue. O diagnóstico consiste em: exame clínico; exame bacteriológico, através da baciloscopia do escarro; cultura microbiológica, para casos com baciloscopia negativa e suspeita de tuberculose; exame radiológico do tórax; prova tuberculínica (PPD), que pode auxiliar no diagnóstico da presença de infecção; exame anatomopatológico (histológico e citológico); exames bioquímicos; exames sorológicos e de biologia molecular, estes de alto custo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O tratamento da tuberculose é padronizado no Brasil. As medicações são distribuídas pelo sistema de saúde, através de seus postos municipais de atendimento. O tratamento inicial (preferencial) chama-se RHZ e inclui três medicações: rifampicina(R), isoniazida(H) e pirazinamida(Z). Usando este tipo de tratamento no período de, pelo menos, seis meses, o paciente pode apresentar

uma cura de aproximadamente 100%, isso se a medicação for utilizada de forma regular, ou seja, todos os dias, e se a bactéria for suscetível às drogas. Em casos especiais, o tratamento pode ser mais prolongado, podendo ultrapassar os seis meses. No caso de gestação, o tratamento não deve ser modificado. Além destes medicamentos, outras combinações podem ser utilizadas em situações especiais ou nos casos de não haver sucesso com o tratamento de primeira linha (LANÇA, 2006).

Cepas de Mtb resistentes a isoniazida e a rifampicina, com ou sem resistência a outras drogas, são denominadas cepas multidrogas-resistentes (MDR-TB). Atualmente, aproximadamente 3% de todos os pacientes diagnosticados têm MDR-TB no mundo. Essa proporção aumenta em pacientes que não tiveram sucesso com o tratamento recebido inicialmente. Isso ocorre, principalmente, devido a um tratamento inadequado e irregular que favorece a seleção das bactérias com mutações nos genes de resistência. O tratamento para pacientes com MDR-TB requer o uso prolongado de drogas caras, de segunda linha, e que às vezes são menos ativas que as de primeira linha, e que possuem um potencial significativo à toxicidade, além de um tratamento individualizado e clinicamente supervisionado (SHARMA e MOHAN, 2004)

A primeira vacina contra a tuberculose foi desenvolvida por Albert Calmette e Camille Guérin, do Instituto Pasteur. Eles fizeram a atenuação de uma micobactéria relacionada à Mtb (*Mycobacterium bovis* bacilo Calmette-Guérin [BCG]), através de um processo de crescimento desta cultura por um período de 13 anos em meio específico, monitorando a diminuição da virulência desta bactéria. Em 1921, a vacina BCG foi pela primeira vez administrada a crianças da França, com grande sucesso, levando a uma redução da mortalidade em 90%. Desde então, a vacina BCG têm sido a mais usada de todas as vacinas, sendo uma vacina barata e segura (DOHERTY e ANDERSEN, 2005).

Apesar do sucesso que a vacina BCG tem demonstrado nas últimas décadas, ela apresenta uma proteção por um período limitado, na infância, principalmente contra forma mais grave da doença - meningite tuberculosa, além do que ela não é eficaz em indivíduos já sensibilizados com antígenos micobacterianos, seja por uma vacinação prévia pela BCG, ou por exposição à micobactéria ou a presença de uma infecção latente. Desta forma, vem se estudando o desenvolvimento de novas vacinas que possam suprir esta deficiência (DOHERTY e ANDERSEN, 2005).

## 1.2. *Mycobacterium tuberculosis*

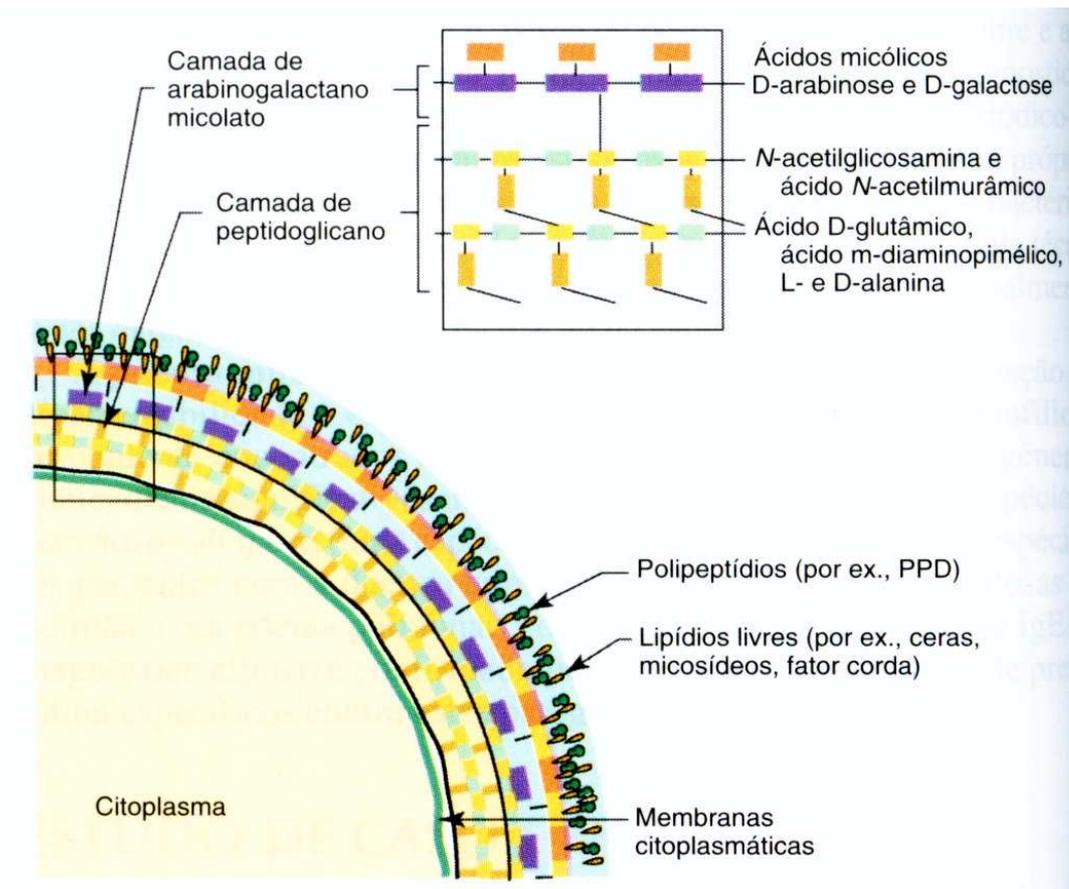
O gênero *Mycobacterium* compreende mais de 50 espécies, a maioria delas não patogênicas, sendo encontradas no meio ambiente. Entretanto, algumas espécies são altamente patogênicas, incluindo *M. tuberculosis*, *M. leprae* e *M. ulcerans*, que são os agentes causadores da tuberculose, hanseníase e úlceras de Buruli, respectivamente (COSMA *et al*, 2003).

O complexo *M. tuberculosis* é formado por *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis* e *M. microti*, e mesmo compartilhando cerca de 99% de identidade do genoma, diferem significativamente na sua morfologia, bioquímica e padrões de doença em humanos e animais. Os seres humanos são os únicos hospedeiros naturais de *M. tuberculosis*. *M. bovis* causa tuberculose em vários mamíferos, inclusive em humanos e no gado, e era uma das principais causas de tuberculose humana antes de se instituir a prática de pasteurização do leite (COSMA *et al*, 2003).

*M. tuberculosis* é uma bactéria intracelular facultativa, de crescimento lento, que cresce e se multiplica dentro de macrófagos e outros tipos celulares. É gram-positiva, não formadora de esporos e aeróbica (NORTH e JUNG, 2004).

As micobactérias possuem uma parede celular muito complexa, rica em lipídeos, e é ela a responsável por muitas das propriedades características das micobactérias, tais como resistência a ácidos e álcool, antigenicidade, resistência aos detergentes e às colorações laboratoriais comuns. Uma vez corados, os bacilos são resistentes à descoloração com soluções álcool-ácidas, daí o nome de bacilos álcool-ácidos resistentes. A estrutura da parede celular é típica de uma bactéria gram positiva, com uma membrana interna recoberta por uma camada espessa de peptídeoglicano (PGL) sem membrana externa, mas o esqueleto de PGL está covalentemente ligado a moléculas de ácido micólico-arabinogalactano, recoberto por lipídeos livres, glicolipídeos, polipeptídeos e lipoproteínas (**Figura 2**).

Os glicolipídeos de superfície, incluindo micosídeos espécie-específicos (peptidoglicolipídeos, oligopolissacarídeos) e glicolipídeos fenólicos constituem cerca de 25% do peso seco da parede celular e são altamente antigênicos. As cadeias de peptídeos presentes na camada externa representam 15% da massa da parede celular e constituem antígenos importantes que estimulam a resposta imune celular do hospedeiro à infecção (MURRAY *et al*, 2000).



**Figura 2 – Estrutura da parede celular das micobactérias.** Os ácidos micólicos estão ligados à camada de arabinose-galactose na cadeia lateral de arabinose. A ligação fosfodiéster liga a camada de arabinogalactano à cadeia subjacente de PGL na subunidade do ácido murâmico. *PPD*, Derivado protéico purificado. (MURRAY *et al*, 2000).

Existe uma variedade de lipídeos e glicolipídeos associados de forma não covalente à parede celular da micobactéria, e muitas destas moléculas são potentes imunomoduladores, como por exemplo, o lipoarabinomanana (LAM), que é o principal e mais estudado glicolipídeo associado à parede celular micobacteriana (GLICKMAN e JACOBS, 2001).

### 1.3. Resposta imune contra a micobactéria

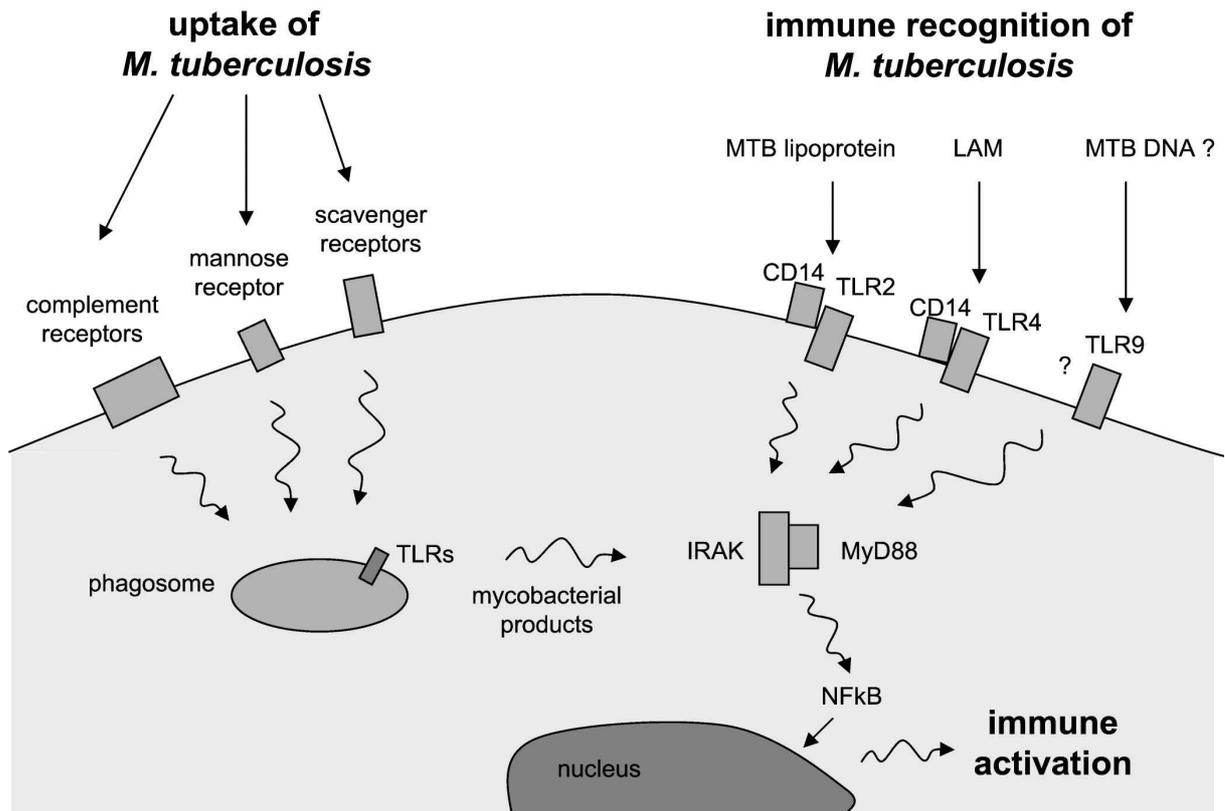
A primeira barreira que um agente patogênico enfrenta ao infectar um organismo é o sistema imune inato. Uma das principais células envolvidas nesta imunidade inata é o macrófago. Os macrófagos alveolares presentes no pulmão são os primeiros tipos celulares envolvidos na resposta contra a micobactéria. Depois deste primeiro encontro, células dendríticas e macrófagos derivados de monócitos

passam a fazer parte deste processo (NGUYEN e PIETERS, 2005; van CREVEL *et al*, 2002).

As interações macrófago/micobactéria e o papel do macrófago durante a resposta imune do hospedeiro podem ser resumidos em: fagocitose da micobactéria pelo macrófago; fusão do fagossoma com lisossomas; produção dos mediadores microbicidas levando a eliminação de micobactéria (inibição do crescimento micobacteriano e morte); produção de citocinas e quimiocinas para recrutamento de outras células do sistema imune para o local da inflamação e ativação destas; apresentação dos antígenos micobacterianos para células T para o desenvolvimento da resposta adquirida (RAJA, 2004).

Muitos receptores celulares estão envolvidos durante o processo de fagocitose da micobactéria pelo macrófago. Alguns receptores são responsáveis apenas pela ligação e internalização da micobactéria, e outros induzem uma cascata de sinalização promovendo a ativação do macrófago. Os receptores de complemento são os principais responsáveis pela fagocitose de micobactérias opsonizadas por componentes do complemento; receptores de manose e receptores *scavenger* são receptores que ligam as micobactérias não opsonizadas. Os receptores Toll-Like (TLR) desempenham um papel central na ativação do macrófago pela micobactéria (**Figura 3**). A ligação da micobactéria aos TLR induz uma sinalização celular que leva a produção de citocinas (van CREVEL *et al*, 2002).

Estudos demonstraram que além da associação com receptores do macrófago, as micobactérias também interagem com moléculas de colesterol presentes na membrana plasmática. A parede celular da micobactéria é rica em glicolipídeos que podem interagir diretamente com o colesterol. O colesterol funciona como uma “âncora”, permitindo a estabilidade da interação micobactéria-macrófago e a eficiente internalização da bactéria (PIETERS, 2001).



**Figura 3 – Fagocitose e reconhecimento imunológico de *M. tuberculosis*** (van CREVEL *et al*, 2002).

Uma vez dentro do macrófago, Mtb reside em um fagossoma. Já é bem conhecido que a micobactéria modifica a maturação deste compartimento fagossomal, a fim de assegurar sua sobrevivência dentro da célula. Esta alteração está associada com modificações no conteúdo de proteínas presentes no fagossoma, incluindo alterações na composição da Rab GTPase, exclusão da próton ATPase vacuolar com conseqüente falta de acidificação do fagossoma e retenção da proteína TACO (GLICKMAN e JACOBS, 2001). A capacidade das micobactérias de reter a proteína TACO na membrana do fagossoma, auxiliada pelo colesterol, é o que impede a fusão deste fagossoma com lisossomas, permitindo a sobrevivência da micobactéria na célula (PIETERS, 2001).

Vários mecanismos estão envolvidos no processo de eliminação da micobactéria dentro dos macrófagos infectados, dentre eles a geração de intermediários reativos do oxigênio (ROI), intermediários reativos do nitrogênio (RNI), e mecanismos mediados por citocinas. A produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos ativados é um dos mais importantes mecanismos antimicrobianos. Estas células quando ativadas por determinados agentes como IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  geram NO e outros RNI relacionados, através da óxido nítrico sintase induzível (NOS2), usando

L-arginina como substrato. O papel destes componentes tóxicos na defesa contra a micobactéria já foi bem demonstrado, tanto *in vitro* como *in vivo*, principalmente em camundongos, onde o RNI desempenha um papel protetor tanto em infecções agudas quanto em persistentes. Em humanos, este papel protetor tem sido estudado. Apesar de estudos demonstrarem que o peróxido de oxigênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) gerado por macrófagos ativados é micobactericida, a capacidade de ROI em eliminar a micobactéria ainda não está bem esclarecida. Alguns componentes micobacterianos, como por exemplo LAM e PGL, são potentes eliminadores de radicais do oxigênio, além de outros que podem interferir no mecanismo antimicrobiano dependente de radicais de oxigênio. Apesar disto, o papel do ROI como mecanismo antimicrobiano de defesa contra MTB não pode ser totalmente excluído (FLYNN e CHAN, 2001).

A morte celular programada, apoptose, dos macrófagos infectados constitui outro mecanismo de eliminação da micobactéria (GAO e KWAIK, 2000). A apoptose provoca a fragmentação celular com formação dos corpos apoptóticos contendo micobactérias. A fagocitose destas por macrófagos ativados não-infectados leva a eliminação da bactéria (FRATAZZI *et al*, 1997). Já está bem estabelecido que a infecção com Mtb em baixa dose da infecção induz a apoptose dos monócitos/macrófagos humanos e murinos *in vivo* e *in vitro*. Entretanto, as cepas virulentas induzem significativamente menos apoptose do que cepas atenuadas. Vários mecanismos de inibição da apoptose foram descritos. Um dos mecanismos de inibição da apoptose é a indução de liberação de receptores solúveis de TNF- $\alpha$  por cepas patogênicas que ligam a citocina bloqueando seu efeito pró-apoptótico. A liberação de receptores de TNF- $\alpha$  é regulada pela produção de IL-10, produzido seletivamente por cepas patogênicas, que leva a um decréscimo da atividade de TNF- $\alpha$  e reduz a apoptose das células infectadas (BALCEWICZ-SABLINSKA *et al*, 1998; KEANE *et al*, 1997).

A interação entre macrófagos e outras células efetoras ocorre por meio de citocinas e quimiocinas, que tanto podem atrair outras células inflamatórias como ativá-las. Esta rede de citocinas desempenha um papel crucial na resposta inflamatória resultante de infecções micobacterianas.

O IFN- $\gamma$  é a citocina chave no controle da infecção micobacteriana, e o seu papel protetor na tuberculose já é bem estabelecido, principalmente em relação à imunidade antígeno-específica de células T. Esta citocina é produzida

principalmente por células T CD4<sup>+</sup> após sua ativação por IL-12 e diferenciação para células Th-1. Outra fonte de IFN- $\gamma$  são células T CD8<sup>+</sup> e NK. Foi demonstrado que os macrófagos alveolares infectados pela MTB também podem produzir IFN- $\gamma$ , e esta produção é dependente de IL-12 (FLYNN e CHAN, 2001; van CREVEL *et al*, 2002)

O IFN- $\gamma$  pode agir sinergisticamente com produtos bacterianos para ativar vários mecanismos efetores bactericidas ou mecanismos bacteriostáticos em macrófagos infectados. Embora sua produção nem sempre seja suficiente para controlar a infecção micobacteriana, esta citocina é necessária para a resposta protetora contra Mtb. Camundongos knock-out (KO) para o receptor de IFN- $\gamma$  ou para o próprio gene de IFN- $\gamma$  mostraram ser mais susceptíveis a infecções com *Listeria*, *Mycobacterium*, *Salmonella* e *Rickettsia* (FLYNN e CHAN, 2001; ISMAIL *et al*, 2002).

Outra citocina importante é o TNF- $\alpha$ . A estimulação de monócitos, macrófagos e células dendríticas com micobactérias ou produtos micobacterianos induz a produção de TNF- $\alpha$ . O TNF- $\alpha$  tem um papel fundamental na formação do granuloma, induz a ativação de macrófagos e tem propriedades imunoregulatórias. Esta citocina é necessária para o controle da infecção micobacteriana aguda. Camundongos deficientes na produção de TNF- $\alpha$  ou KO para o seu receptor, durante a infecção micobacteriana, tiveram uma morte rápida e maiores níveis de bactérias em comparação com camundongos normais. O aumento sistêmico do TNF- $\alpha$  pode ter efeitos inflamatórios não desejados, como a febre. Para limitar os efeitos danosos do TNF- $\alpha$ , a produção sistêmica de TNF- $\alpha$  é regulada negativamente, através da liberação dos receptores solúveis que bloqueiam o TNF- $\alpha$  (van CREVEL *et al*, 2002; FLYNN e CHAN, 2001).

Existe um sinergismo entre TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  na indução dos efeitos antimicobacterianos de macrófagos. Dois dos principais mecanismos efetores responsáveis pela atividade antimicobacteriana do IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são a produção de óxido nítrico (NO) e de intermediários reativos do nitrogênio relacionados, produzidos por macrófagos pela ação da NOS2 (FLYNN e CHAN, 2001).

A IL-12 é uma citocina fundamental no controle de infecção micobacteriana. Sua produção é induzida após a fagocitose da micobactéria por macrófagos e células dendríticas (FLYNN e CHAN, 2001). Esta citocina tem um papel crucial na indução da produção de IFN- $\gamma$ , pois promove a diferenciação de células T em células

Th1, principais produtores de IFN- $\gamma$ . O papel protetor de IL-12 pode ser deduzido pela observação de que camundongos KO para IL-12 são altamente suscetíveis a infecções micobacterianas. Na tuberculose, a IL-12 pode ser detectada em infiltrados pulmonares, em granulomas e em outros locais, além da expressão de seus receptores também estar aumentada no local da doença. A IL-12 é uma citocina regulatória que conecta a resposta inata e adaptativa do hospedeiro contra a micobactéria, e que exerce seu efeito protetor através da indução de IFN- $\gamma$  (van CREVEL *et al*, 2002).

Outras citocinas pró-inflamatórias produzidas por macrófagos e outras células são a IL-1, IL-6 e IL-8, além das quimiocinas MIP-1, MIP-2, IL-8 e RANTES, que possuem um papel essencial na resposta inata e na ativação inicial de macrófagos em infecções com patógenos intracelulares como *M. tuberculosis* e *L. monocytogenes* (ISMAIL *et al*, 2002). As quimiocinas são capazes de atrair leucócitos para o foco da inflamação.

A resposta pró-inflamatória que é iniciada pela Mtb é antagonizada por mecanismos anti-inflamatórios. Quatro citocinas anti-inflamatórias, IL-10, TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-13, podem inibir a produção ou os efeitos de citocinas pró-inflamatórias durante a tuberculose (van CREVEL *et al*, 2002).

A IL-10 é produzida por macrófagos após a fagocitose da micobactéria e após a ligação do LAM micobacteriano, e também pode ser produzido por linfócitos T, inclusive células T Mtb-reativas. Ela antagoniza a resposta pró-inflamatória de citocinas pela regulação negativa da produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, que leva a uma diminuição da produção de IFN- $\gamma$  por células T, sendo estas citocinas essenciais para a imunidade protetora contra a tuberculose. A IL-10 inibe diretamente a resposta de células T CD4, além de inibir a apresentação de antígenos por células infectadas com a micobactéria (van CREVEL *et al*, 2002; FLYNN e CHAN, 2001).

O TGF- $\beta$  é um importante inativador de macrófagos durante a defesa do hospedeiro contra patógenos. Ela está presente em lesões granulomatosas de doentes com tuberculose, sendo amplamente distribuída e produzida principalmente por monócitos e macrófagos após estimulação com Mtb ou LAM. Embora ela possa ter alguns efeitos pró-inflamatórios, como por exemplo, o aumento da quimiotaxia de monócitos e o aumento de receptores de Fc, o TGF- $\beta$  tem importantes efeitos anti-inflamatórios, incluindo a inibição da produção de ROI e RNI por macrófagos, inibição da proliferação de células T, interferência na ação citotóxica de células T e

NK e regulação negativa da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1. (FLYNN e CHAN, 2001; SCHLUGER e ROM, 1998).

Os efeitos deletérios da IL-4 e IL-13 em infecções intracelulares, incluindo a tuberculose, estão relacionados à supressão da produção de IFN- $\gamma$  e supressão da ativação de macrófagos. A produção destas citocinas pelas células T CD4 está associada com a diferenciação das células Th-naives em Th-2 que pode ser promovida pela ausência da IL-12 levando a formação da imunidade não protetora contra tuberculose. Foi demonstrado que as helmintoses nos pacientes infectados por micobactérias favorecem ao desenvolvimento da resposta imune não protetora através da indução da produção de IL-4 e IL-13 (MANCA *et al*, 2004). Recentemente, foi demonstrado que MTb pode induzir síntese destas citocinas pelos macrófagos (van CREVEL *et al*, 2002).

Além dos macrófagos alveolares, outras células do sistema imune participam da resposta contra a micobactéria no local da infecção. No sítio de multiplicação das bactérias, os neutrófilos são as primeiras células a chegar, seguido pelas células NK e por linfócitos T. Os neutrófilos têm um importante papel na quimiotaxia e acumulação de células no granuloma. Estudos em humanos demonstraram que os neutrófilos também fornecem agentes como as defensinas, que auxiliam os macrófagos na eliminação da micobactéria. As células NK são células efetoras que são capazes de lisar diretamente agentes patogênicos ou células infectadas e são capazes de ativar fagócitos no local da infecção. Uma redução em sua atividade está associada à micobactérias MDR (RAJA, 2004).

A infecção por Mtb é um exemplo clássico de patogenia no qual a resposta protetora depende da imunidade mediada por células. Isto ocorre, principalmente, porque a bactéria vive dentro das células, normalmente macrófagos. Desta forma, os mecanismos efetores de células T são necessários para controlar ou eliminar as bactérias, no lugar de anticorpos (FLYNN e CHAN, 2001). Em modelos murinos, com uma semana de infecção com Mtb virulenta, o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> ativadas aumentam nos linfonodos de drenagem. De 2 a 4 semanas após a infecção, ambas células migram para o pulmão, interagindo com APCs e apresentando um fenótipo efector, levando a formação da granuloma (RAJA, 2004).

Em geral, células TCD4<sup>+</sup> colaboram na amplificação da resposta imune do hospedeiro através da ativação de células efetoras, incluindo macrófagos, e recrutamento adicional de células imunes para o sítio da infecção, enquanto que

células TCD8<sup>+</sup> estão diretamente ligadas à citotoxicidade de células infectadas e na eliminação da micobactéria (SCHLUGER e ROM, 1998).

As células T CD8<sup>+</sup> também são capazes de secretar citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4, podendo desta forma desempenhar um papel importante na regulação do balanço Th1 e Th2. A função principal das células TCD8<sup>+</sup> é a eliminação da célula infectada. Essas células possuem em seus grânulos granulísina, granzimas e perforinas, que são capazes de agir diretamente sobre a micobactéria destruindo-a (KAUFMAMNN, 2001). Perforina é a proteína que forma poros na membrana plasmática das células podendo levar a lise dos macrófagos, a granzima pode induzir a apoptose do macrófago, sendo a granulísina uma molécula bactericida. Visto que o fagossoma contendo micobactérias vivas possui poros suficientes para permitir a passagem de moléculas grandes, a granulísina que entra no citoplasma através dos poros formados pela perforina pode ter acesso ao fagossoma (FLYNN e ERNST, 2000).

O papel das células T $\gamma\delta$  na resposta do hospedeiro contra a tuberculose ainda não está bem definido. Em geral, estas células funcionam como células T-citotóxicas e não são restritas ao MHC. Quantidade significativa de dados obtidos em animais sugere que as células T $\gamma\delta$  exercem papel importante na resposta do hospedeiro contra a tuberculose reconhecendo fosfoproteínas e/ou proteínas de choque térmico nas micobactérias (SCHLUGER e ROM, 1998).

Podemos resumir a importância da resposta imune contra micobactérias para o desenvolvimento de tuberculose de acordo com a Figura 4. A infecção micobacteriana no hospedeiro humano pode ocorrer de três maneiras. Com certa frequência, a resposta imune protetora elimina micobactéria, a infecção micobacteriana fracassa e doença não se desenvolve, resultando numa cura espontânea do hospedeiro (**a**). Em indivíduos imunocomprometidos, a doença pode se desenvolver logo após a infecção (**b**). Na maioria dos casos (**c**), as micobactérias são contidas em granulomas, às vezes por muitos anos, e a doença pode evoluir depois, como resultado de uma reativação (KAUFMAMNN, 2001).

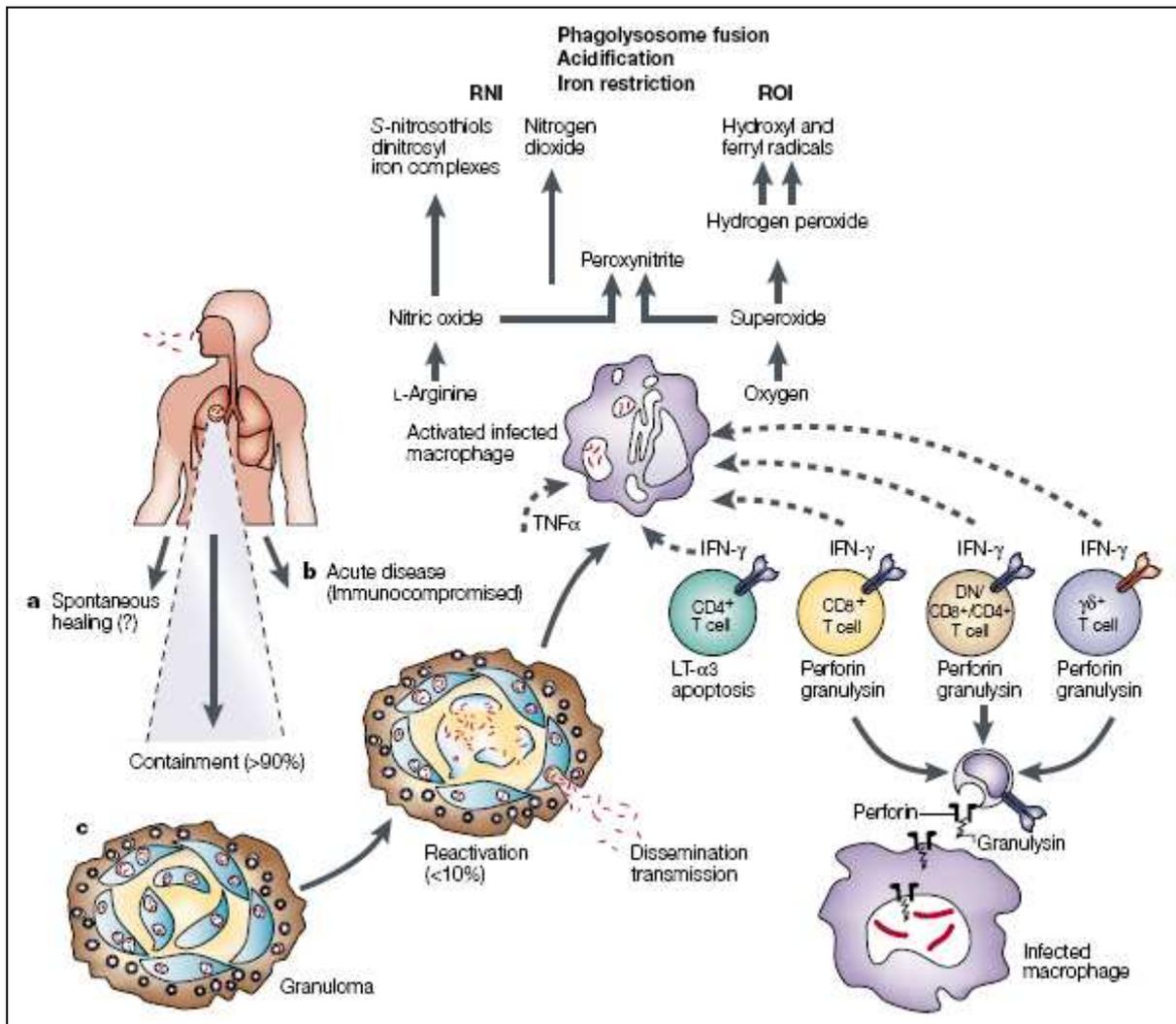


Figura 4 – Principais características da tuberculose: da infecção a defesa. (Extraído de KAUFMAMNN, 2001)

#### 1.4. Genotipagem Micobacteriana

O genoma do Mtb é bem conservado e estável, tendo sido seqüenciado em 1998. Foram demonstradas diferenças significativas na virulência dos diferentes isolados clínicos desta bactéria, sugerindo diferenças na expressão dos genes de virulência. Ainda é pouco estudado quais genes determinam à virulência de Mtb.

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares foi possível detectar as diferenças genéticas existentes entre as cepas de Mtb, o que foi importante para a diferenciação dos isolados clínicos e a identificação das cepas individuais de Mtb, possibilitando a realização de estudos epidemiológicos.

As técnicas utilizadas para genotipagem micobacteriana podem ser usadas como um instrumento adicional em estudos epidemiológicos, a fim de obter uma melhor compreensão dos fatores que podem influenciar a transmissão da tuberculose, identificar os riscos desta transmissão e para a avaliação dos programas regionais de controle da tuberculose. Esta identificação pode ajudar a resolver importantes questões epidemiológicas como a origem de uma infecção de uma pessoa, de uma família ou da comunidade, bem como a disseminação e detecção precoce de bactérias resistentes a antibióticos. Com a utilização de técnicas moleculares padronizadas, podemos comparar as cepas entre laboratórios, regiões, países e continentes (KANDUMA *et al*, 2003).

#### **1.4.1 IS6110 RFLP**

A tecnologia de RFLP é baseada na detecção de certas seqüências de inserção no DNA cromossômico. Isto é demonstrado através da digestão do DNA genômico com enzimas de restrição específicas e posterior análise dos padrões gerados após a separação dos fragmentos de DNA em gel de agarose (**Figura 5**) (KANDUMA *et al*, 2003).

IS6110 é o elemento mais utilizado como sonda para a técnica de RFLP. IS6110 é uma longa seqüência de 1361 pares de bases (bp), que foi detectada em membros do complexo Mtb e diferenças de apenas alguns nucleotídeos foram detectadas entre as cópias seqüenciadas. O número de cópias da seqüência IS6110 presentes no genoma é espécie e cepa específicos. A maioria das cepas de Mtb carrega de 8 a 15 cópias em diferentes posições no genoma. A tipagem por IS6110 é dos métodos moleculares mais usados em estudos epidemiológicos, devido ao seu alto grau de discriminação obtido por este elemento. Este processo é bem padronizado, fazendo com que os resultados gerados por diferentes laboratórios possam ser comparados, permitindo a realização de estudos nacionais e internacionais. As principais desvantagens deste método é que ele necessita de uma cultura viva de micobactéria, uma alta quantidade de DNA e é um processo demorado, que leva cerca de cinco dias para ser concluído (KANDUMA *et al*, 2003).

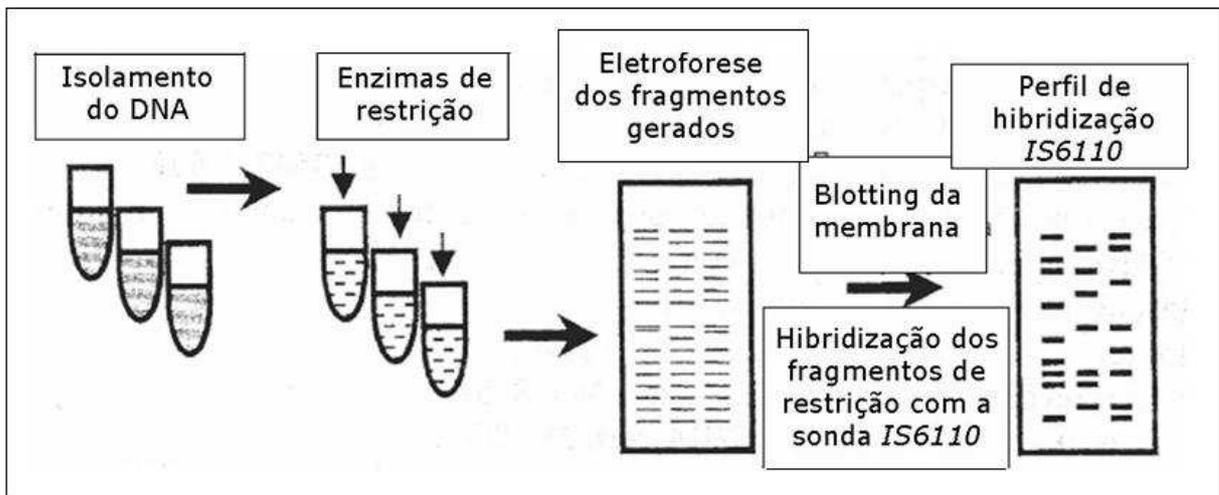


Figura 5 – Esquema representativo da técnica de RFLP

### 1.4.2 Spoligotipagem

A spoligotipagem (*spacer oligonucleotide typing* – tipagem de espaçadores oligonucleotídeos) é a técnica mais comum, depois da metodologia de RFLP-*IS6110*, para a diferenciação de famílias genéticas de *Mtb*. É um método baseado em PCR e tem uma clara vantagem técnica em relação à técnica de RFLP-*IS6110*, que é a capacidade técnica de realizar a análise a partir de amostras clínicas, possibilitando rápida detecção de determinada cepa (GOYAL *et al*, 1997).

A micobactéria possui uma região cromossômica distinta contendo múltiplas regiões de 36-bp (região DR - *direct repeats*) intercaladas por seqüências de DNA (35 a 41 bp) únicas de espaçadores (**Figura 6**). A spoligotipagem consiste na detecção destes espaçadores (cerca de 43) na região DR do genoma das cepas de *Mtb* (MATHEMA *et al*, 2006).

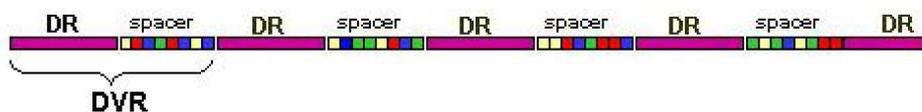


Figura 6 – Fragmento da região DR. 43 espaçadores são usados na técnica de spoligotipagem. (Extraído de <http://cgi2.cs.rpi.edu/~bennek/InfoWeb/Info/node3.html>)

O método baseia-se numa amplificação em PCR da região DR e hibridização de uma série de oligonucleotídeos representativos para cada uma das seqüências de espaçadores presentes na região DR. Os espaçadores podem ser representados por um código binário, positivo ou negativo, sendo positivo a presença do espaçador e negativo a ausência do espaçador na membrana hibridizada (MOSTRÖM *et al*,

2002). A presença de determinados espaçadores varia para diferentes cepas. A maior vantagem deste método é a capacidade de identificação das cepas sem a necessidade de isolar o DNA a partir de uma cultura de micobactérias. Além disso, ela pode ser aplicada para micobactérias presentes em escarro de pacientes com baciloscopia positiva (KANDUMA *et al*, 2003; YANG *et al*, 2000).



**Figura 7 – Padrões de alguns isolados através da spoligotipagem.** Os pontos pretos representam a presença do espaçador, e o espaço em branco indica a ausência de um espaçador em particular no DNA amplificado da micobactéria. (Extraído de GOYAL *et al*, 1997)

Esta metodologia também tem suas limitações. O poder de diferenciação da spoligotipagem é inferior à metodologia de RFLP-*IS6110* quando um alto número de cepas precisa ser avaliado, sendo melhor para um número menor de cepas (KANDUMA *et al*, 2003). Além disso, o RFLP-*IS6110* se mostrou ser mais eficiente na diferenciação individual para cada isolado (GOYAL *et al*, 1997). A spoligotipagem é utilizada para definir subespécies (“famílias”) presentes dentro do complexo Mtb (MOSTRÖM *et al*, 2002). Diferentes cepas podem ter padrões idênticos de spoligotipagem e distintos perfis em RFLP-*IS6110*. Por exemplo, a família Beijing, um grande grupo filogeneticamente relacionado de cepas de Mtb, possui uma centena de cepas com distintas variações em RFLP-*IS6110*, mas com um perfil quase idêntico na spoligotipagem, que é a falta dos espaçadores de 1 a 34. Juntos essas duas metodologias constituem um preciso e discriminatório sistema de genotipagem (MATHEMA *et al*, 2006).

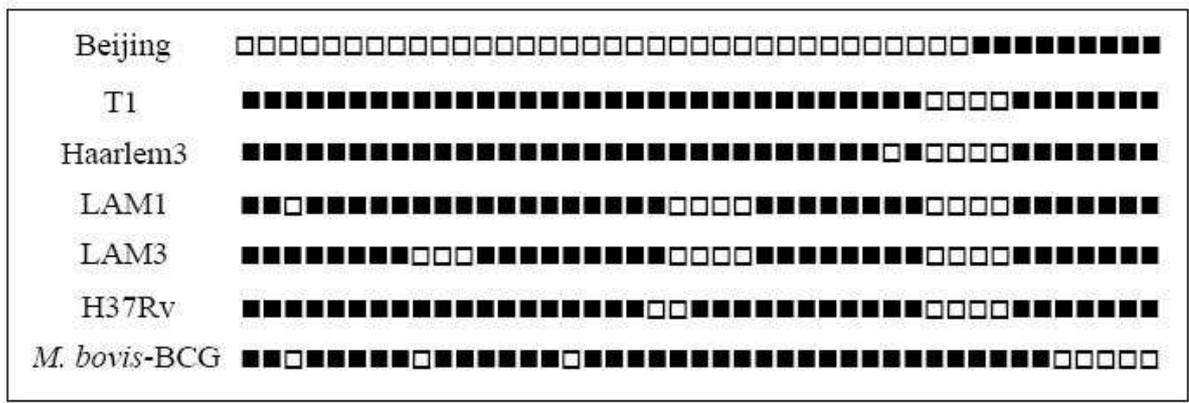
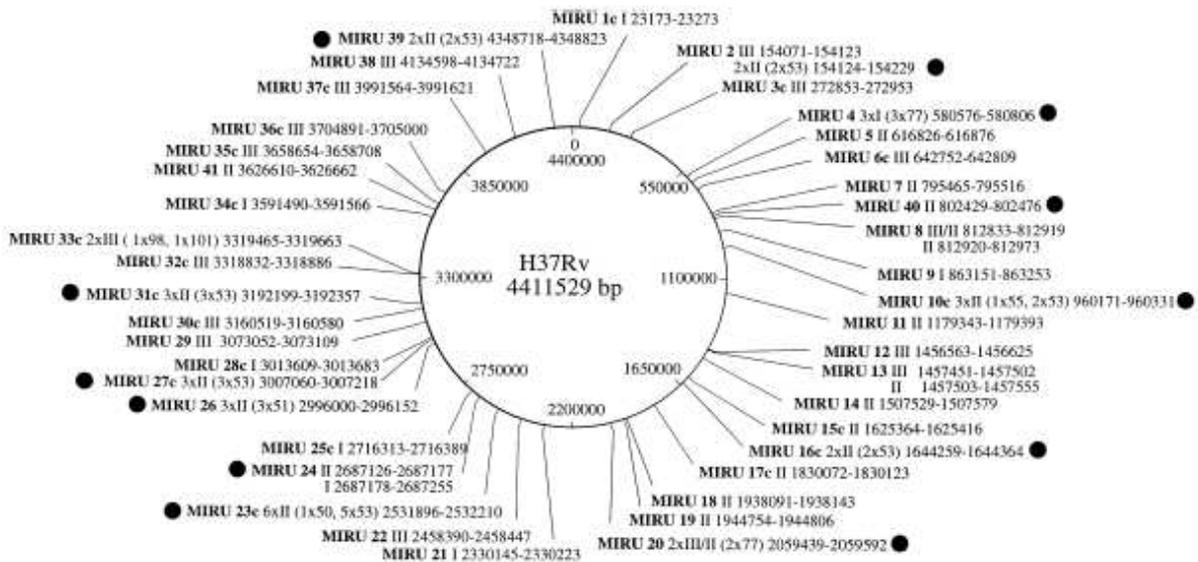


Figura 8 – Representação esquemática dos espaçadores característicos das principais famílias de cepas de *M.tuberculosis*. (Extraído de FILLIOL *et al*, 2002, com modificações).

### 1.4.3 MIRU-VNTR

Métodos baseados em minisatélites contendo números de VNTRs (*variable numbers of tandem repeats* – números variáveis simultâneos repetitivos) têm demonstrado ser eficaz na tipagem de micobactérias. Foram identificados 41 loci no genoma micobacteriano que foram chamados de MIRUs (*mycobacterial interspersed repetitive units* – unidades micobacterianas intercaladas repetitivas) (KANDUMA *et al*, 2003). MIRUs é uma classe de VNTRs formado por seqüências de DNA homólogos de 46 a 100 bp dispersados dentro de regiões isogênicas do genoma da Mtb. Estes loci foram rotulados de 1 a 41 dentro do cromossoma, e a posição destes loci está demonstrada na **Figura 9** (SUPPLY *et al*, 2000). Doze destes MIRUs mostraram ter polimorfismo entres os MIRUs de isolados de Mtb.



**Figura 9 – Localização dos 41 MIRU-loci no genoma da cepa H37Rv de Mtb.** Os números em negrito denotam o respectivo nº de cada locus do MIRU. Os 12 loci que possuem MIRUS variáveis (em nº) estão indicados por um ponto em negrito. (Extraído de SUPPLY *et al*, 2000).

Esses locus formam a base deste método de tipagem baseado em PCR que tem uma discriminação similar ao RFLP-*IS6110* para cepas com alto número de cópias e melhor para cepas com menor número de cópias (KANDUMA *et al*, 2003). A amplificação através de PCR de cada MIRU gera fragmentos de diferentes tamanhos para diferentes cepas de Mtb, e o número de repetições em cada locus pode ser determinado (BURGOS *et al*, 2004). Este método é reproduzível, sensível e específico para isolados de Mtb. É muito apropriado para estudos de epidemiologia mundial, além de poder ser usado para estudos da diversidade genética das cepas do complexo Mtb em diferentes níveis de divergência evolutiva (KANDUMA *et al*, 2003).

A metodologia de MIRU-VNTR produziu padrões mais distintos, quando comparada com RFLP-*IS6110* e com spoligotipagem. Num futuro próximo, esta metodologia deve substituir o RFLP-*IS6110* como melhor método de tipagem micobacteriana (KANDUMA *et al*, 2003).

#### 1.4.4 Principais famílias genéticas de *M. tuberculosis*

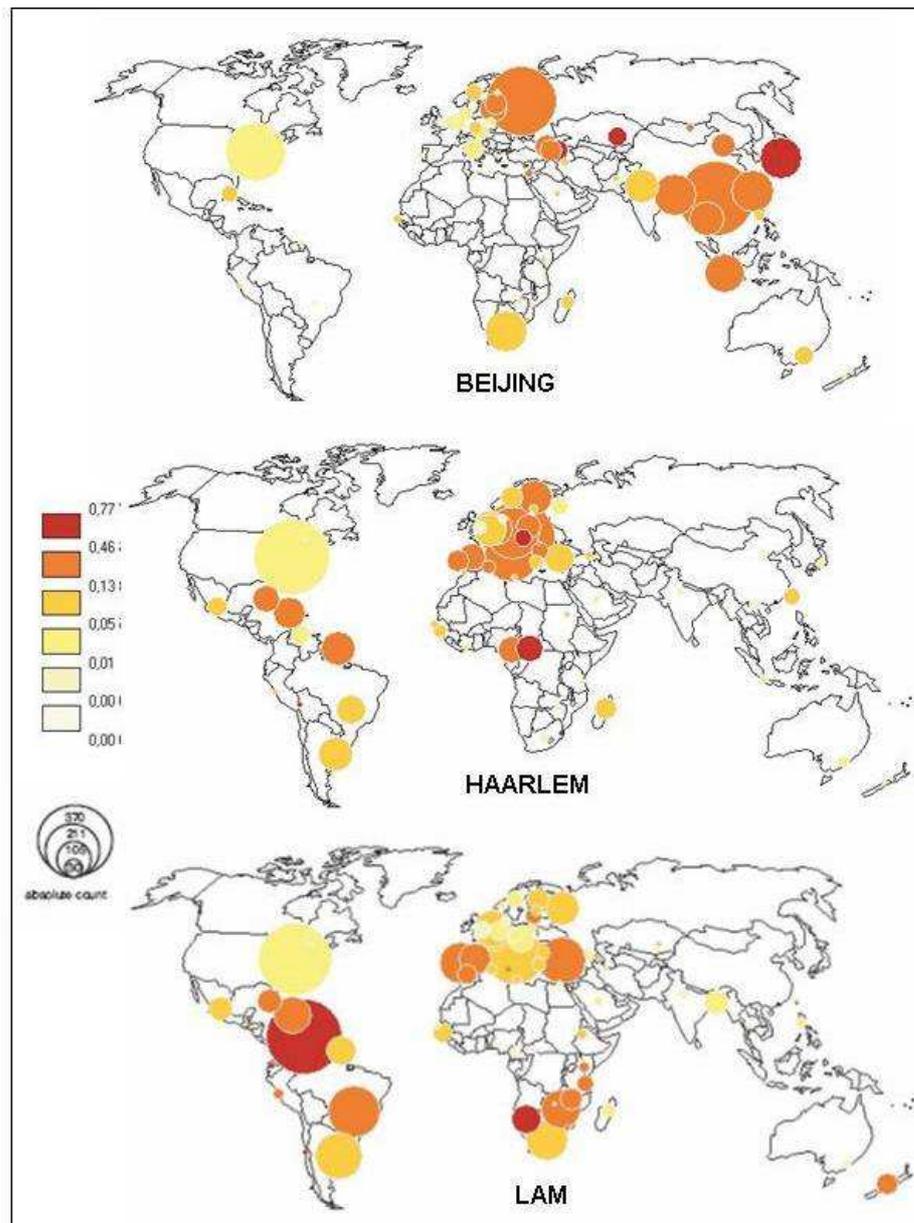
O papel da variabilidade genética de Mtb durante a infecção micobacteriana ainda continua incerto. De certo modo, até o início dos anos 90, quando foram introduzidos os métodos de tipagem micobacteriana, acreditava-se que o complexo Mtb constituía um grupo geneticamente conservado com limitadas diferenças

fenotípicas que influenciavam na patogenia. Com o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitiram avaliar genotipicamente os microorganismos, foi possível a diferenciação das diferentes cepas de Mtb e a possibilidade de realização de estudos epidemiológicos (LÓPEZ *et al*, 2003).

Os padrões de spoligotipagem permitem o agrupamento das diferentes cepas de Mtb em famílias epidemiologicamente importantes, como as famílias Beijing, Haarlem, S, T, X, East African-Indian (EAI) e a Latin American-Mediterranean (LAM) (LAZZARINI *et al*, 2007). Podemos caracterizar algumas das principais famílias de Mtb através dos perfis spoligotípicos da seguinte forma: Beijing, ausência de espaçadores 1 a 34; EAI, ausência de espaçadores 29 a 32 e 34 e a presença de, pelo menos, um espaçador entre 1 a 30; Haarlem, ausência de espaçadores 31, 33 a 36 e presença de pelo menos um espaçador entre 1 a 30; LAM, ausência de espaçadores 21 a 24, 33 a 36 e presença de, pelo menos, um espaçador entre 1 a 30; X, ausência de espaçadores 18 e 33 a 36; T, a ausência de espaçadores 33 a 36 e presença de, pelo menos, um espaçador entre 1 a 30, bem como presença de separadores 9 ou 10, e 31, e presença de, pelo menos, um espaçador entre 21 a 24 (FERDINAND *et al*, 2004).

As técnicas de biologia molecular desenvolvidas permitiram a caracterização das cepas em todo mundo, permitindo a comparação entre cepas de diferentes laboratórios e hospitais, desenhando o perfil epidemiológico e a prevalência destas famílias nas diferentes regiões geográficas,

A família Beijing representa cerca de 50% das cepas de Mtb no extremo oriente e Ásia, e cerca de 13% dos isolados globalmente. Na Europa, a família Haarlem representa cerca de 25% dos isolados. Na América do Sul, cerca de 50% das cepas pertence à família LAM. Três grandes famílias genotípicas, Haarlem, LAM e T, são mais freqüentes na África Central, América, Europa e América do Sul. Fora da Europa, cepas Haarlem foram encontradas principalmente na América Central e no Caribe (cerca de 25%). A presença da família LAM é mais elevada na Venezuela (65%), na bacia do Mediterrâneo e na região do Caribe. A família genérica T pode ser encontrada em todos os continentes (BRUDEY *et al*, 2006). Na **Figura 10** podemos observar a prevalência de três das principais famílias genotípicas no mundo.



**Figura 10 – Prevalência das principais famílias genéticas de Mtb no mundo** (Figura modificada de BRUDEY *et al*, 2006)

A família Beijing é a família genotípica de Mtb mais estudada. Ela foi descrita em 1995, e recebeu este nome devido sua descoberta ter ocorrido em Beijing, na China, região onde mais de 85% dos isolados de Mtb pertenciam a este grupo. Posteriormente, esta família se mostrou prevalente em outros países asiáticos e na Rússia, onde cepas Beijing encontram-se em 50% dos casos de tuberculose (MOKROUSOV *et al*, 2004; NARVSKAYA *et al*, 2002). As cepas desta família com maior frequência estão associadas com resistência a drogas em comparação com cepas de outras famílias (KREMER *et al*, 2004). A família LAM não foi até hoje bem caracterizada, apesar da sua grande importância em algumas regiões geográficas. Calcula-se que ela representa cerca de 50% das cepas na América do Sul e cerca

de 58% no estado do Rio de Janeiro. São necessários mais estudos relacionados a esta cepa, devido a sua importância para a epidemiologia na América do Sul e no Brasil (LAZZARINI *et al*, 2007).

A partir do desenvolvimento das técnicas moleculares que permitiram a diferenciação das cepas de Mtb, vários estudos vêm sendo realizados a fim de caracterizar as diferenças existentes na virulência e imunogenicidade entre bactérias de genótipos distintos (LÓPEZ *et al*, 2003, CHACÓN-SALINAS *et al*, 2005).

### **1.5. Virulência Micobacteriana**

Virulência pode ser definida como a capacidade de um microorganismo de provocar um processo patológico no macroorganismo, a doença, escapando das defesas do hospedeiro (SILVER *et al*, 1998). A virulência micobacteriana é tradicionalmente determinada com base nos índices de mortalidade e morbidade nos modelos animais, onde é avaliado o percentual de animais (tradicionalmente camundongos) infectados que morrem e o tempo que este animal leva para morrer; a quantificação do número mínimo de bactérias capaz de induzir a doença, assim como o número de bactérias encontradas no hospedeiro após a infecção inicial. (SMITH, 2003). No entanto, estes estudos são demorados e dispendiosos, e dificilmente podem ser aplicados para comparação de virulência de grande quantidade das cepas. Além disso, as diferenças na patogenia e nos mecanismos de proteção necessários para a contenção da doença variam entre as espécies e os resultados obtidos nos camundongos nem sempre podem ser aplicados para a compreensão da tuberculose humana (LI *et al*, 2002).

A avaliação do crescimento das cepas de Mtb em macrófagos humanos *in vitro* é um método alternativo para a avaliação das propriedades biológicas de uma bactéria associada à virulência. Normalmente são utilizados macrófagos de culturas primárias obtidas a partir de monócitos derivados de medula (MDM) diferenciados para macrófagos *in vitro*. Também podem ser utilizados macrófagos alveolares obtidos a partir de lavados broncoalveolares, mas a obtenção destes é limitado (SMITH, 2003). Entretanto, as células obtidas a partir de diferentes doadores humanos são variáveis quanto às suas características imunogenéticas, e estas podem contribuir para o caráter da resposta dos macrófagos contra micobactéria, além das propriedades estudadas da bactéria. Para padronizar o sistema de teste, foi proposta a utilização de linhagens celulares permanentes de monócitos humanos

THP-1, que podem ser diferenciados em células fagocíticas macrófagos-similar pela adição de ésteres de forbol. Estudos têm demonstrado que macrófagos diferenciados de THP-1 são muito similares aos MDMs humanos na sua resposta à infecção com Mtb (STOKES E DOXSEE, 1999; RIENDEAU e KORNFIELD, 2003).

A avaliação do crescimento intracelular da micobactéria dentro dos macrófagos humanos infectados é um dos principais parâmetros analisados nos estudos de virulência de cepas de Mtb. ZHANG *et al*, demonstrou que micobactérias virulentas crescem mais rápido que avirulentas. (ZHANG *et al*, 1998; SILVER *et al*, 1998 e van HELDEN *et al*, 2001 (b)). Foi demonstrado que a melhor forma para avaliar as características do crescimento *in vitro* em macrófagos humanos é a infecção com baixas concentrações de Mtb que não altera a viabilidade dos macrófagos no período de observação, permitindo o crescimento intracelular da Mtb (ZHANG, *et al*, 1998).

Além da avaliação do crescimento intracelular das micobactérias, outros parâmetros também estão diretamente relacionados à virulência micobacteriana. Estudos demonstraram que diferentes genótipos têm a capacidade de induzir diferentes níveis de expressão e produção de citocinas durante a infecção (CHACÓN-SALINAS *et al*, 2005; van HELDEN *et al*, 2001 (a)). Também foi demonstrado que cepas consideradas mais virulentas induzem um perfil de citocinas anti-inflamatórias, com produção de IL-4 e IL-13, levando a uma resposta Th2 não protetora, enquanto que outras cepas menos virulentas tendem a desenvolver uma resposta Th1 protetora com indução de síntese de IL-12 (MANCA *et al*, 2004).

Podemos observar diferenças também na capacidade de bactérias virulentas e avirulentas induzirem diferentes níveis de apoptose e necrose. CHEN *et al*, demonstrou que cepas virulentas e avirulentas de Mtb são capazes de provocar morte dos macrófagos, mas cepas virulentas induzem menos apoptose mais necrose em macrófagos infectados (CHEN *et al*, 2006).

A quantificação do crescimento intracelular e no meio líquido de Mtb e a caracterização da resposta dos macrófagos aos diferentes genótipos de Mtb pode ser um método eficaz no estudo da virulência de grande número das cepas de Mtb. A análise dos dados obtidos *in vitro* junto com os dados de genotipagem e características clínicas e epidemiológicas das cepas de micobactéria permitirá a avaliação relativa de virulência destas. A criação de uma metodologia padronizada para comparação dos genótipos de micobactérias isoladas nas diferentes regiões e

países em relação à ativação dos macrófagos e o crescimento intracelular da bactéria, utilizando os macrófagos humanos da linhagem THP-1, pode ser aplicada como ferramenta na busca dos marcadores genéticos para virulência/patogenicidade/ativação do sistema imune inata no estudo da composição genética das cepas isoladas.

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1. Objetivo Geral

Caracterizar cepas de *M. tuberculosis* de genótipos diferentes, prevalentes no Brasil, em relação a sua virulência e a resposta antibacteriana dos macrófagos humanos da linhagem THP-1.

### 2.2. Objetivos Específicos

- a) Avaliar a capacidade de crescimento dos diferentes isolados clínicos de *M. tuberculosis* às condições de crescimento em meio líquido.
- b) Avaliar a virulência de cepas *M. tuberculosis* isoladas de pacientes com tuberculose em modelo de infecção dos macrófagos humanos *in vitro* comparando a sua capacidade de crescimento em macrófagos e indução de morte nestas células;
- c) Avaliar a resposta dos macrófagos às cepas de *M. tuberculosis*, quantificando a produção das citocinas pró e anti-inflamatórias;
- d) Comparar, com base nos parâmetros utilizados, a virulência entre os diversos grupos genéticos de *M. tuberculosis*.

### 3. METODOLOGIA

---

#### 3.1. Cultura de células humanas

As células de monócitos humanos da linhagem THP-1 (ATCC 202-TIB) foram cultivadas em garrafas de plástico de 25 e 75 cm<sup>2</sup> (Corning) em meio *Dulbecco's Modified Medium F-12* (DMEM F-12) (Gibco BRL), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco BRL), incubadas em estufa (Forma Scientific – water-jacketed incubator) à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os todos os experimentos, as células foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços (Cellstar) (6 × 10<sup>5</sup> células/mL – 100µL/poço) na presença de 50 nM de *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA; Sigma), e incubadas por 48h. Após este período, ocorreu à diferenciação dos monócitos para macrófagos, com o estímulo do PMA. A monocamada foi lavada e o meio substituído por meio completo sem PMA. Após 24h de incubação, as culturas foram infectadas.

#### 3.2. Micobactérias

As cepas de Mtb isoladas dos pacientes com tuberculose atendidos no Hospital Universitário da UFRJ no Rio de Janeiro (PCT, Dr. Afrânio Kritski) e no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo foram genotipadas como parte de um grande projeto populacional e gentilmente cedidas pelo Dr. Philip Suffys do Instituto Oswaldo Cruz –RJ, e pela Dra. Maria Alice da Silva Telles do Instituto Adolfo Lutz. As culturas das cepas padrão de Mtb H37Rv e H37Ra foram cedidas pelo Dr. Philip Suffys. *M. bovis* BCG (vacina onco-BCG viva, cepa Moreau, Copenhagen SEED#July, 1978) foi gentilmente cedida pelo Instituto Butantan – SP.

As culturas estoque de Mtb foram mantidas em meio de cultura sólido, Lowenshtein-Jensen (LJ) (DIFCO), com suplemento a base de ovo de galinha, a 2-4°C. Para o preparo da cultura estoque, duas alças de colônias micobacterianas foram retiradas do meio de cultura LJ e colocadas em um tubo com tampa de rosca contendo pérolas de vidro, sem líquido, agitando-se vigorosamente em vortex (Biomotic). Após a agitação, adicionou-se 1 mL de meio de cultura líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO) acrescido de 0,05% Tween 80 e 10% de suplemento

albumina, dextrose, catalase (ADC) (BD BBL), agitando novamente em vortex. Para destruir os grumos formados pela Mtb durante o seu crescimento e obter uma suspensão homogênea, o tubo foi colocado em ultra-som de banho (Ultrasonic – Unique MaxiClean800) por 1 minuto. Desta suspensão, com o auxílio de uma alça de cultura, foram repicadas 3 alças para o meio sólido LJ fresco e alíquotas de 1 mL foram retiradas e colocadas em tubos, adicionando-se 20% de glicerol, e estocadas a -70°C.

Outra alíquota foi diluída em meio 7H9 completo até 5 unidades, utilizando-se um kit de quantificação de densidade da cultura bacteriana (Rússia). De acordo com as instruções do fabricante do kit, as 5 unidades correspondem a concentração de aproximadamente  $5 \times 10^8$  bactérias/ml. As culturas foram adicionalmente diluídas a 1:10 em meio 7H9 e mantidas em estufa a 37°C por três dias, com agitação diária, para ser utilizado nos experimentos.

Em experimentos preliminares, foram avaliadas curvas de crescimento da cepa H37Rv e de alguns isolados clínicos que demonstraram que no 3º dia as culturas encontram-se na fase logarítmica de crescimento de Mtb. Em todos os experimentos foram usadas 4º e 5º gerações de Mtb a partir do seu isolamento do paciente.

Para padronizar a dosagem das micobactérias a ser usada, a concentração bacteriana foi determinada através da quantificação da densidade ótica da cultura, DO a 600nm, utilizando espectrofotômetro (Hitachi – modelo U-1100) e verificação das unidades formadoras de colônias (CFU) de bactéria crescidas no meio sólido Middlebrook 7H10. Todas as culturas de Mtb e BCG crescidas por três dias em meio 7H9 completo foram diluídas até obtenção da  $DO_{600} = 0,066$ , o que corresponde a concentração de  $10^7$  CFU/ml.

### **3.3. Infecção dos macrófagos**

Os macrófagos foram infectados em diferentes proporções: MOI = 1:1 (uma bactéria por macrófago), para análise do crescimento das micobactérias, MOI = 10:1 para análise das citocinas secretadas pelos macrófagos e MOI = 50:1 para avaliação da morte celular. Pelo menos 6 poços foram infectados para cada tipo de avaliação. Após 3h de contato bactéria-macrófago, ocorrendo a fagocitose das bactérias, o sobrenadante foi removido para a retirada das bactérias extracelulares e a

monocamada das células foi lavada com PBS. Posteriormente foi adicionado meio DMEM-F12 completo (DIA 0). As células infectadas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 6 dias.

### **3.8. Quantificação do crescimento intracelular das micobactérias**

A quantificação das bactérias em macrófagos infectados (MOI = 1:1) após 3h (dia 0) e 6 dias (dia 6) de infecção, foi feita por plaqueamento em meio sólido (o método bacteriológico - ensaio de CFU).

Os macrófagos foram lisados com solução de saponina a 0,1% por 20 minutos. O lisado foi vigorosamente agitado, sonicado em ultra-som de banho, e diluído em PBS estéril na diluição de 10<sup>-1</sup> (dia 0) e 10<sup>-3</sup> (dia 6). Uma alíquota de 40µL da diluição foi semeado em ágar Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado com 10% de Meio de Enriquecimento OADC (BD BBL). As placas foram incubadas por 21 dias em estufa à 37°C, as colônias foram quantificadas (em CFU/mL) e os valores expressos em Log10. A capacidade de crescimento intracelular de cada cepa foi expressa através da média dos aumentos dos Logs de cada cepa nos dias 0 e 6 ( $\log_{10}CFU_{dia6} - \log_{10}CFU_{dia0}$ ), e pela razão dos CFUs no dia 0 e 6 ( $CFU_{dia6}/CFU_{dia0}$ ).

### **3.9. Quantificação do crescimento micobacteriano em meio de cultura líquido Middlebrook 7H9**

As culturas de micobactérias utilizadas na infecção dos macrófagos foram avaliadas em relação à capacidade de crescimento em meio de cultura 7H9. Foi avaliada a concentração de bactérias no dia 0 e 6 através da medição da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm. A capacidade de crescimento da micobactéria no meio 7H9 foi expressa através da razão de crescimento, obtida pela razão das DOs nos dias 6 e 0 ( $DO_{dia6}/DO_{dia0}$ ).

### **3.10. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados**

PARK et al (2006) demonstraram que a infecção dos macrófagos por Mtb patogênica em alta dose de infecção (50 bactérias/macrófago) induz necrose nestas

células. Para comparar a capacidade dos diferentes isolados de Mtb de induzir necrose nos macrófagos, as células foram infectadas com MOI = 50:1. Os macrófagos infectados foram mantidos em cultura pelo período de 6 dias. Nos dias 3, 4 e 5 de infecção, a viabilidade dos macrófagos foi avaliada através da utilização do corante azul de tripan, que penetra somente as células mortas por necrose, corando-as de azul, que permite desta forma sua quantificação através microscopia ótica (Microscópio Invertido Nikon, 400x). O resultado foi expresso pela porcentagem de células mortas em cultura.

### **3.11. Quantificação de citocinas**

Os sobrenadantes dos macrófagos infectados com MOI = 10:1 foram coletados em 24h (dia 1) e 72h (dia 3) após a infecção e mantidos congelados a -20°C. A quantidade de citocinas presente nos sobrenadantes foi quantificada através do ensaio ELISA *sandwich* utilizando kits correspondentes (BioSource, Bélgica). Foram quantificadas as citocinas TNF- $\alpha$  (Cytoset CHC1753), IL-12+p40 (Cytoset CHC1563), IL-10 (Cytoset CHC1323), IL-13 (Cytoset CHC2223) e TGF- $\beta$  (Cytoset CHC1683). As citocinas foram quantificadas de acordo com o protocolo do fabricante.

### **3.12. Forma de análise dos resultados**

Os dados de quantificação das citocinas, morte celular e CFU foram analisados pelo ANOVA e Student t test.

### **3.13. Modelo de pesquisa**

Segue abaixo o fluxograma da seqüência experimental utilizada neste trabalho.

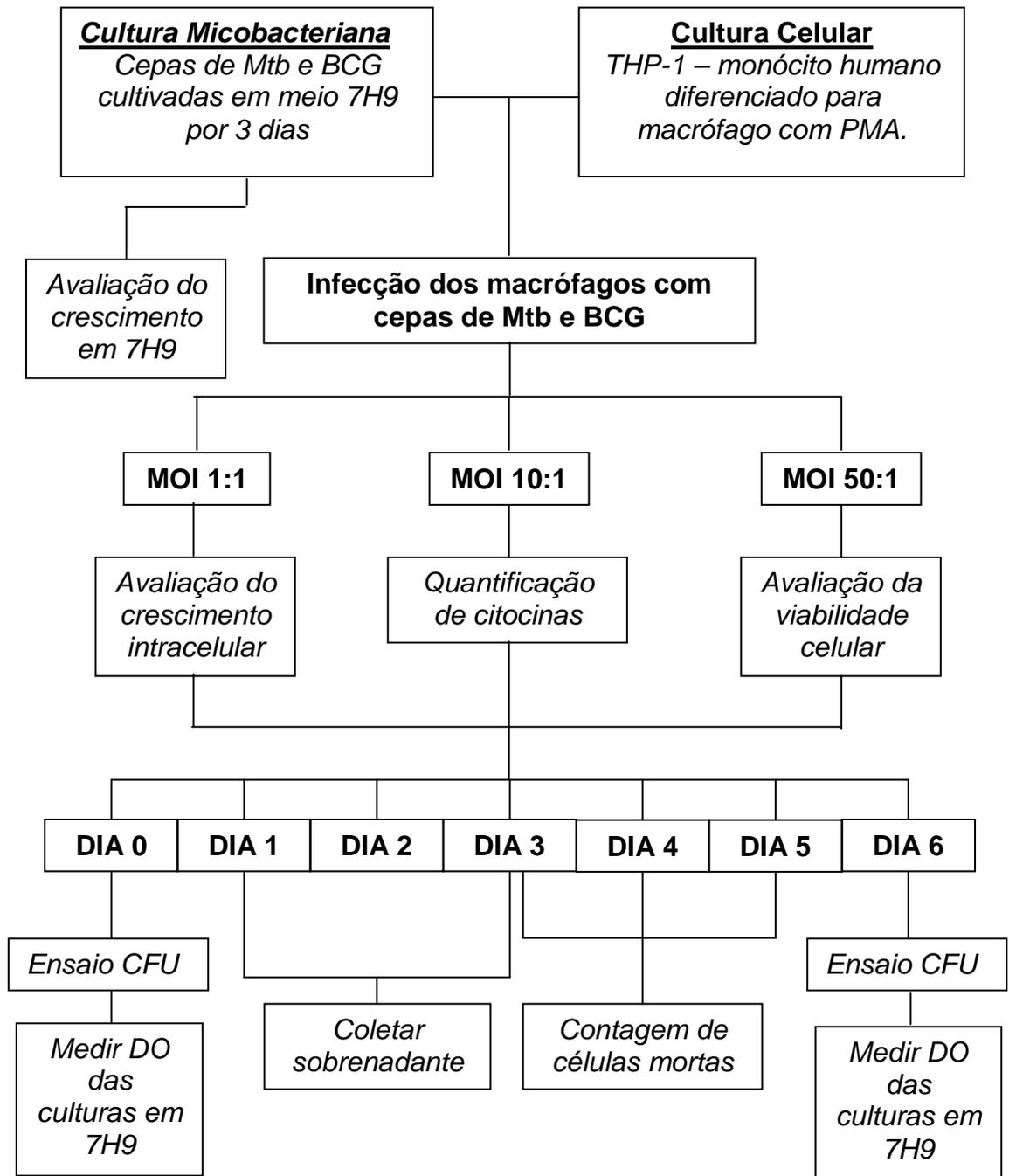


Figura 11 - Fluxograma da seqüência experimental utilizada.

### **3.14. Conduta de trabalho e instruções em caso de acidentes**

Todo trabalho experimental foi realizado em área de biossegurança de nível 3. Toda manipulação com micobactérias foi efetuada com uso dos equipamentos de proteção individual, EPI (luvas e máscara descartáveis, jaleco e touca apropriados), dentro do cabine de biossegurança 2A. Todo material contaminado com Mtb foi coletado em sacos de autoclave dentro da cabine de biossegurança, ou imerso em

solução de hipoclorito de sódio 4%, e descontaminado por autoclave a 121°C por 20 minutos.

Em caso de derramamento de qualquer líquido ou meio de cultura contendo micobactérias na área de trabalho deve-se imediatamente colocar gaze ou papel embebido com hipoclorito de sódio 4% ou Lysoform® 20% sobre a região contaminada e deixar por aproximadamente 20 min. Com o auxílio de luvas, fazer a limpeza do local.

Em caso de ocorrer contaminação em qualquer parte de laboratório deve-se retirar as pessoas do ambiente. Uma pessoa deverá colocar máscara bico de pato, luvas, jaleco, touca. Em cima da região contaminada, colocar gaze ou papel embebidos com hipoclorito de sódio 4% ou Lysoform® 20% e isolar a área. Após aproximadamente 20 min, coletar o material contaminado, inclusive os EPIs usados, e enviar para autoclavagem. Após este período, fazer a limpeza do local.

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Genotipagem das cepas de Mtb

Para comparar a virulência das famílias genéticas de Mtb prevalentes no Brasil, nós selecionamos 4-6 cepas de cada família genética anteriormente isolada no Rio de Janeiro e São Paulo e genotipadas pelos Dr. Philip Suffys (Fiocruz, RJ) e Dra. Maria Alice da Silva Telles (Instituto Adolfo Lutz, SP). As características das cepas utilizadas neste trabalho estão apresentadas na **Tabela 1**. A caracterização genotípica dos isolados clínicos foi realizada através das técnicas de spoligotipagem e 12 loci-MIRU-VNTR tipagem. Algumas cepas, principalmente cepas Beijing, foram identificadas adicionalmente pelo RFLP-*IS6110*.

**Tabela 1 – Perfil das cepas de Mtb utilizadas neste trabalho.**

ORIGEM	ISOLADOS CLÍNICOS	Nº DE ESPAÇADORES (RFLP-IS6110)	MIRU/VNTR	SPOLIGOTIPO (Famílias)	Cluster	IS6110 PCR invertido	RESISTÊNCIA A DROGAS	Ano do isolamento
SP	ZT272	16	223325173533	Beijing	Pequeno cluster	ancestral	INH, RIF, SM	2001
	8975	16	223325173533	Beijing	Pequeno cluster	ancestral	INH, RIF, SM	2001
	8389	15	223325133533	Beijing	Non cluster	ancestral	INH, EMB, SM	2001
	ZT264	15	223325173533	Beijing	Non cluster	não determinado	Sensível para todas as drogas	2001
	ZT306	16	223326173533	Beijing	Non cluster	moderno	Sensível para todas as drogas	2001
	5351		223325173533	Beijing	Non cluster	moderno	Sensível para todas as drogas	2000
RJ	2172/03		223326173423	Beijing	Non cluster	moderno		2003
Rússia	1471	17		Beijing	Grande cluster	moderno	MDR	2003
RJ	238/03			LAM 3	Cluster	—		2003
	1542/03			LAM 3	Cluster	—		2003
	1777/03			LAM 3	Non cluster	—		2003
	295/03			LAM 1	Cluster	—		2003
	726/03			LAM 1	Non cluster	—		2003
	2024/03			LAM new 37	Non cluster	—		2003
	1851/03			Haarlem 3	Cluster	—		2003
	204/03			Haarlem 3	Cluster	—		2003
	998/02			Haarlem 3	Non cluster	—		2002
	106/03			T1	Cluster	—		2003
	182/03			T1	Cluster	—		2003

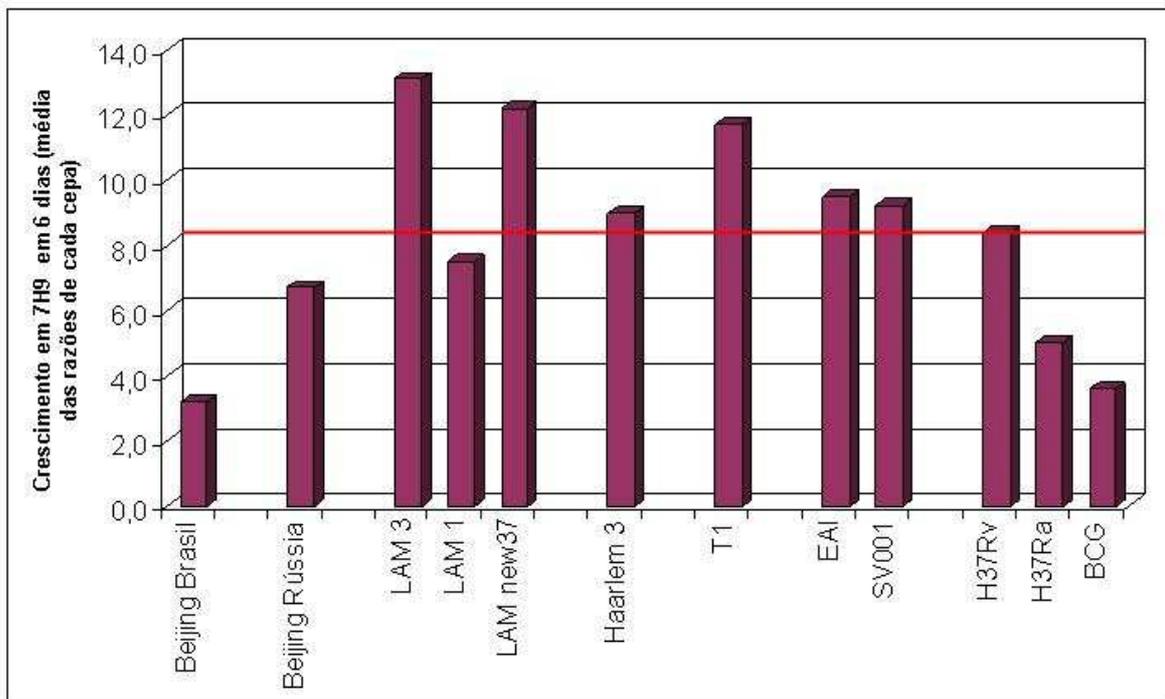
Os resultados mostram que a maioria das cepas Beijing isoladas no Brasil estão representadas por um caso único de tuberculose e cada uma apresentou diferentes padrões de RFLP-IS6110, menos os isolados ZT272 e 8975 que foram obtidos de dois irmãos adolescentes, nascidos no Brasil, apresentando tuberculose em São Paulo. Os irmãos anteriormente tiveram contato com uma tia da Colômbia, portadora desta doença (informação obtida da Dra. Maria Alice da Silva Telles). Diferentemente das cepas Beijing isoladas no Brasil, a cepa 1471 representa um grande cluster dentro dos casos de tuberculose (B0) provocados por micobactérias com perfil idêntico de RFLP-IS6110, no total mais do que 70 isolados dos pacientes não-relacionadas epidemiologicamente em São Petersburgo, uma cidade de 5 milhões de habitantes no noroeste da Rússia (NARVSKAYA et al, 2002). Apesar da cepa russa e das cepas brasileiras apresentarem perfil de RFLP-IS6110 diferente, 5 destas cepas (4 brasileiras e russa) apresentaram um perfil 12-loci MIRU-VNTR idêntico.

Adicionalmente, as cepas Beijing foram submetidas à técnica IS6110PCR invertido (MOKROUSOV et al., 2006 (b)), realizada pelo Dr. Igor Mokrousov (Instituto Pasteur, Rússia). Este ensaio foi útil na diferenciação das sub-linhagens da família Beijing em Beijing modernas e ancestrais. Os resultados demonstraram que 3 cepas brasileiras das 7 analisadas (cerca de 30%) apresentaram perfil ancestral, enquanto a maioria das cepas Beijing circulantes na Rússia são modernas (97-98%) (MOKROUSOV et al, 2006 (b)). Entre as cepas Beijing isoladas no Brasil, uma foi MDR, uma poliresistente e pelo menos 3 foram sensíveis para todas drogas de primeira linha para tratamento de tuberculose. A cepa russa como todas cepas deste cluster foi MDR. No total, cerca de 60% das cepas Beijing na Rússia apresentam multi-droga resistência (NARVSKAYA et al., 2002). As cepas de LAM, Haarlem e T1 foram representadas por isolados clusterizados e não-clusterizados.

#### **4.2. Avaliação do crescimento em meio de cultura 7H9 das cepas de Mtb.**

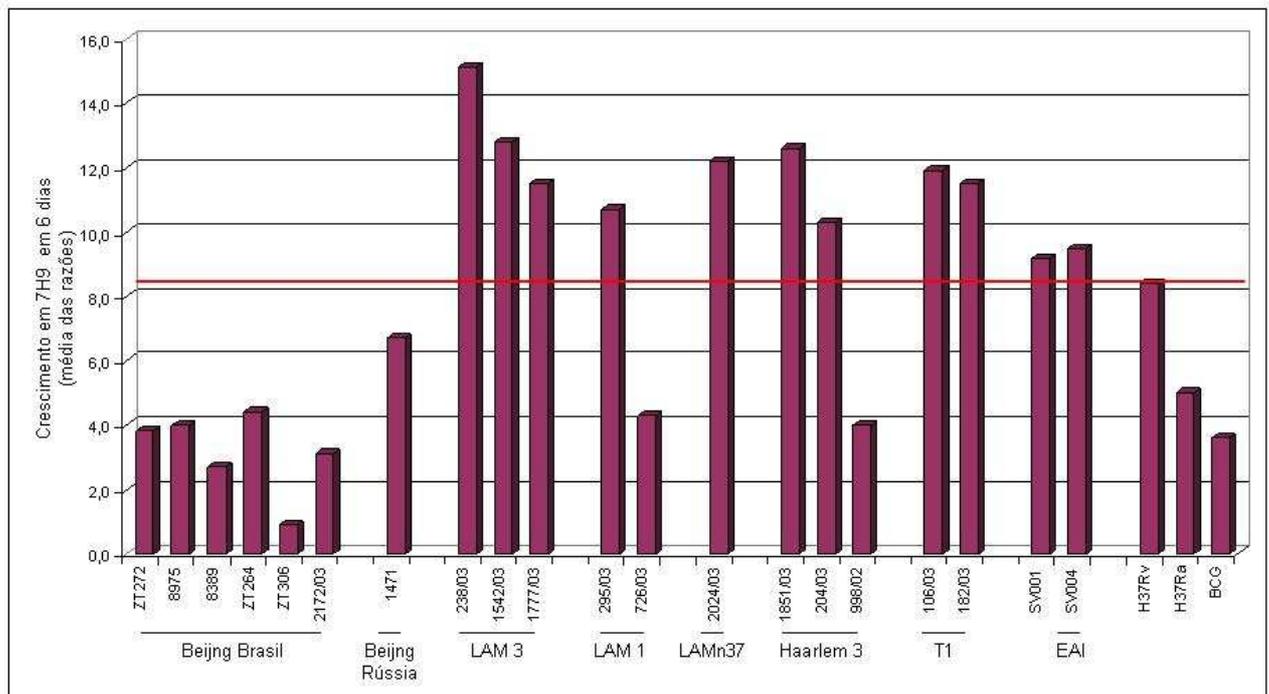
A capacidade da Mtb, uma bactéria intracelular facultativa, de crescer em meio líquido, demonstra as propriedades biológicas de adaptação da bactéria (*fitness* bacteriano) (DAVIES et al, 2000). Nós comparamos a capacidade de crescimento dos isolados clínicos em meio líquido Middlebrook 7H9 suplementado com 10% do meio ADC após 6 dias de incubação. O crescimento foi quantificado como a razão entre as médias da densidade ótica da cultura medida no dia 0 e no dia 6, utilizando espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. Os resultados obtidos para cada família genética e para cada cepa estudada isoladamente estão demonstrados na **Figura 12** e na **Figura 13**, respectivamente.

A **Figura 12** mostra uma diferença no crescimento das cepas padrão Mtb H37Rv e H37Ra. A cepa virulenta H37Rv cresceu significativamente mais em comparação com H37Ra. As cepas dos isolados clínicos dos genótipos prevalentes no Brasil (LAM, Haarlem, T1) apresentaram, na maioria das vezes, um crescimento semelhante ou maior que H37Rv. Diferentemente destas cepas e da cepa Beijing da Rússia, que também apresentou um crescimento compatível com H37Rv, as cepas da família Beijing isoladas no Brasil cresceram significativamente menos. O crescimento das cepas Beijing do Brasil foi menor que H37Ra e semelhante à BCG.



**Figura 12 – Crescimento das diferentes famílias genéticas de Mtb em meio de cultura Middlebrook 7H9.** As culturas de Mtb na fase logarítmica de crescimento foram diluídas em meio líquido até concentração determinada e incubadas por 6 dias a 37°C. O crescimento das cepas foi avaliado através da medição da densidade ótica (DO) das culturas no dia 6 e dia 0 e representado pela razão das médias das DOs do dia 0 e 6 ( $DO_{dia\ 6}/DO_{dia\ 0}$ ). A média de cada família foi determinada. A linha vermelha representa a média do crescimento da cepa H37Rv.

Entretanto, a comparação entre as cepas individuais pertencentes ao mesmo grupo genético mostrou que existem cepas que apresentam um padrão de crescimento diferente em comparação com outras cepas do mesmo grupo. Duas cepas entre as examinadas (726/03 – LAM1 e 998/02 – Haarlem 3) apresentaram um crescimento em meio 7H9 significativamente menor (**Figura 13**).



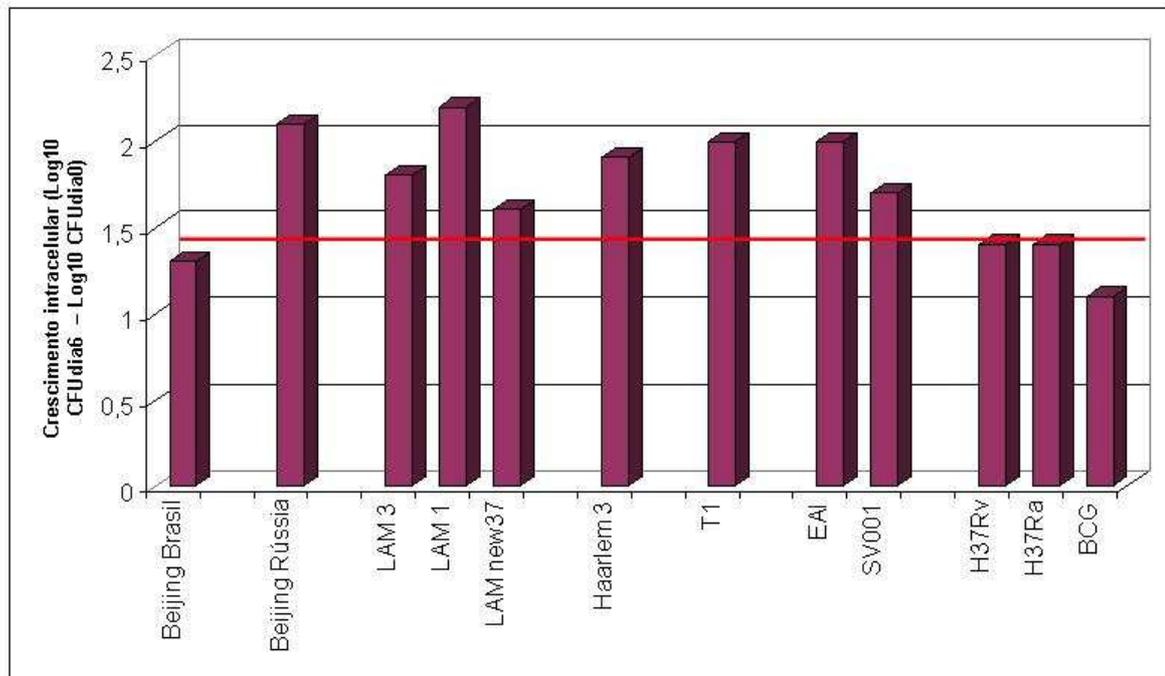
**Figura 13 – Crescimento das diferentes cepas de Mtb em meio de cultura Middlebrook 7H9.** As culturas de Mtb na fase logarítmica de crescimento foram diluídas em meio líquido até concentração determinada e incubadas por 6 dias a 37°C. O crescimento das cepas foi avaliado através da medição da densidade ótica (DO) das culturas no dia 6 e dia 0 e representado pela razão das médias das DOs do dia 0 e 6 (Dodia 6/Dodia 0). A linha vermelha representa a média do crescimento da cepa H37Rv.

#### **4.3. Avaliação do crescimento intracelular das cepas de Mtb em macrófagos infectados**

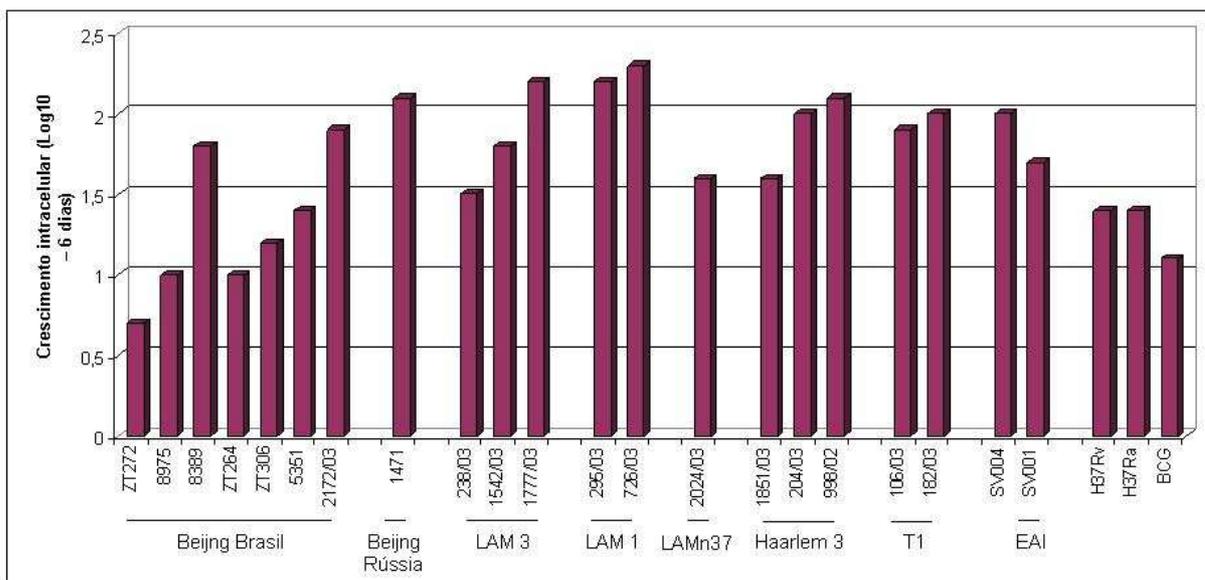
O crescimento intracelular das cepas de Mtb nos macrófagos infectados foi avaliado após 6 dias de infecção. A capacidade de crescimento intracelular de cada família genética e de cada cepa individualmente foi expressa através da média dos aumentos dos Logs de cada cepa nos dias 0 e 6 ( $\log_{10}CFU_{dia6} - \log_{10}CFU_{dia0}$ ) (**Figura 14** e **Figura 15**). As médias dos valores expressos nos gráficos e o crescimento representado pela razão dos CFUs no dia 0 e 6 ( $CFU_{dia6}/CFU_{dia0}$ ) estão apresentados na **Tabela 2**.

O crescimento intracelular de todas as cepas clínicas foi comparado com a capacidade de crescimento das cepas padrão, H37Rv e H37Ra. As cepas das famílias LAM, Haarlem, T1 e EAI apresentaram um crescimento maior em relação às cepas padrão (**Figura 14**). A maioria das cepas da família Beijing isoladas no Brasil (com exceção das cepas 8389 e 2172/03 – **Figura 15**) cresceu menos que

as cepas padrão. Podemos observar na **Figura 15** que dentro de uma mesma família há variações no crescimento entre as diferentes cepas.



**Figura 14 – Crescimento intracelular das diferentes famílias genéticas de Mtb em macrófagos infectados.** Células THP-1 foram infectadas em relação de infecção 1 bactéria/macrófago, MOI= 1:1. O crescimento intracelular das micobactérias foi avaliado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 6 de infecção, e este crescimento foi determinado através da diferença das médias dos Log<sub>10</sub> de CFU obtidos no dia 6 e dia 0 ( $\log_{10}$  CFU<sub>dia 6</sub> -  $\log_{10}$  CFU<sub>dia 0</sub>) para cada cepa de cada grupo. A linha vermelha representa a média do crescimento da cepa padrão Mtb H37Rv .



**Figura 15 – Crescimento intracelular das diferentes cepas de Mtb em macrófagos infectados.** Células THP-1 foram infectadas em relação de infecção 1 bactéria/macrófago, MOI= 1:1. O crescimento intracelular das micobactérias foi avaliado através do ensaio de CFU nos dias 0 e 6 de infecção e este crescimento foi determinado através da diferença das médias dos Log<sub>10</sub> de CFU obtidos no dia 6 e dia 0 ( $\log_{10}$  CFU dia 6 –  $\log_{10}$  CFU dia 0). A linha vermelha representa a média do crescimento da cepa padrão Mtb H37Rv .

O maior crescimento foi apresentado pelas cepas LAM1 que cresceram 7 vezes mais do que H37Rv (**Tabela 2**). A cepa 1471 Beijing da Rússia cresceu 5 vezes e a cepa EAI cresceu 4 vezes mais em comparação com a cepa padrão, seguidas pelas T1 – 3,6 vezes, Haarlem3 – 3,2 vezes, LAM3 – 2,7 vezes, e LAM n37 – 1,6 vezes mais. A cepa *M. bovis* BCG cresceu menos do que qualquer cepa de Mtb. Não foi observada diferença no crescimento em macrófagos THP-1 entre cepas Mtb H37Rv e H37Ra.

**Tabela 2 – Representação dos dados de crescimento intracelular.**

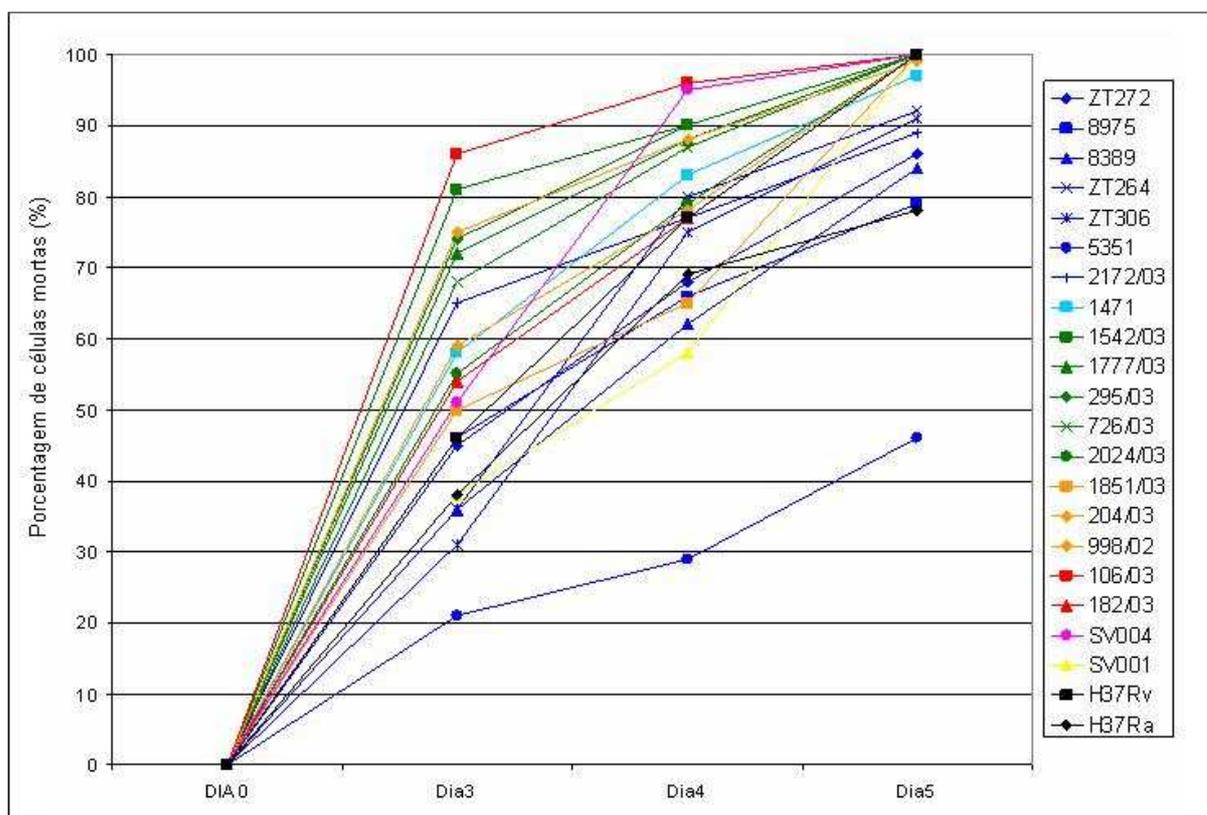
<b>FAMÍLIAS</b>	<b>CRESCIMENTO INTRACELULAR (Log10)</b>	<b>TAXA DE CRESCIMENTO (CFUdia6/CFUdia0)</b>
<b>Beijing Brasil</b>	1,3	20
<b>Beijing Rússia</b>	2,1	125
<b>LAM 3</b>	1,8	68
<b>LAM 1</b>	2,2	178
<b>LAM new37</b>	1,6	40
<b>Haarlem 3</b>	1,9	80
<b>T1</b>	2	90
<b>EAI</b>	2	100
<b>Genótipo não determinado</b>	1,7	50
<b>Cepas de referência</b>	1,4	25
	1,4	25
	1,1	13

Quando comparamos as cepas Beijing isoladas no Brasil e na Rússia podemos observar que a cepa da Rússia cresceu significativamente mais em comparação com qualquer cepa Beijing brasileira: duas vezes superior que as duas cepas de Beijing do Brasil que tiveram maior crescimento (2172/03 e 8389) e cerca de 6 vezes em comparação com outras cepas de Beijing do Brasil (dados não mostrados).

A capacidade de crescimento intracelular da cepa Beijing russa que circula como um clone predominante na cidade São Petersburgo, Rússia, é compatível com o crescimento das cepas LAM1 prevalentes no estado do Rio de Janeiro, sendo superior a todas outras cepas testadas.

#### 4.4. Avaliação da morte celular dos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb

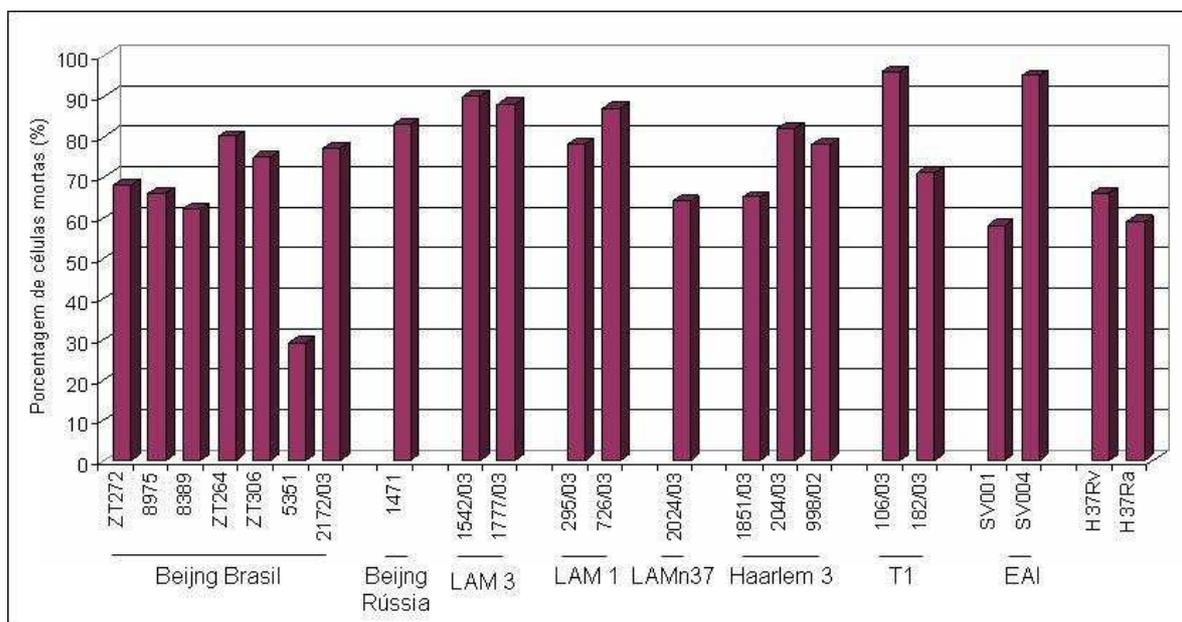
Estudos demonstraram que Mtb patogênicas podem induzir necrose nos macrófagos com altas doses de infecção (PARK et al, 2006), e que isto se correlaciona com a virulência da micobactéria. Neste trabalho, comparamos a capacidade dos diferentes isolados clínicos de induzir a morte necrótica dos macrófagos. As células THP-1 foram infectadas em alta dose da infecção, MOI = 50:1, e a viabilidade celular foi avaliada nos dias 3, 4 e 5 após infecção. Os resultados estão apresentados como a porcentagem das células mortas em cultura infectada. A análise da cinética de morte celular dos macrófagos infectados pelas diferentes cepas de Mtb, representada pela porcentagem de células mortas em cultura, pode ser vista na **Figura 16**.



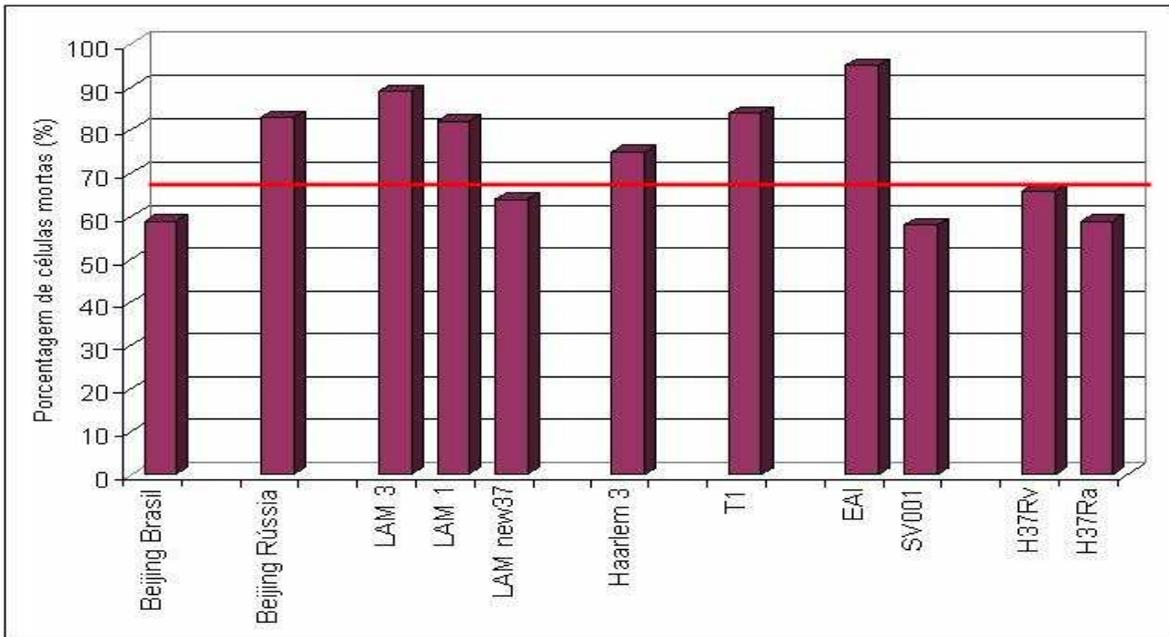
**Figura 16 – Cinética de morte celular nas culturas de macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb.** As culturas foram infectadas com as diferentes cepas de Mtb e mantidas em cultura por 6 dias. Nos dias 0, 3, 4 e 5 de infecção, os macrófagos foram corados com azul de trypan e as células mortas e vivas foram contadas, determinando a porcentagem de células mortas em cultura.

A diferença entre cepas individuais de diferentes genótipos na indução de necrose nos macrófagos e a média destes valores obtida para cada família genotípica no 4º dia de infecção estão apresentados nas **Figura 17** e **Figura 18**, respectivamente.

Os resultados mostram que as cepas da família Beijing isoladas no Brasil induziram menos necrose (menos de 60% de células mortas na cultura infectada) do que a cepa Beijing da Rússia (cerca de 80%) e cepas das famílias Mtb prevalentes no Brasil: LAM, Haarlem e T1 (70-90%) (**Figura 18**). Entretanto, foi observada certa variação entre cepas individuais de cada grupo: as cepas 2024/03 (família LAM), 1851/03 (família Haarlem) e 5351 (Beijing Brasil) apresentaram a capacidade de indução de necrose reduzida em comparação com outras cepas do mesmo grupo (**Figura 17**).

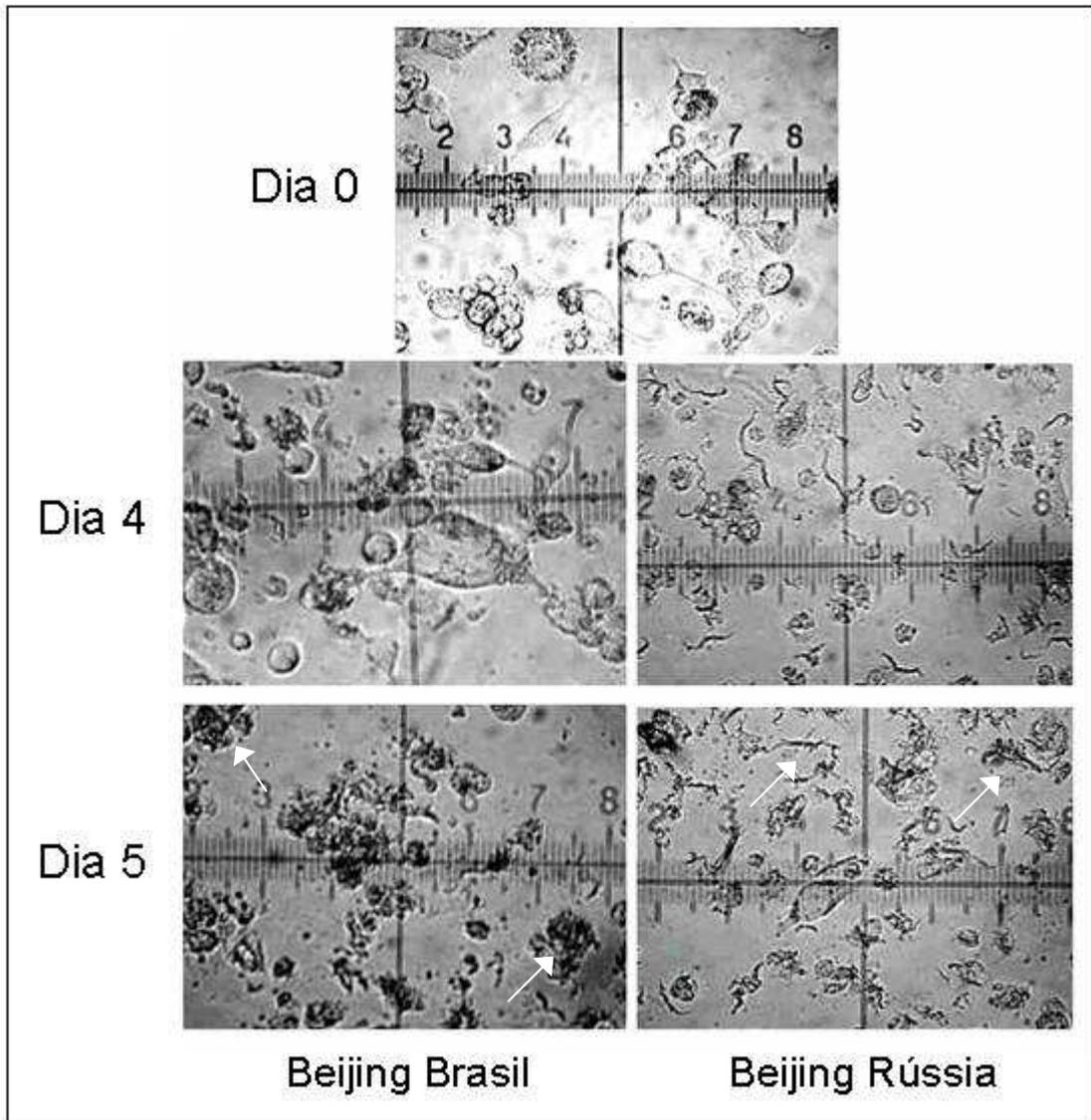


**Figura 17 – Porcentagem de células mortas na cultura de macrófagos infectados com diferentes cepas de Mtb.** Os resultados mostram o dia 4 de infecção. Os macrófagos foram corados com azul de trypan e as células mortas e vivas foram contadas, determinando o número de células mortas.



**Figura 18 – Porcentagem de células mortas na cultura de macrófagos infectados para cada família genética de Mtb.** Os resultados mostram a média dos valores de cada cepa para cada família no dia 4 de infecção. Os macrófagos foram corados com azul de trypan e as células mortas e vivas foram contadas, determinando o número de células mortas. A linha vermelha representa a porcentagem de células mortas em macrófagos infectados com H37Rv..

Na **Figura 19**, podemos observar o padrão de necrose induzido pelas cepas de Mtb da família Beijing isoladas no Brasil e na Rússia. Nas células infectadas com Beijing russa, cepa mais virulenta, a necrose das células infectadas acontece no início da infecção, de forma rápida, havendo a liberação das micobactérias para o meio extracelular, onde elas passam a proliferar e formar aglomerados celulares (microcolônias). Já nas células infectadas com cepas Beijing do Brasil, que tem se mostrado menos virulentas, a necrose acontece tardiamente e as micobactérias demoram a lisar a célula infectada, crescendo em seu interior. Vale ressaltar que o padrão de morte celular observado em culturas infectadas com a cepa Beijing da Rússia também foi visto em culturas infectadas pelas cepas das famílias prevalentes no Brasil, principalmente a família LAM 1.



**Figura 19 - Morfologia das células infectadas com cepas Beijing de *Mtb*.** As células foram infectadas com MOI=50:1 e mantidas em cultura celular por seis dias. No dia 4 e 5 a morfologia das células infectadas foi observada em microscópio invertido em 400X. As setas representam micobactérias dentro dos macrófagos infectados (painel da esquerda) e micobactérias e microcolônias no meio extracelular (painel da direita).

#### **4.5. Avaliação da produção de citocinas pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb**

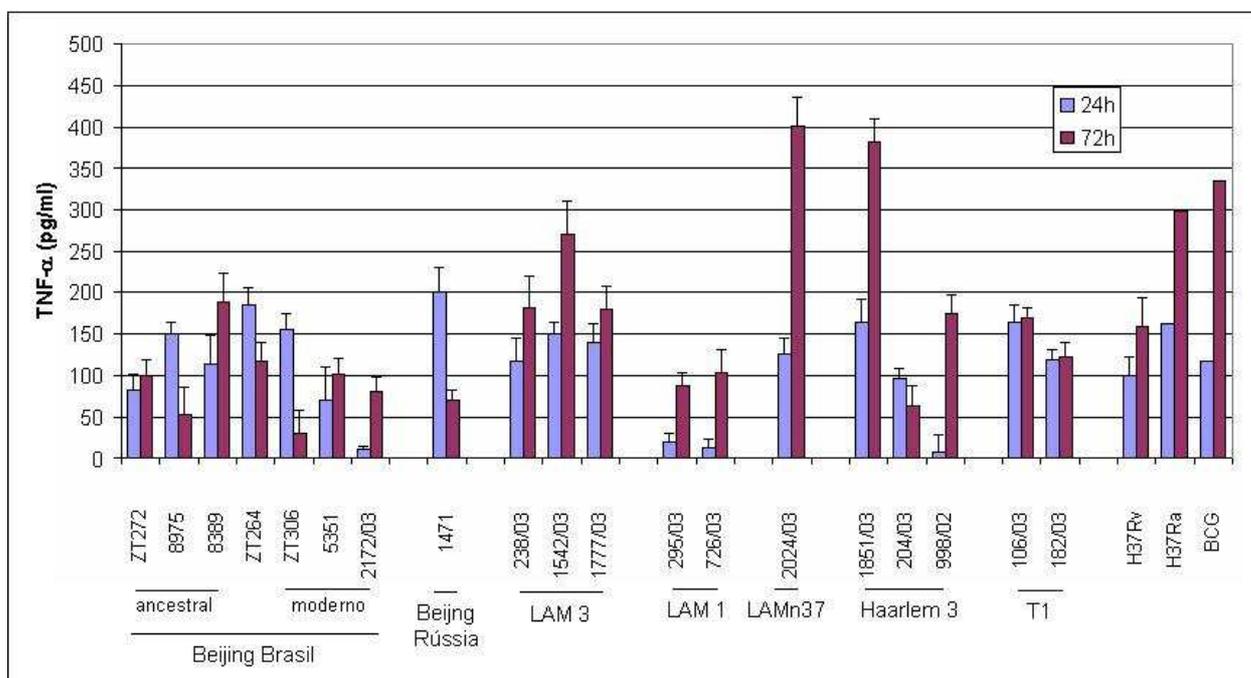
Para avaliar o caráter da resposta inicial dos macrófagos às micobactérias, que determina o desenvolvimento dos eventos pró - ou anti-inflamatórios no organismo, foi quantificada a produção de citocinas importantes para inflamação e indução da resposta imune protetora: TNF- $\alpha$  e IL-12; e citocinas anti-inflamatórias, que favorecem a resposta imune não-protetora: TGF- $\beta$ , IL-13 e IL-10. A avaliação da viabilidade dos macrófagos demonstrou que havia cerca de 90% das células vivas durante o período de avaliação das citocinas (dados não amostrados).

##### **4.5.1. Produção do Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).**

Os resultados da quantificação do TNF- $\alpha$  produzido pelos macrófagos estão apresentados na **Figura 20**. As células THP-1 infectadas pela cepa padrão H37Rv produziram baixo nível desta citocina: 100 pg/ml, 24 h após infecção, que aumenta após 72 h até 160 pg/ml. As células infectadas pelas cepas Beijing isoladas no Brasil produziram em média uma quantidade similar desta citocina, entretanto, as cepas com o genótipo moderno produziram um pouco menos TNF- $\alpha$  do que cepas com o genótipo ancestral. A cepa Beijing da Rússia com o genótipo considerado moderno apresentou o perfil de produção TNF- $\alpha$  diferente em comparação com a H37Rv: maior produção após 24h da infecção e significativamente menor após 72h.

A produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos infectados pelas cepas das famílias genéticas LAM, Haarlem e T1 não foi muito diferente em comparação com a induzida pela H37Rv 24h após infecção. Entretanto, 72h após infecção, algumas cepas (1542/03, 2024/03 – LAM, 1851/03 – Haarlem) induziram significativamente uma maior produção desta citocina. Diferentemente das outras cepas, as cepas da sub-família LAM1 (295/03 e 726/03) induziram significativamente uma menor quantidade de TNF- $\alpha$  em 24 e 72h após infecção.

A síntese de TNF- $\alpha$  não foi detectada nas culturas dos macrófagos THP-1 não infectados (dados não mostrados).



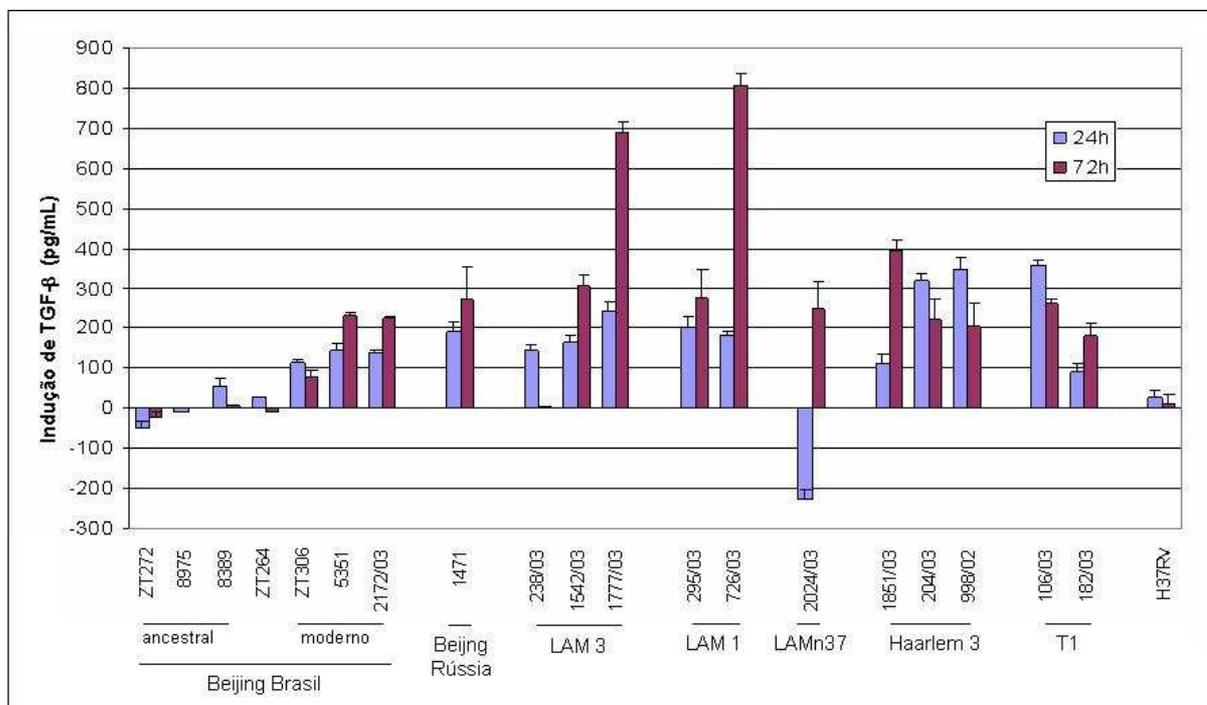
**Figura 20 – Produção de TNF $\alpha$  pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de *Mtb*.** Os macrófagos foram infectados com MOI 10:1 e mantidos em cultura por 6 dias. Nos dias 1 (24h) e dia 3 (72h) os sobrenadantes das culturas foram coletados e congelados em -20°C para posterior análise em ELISA

#### 4.5.2. Produção do Fator do Crescimento de Transformação (TGF- $\beta$ )

Foi observado que os macrófagos THP-1 produzem TGF- $\beta$  nas culturas não infectadas: cerca de 120 pg/ml – na cultura de 24h que aumenta em culturas de 72h até 400 pg/ml (dados não mostrados). Os dados obtidos nas culturas infectadas estão apresentados como a taxa de indução da citocina demonstrando a diferença entre o nível de citocina produzido pelo controle e a produção de citocina induzida nos macrófagos infectados (**Figura 21**).

A cepa padrão H37Rv quase não alterou a produção constitutiva do TGF- $\beta$  pelas células THP-1. As cepas da família Beijing isoladas no Brasil apresentam certa diferença na indução do TGF- $\beta$ , sendo que as cepas consideradas modernas induzem maior nível de produção desta citocina, principalmente 72h após infecção (cerca de 200 pg/ml), enquanto as ancestrais não tiveram efeito. A cepa Beijing da Rússia 1471 induz um pouco mais TGF- $\beta$  em comparação com as

cepas modernas do Brasil. A maioria das cepas das famílias LAM, Haarlem e T1 induzem TGF- $\beta$  no mesmo nível da cepa 1471. Entretanto, duas cepas, 1777/03 – LAM3 e 726/03 – LAM1, induziram 3 a 3,5 vezes mais citocina em comparação com as outras cepas prevalentes no Brasil.

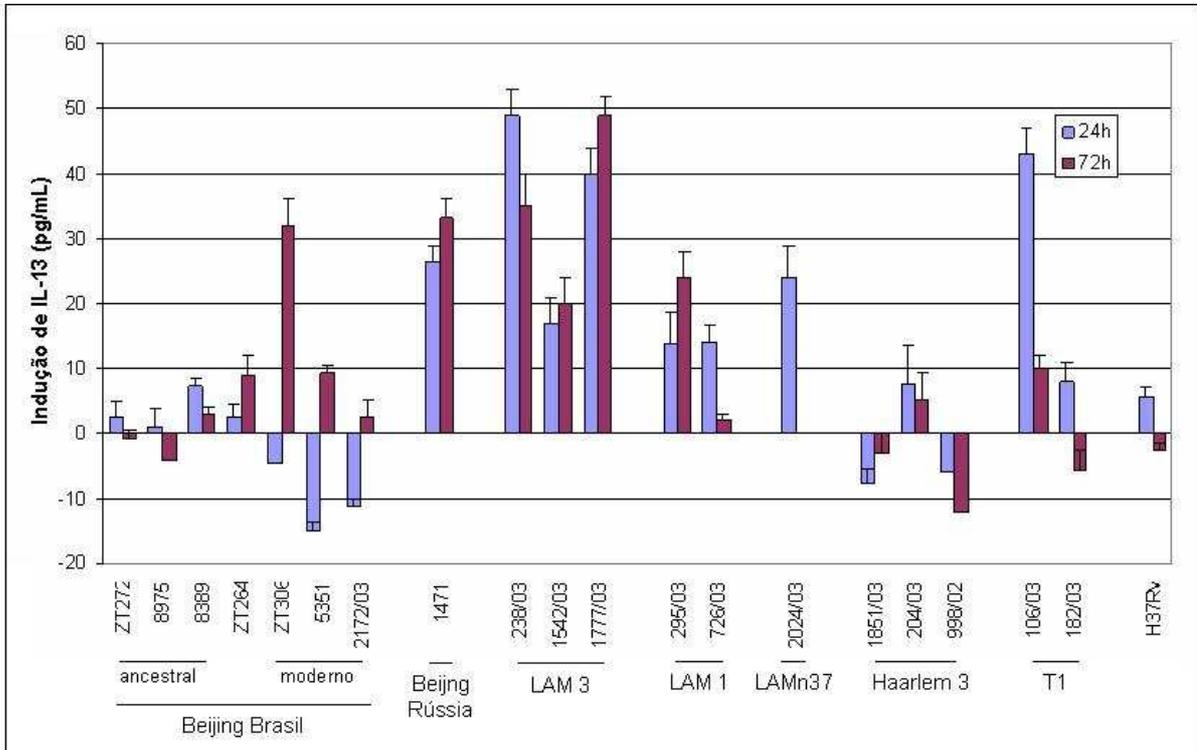


**Figura 21 – Indução de TGF- $\beta$  pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb.** Os macrófagos foram infectados com MOI 10:1 e mantidos em cultura por 6 dias. Nos dias 1 (24h) e dia 3 (72h), os sobrenadantes das culturas foram coletados e congelados em  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise em ELISA.

#### 4.5.3. Produção da Interleucina 13 (IL-13)

Um baixo nível de produção da IL-13 foi observado nas culturas THP-1 não infectadas:  $26,0 \pm 8,0$  pg/ml após 24h em cultura e  $47,5 \pm 11,5$  pg/ml após 72h (dados não mostrados). A cepa H37Rv e cepas Beijing do Brasil não alteraram significativamente o nível da IL-13 produzida, com exceção da cepa ZT306, de genótipo considerado moderno, que aumentou a produção desta citocina pelas células após 72h da infecção (**Figura 22**). A cepa Beijing isolada na Rússia induziu a síntese da IL-13 já após 24h e manteve alto nível da secreção pelo menos durante 72h da observação. As cepas das famílias genéticas prevalentes no Brasil apresentaram uma grande variação na indução da síntese desta citocina. Em comparação com a cepa H37Rv, todas as cepas LAM e cepa 106/03 – T1 induziram significativamente mais IL-13. As cepas Haarlem apresentaram padrão

semelhante a H37Rv. Entre as cepas LAM, duas cepas LAM3 induziram mais IL-13 do que todas outras cepas testadas, e as cepas LAM1 induziram relativamente menos esta citocina.



**Figura 22 – Indução de IL-13 pelos macrófagos infectados com as diferentes cepas de Mtb.** Os macrófagos foram infectados com MOI 10:1 e mantidos em cultura por 6 dias. Nos dias 1 (24h) e dia 3 (72h), os sobrenadantes das culturas foram coletados e congelados em -20°C para posterior análise em ELISA.

#### **4.5.4. Produção das citocinas IL-12 e IL-10**

Os resultados para as citocinas IL-10 e IL-12 não puderam ser determinados, pois aparentemente os sobrenadantes dos macrófagos infectados e dos macrófagos controle (não infectados) não apresentaram uma produção detectável destas citocinas. A produção da IL-12 foi observada no nosso modelo somente após o tratamento das células THP-1 por LPS, que pode ser usado como controle positivo, e permite concluir que as células THP-1 não produzem IL-12 na resposta para *M. tuberculosis*. Em relação à IL-10, não foi possível encontrar nenhuma amostra que pudesse ser o controle positivo. Entretanto, a citocina recombinante do kit para ELISA utilizado (Biosource) foi detectável, mas a falta do controle positivo não permite diferenciar se o resultado negativo observado demonstra a ausência na produção da IL-10 pelas células THP-1 infectadas por Mtb, ou se, por alguma razão, a citocina produzida não foi detectada por este kit.

## 5. DISCUSSÃO

---

A proposta deste trabalho foi caracterizar as diferentes cepas de Mtb de famílias genéticas prevalentes no Brasil com relação a sua virulência e resposta dos macrófagos à micobactéria, utilizando um modelo de infecção dos macrófagos humanos da linhagem THP-1. Este modelo de infecção *in vitro*, utilizando macrófagos THP-1 ativados com IFN- $\gamma$  foi proposto e caracterizado por Theus et al (2004) como alternativa para uso de modelos animais, quando o objetivo é a comparação de um grande número de cepas. Os autores demonstraram que o crescimento intracelular mais rápido é típico para cepas com a maior capacidade de transmissão (THEUS et al, 2005).

A infecção *in vitro* permite analisar também a resposta pró- ou anti-inflamatória dos macrófagos à micobactéria (MANCA et al, 2004). Tendo em vista a análise da produção das citocinas pró- e anti-inflamatórias, no nosso modelo experimental nós não ativamos macrófagos com IFN- $\gamma$ , como foi proposto por THEUS et al (2004). IFN- $\gamma$  é uma citocina capaz de aumentar significativamente o potencial microbicida do macrófago, levando a eliminação da micobactéria. Adicionalmente, IFN- $\gamma$  demonstrou promover a indução da ativação clássica dos macrófagos, pró-inflamatória, reduzindo a capacidade potencial da micobactéria de ativar macrófagos de maneira alternativa que pode levar a síntese das citocinas anti-inflamatórias. Por isso, em nossos experimentos as células THP-1 não foram pré-ativadas.

As cepas de Mtb foram isoladas de pacientes com tuberculose em hospitais no estado do Rio de Janeiro e São Paulo, e para este trabalho, nós selecionamos uma amostra representativa das cepas de cada grupo de genótipos distintos pertencentes as famílias genéticas prevalentes no Brasil. De acordo com dados recentes obtidos num grande estudo de identificação dos genótipos de Mtb prevalentes no Rio de Janeiro, o maior número de casos de tuberculose no nosso meio é provocado por cepas de Mtb da família genética LAM, Latino-American-Mediterranean – 40%. As famílias Haarlem e T1 são responsáveis por 21% e 29% dos casos, respectivamente (LAZARINI et al., 2007). As amostras representativas das cepas destas famílias foram selecionadas para nosso estudo na tentativa de avaliar 7-8 cepas de cada grupo genético, mas para alguns grupos não conseguimos alcançar esta meta dentro dos prazos de realização deste projeto.

Recentemente no Brasil, foram isoladas cepas da família Beijing, que não são típicas para esta região geográfica, representando cerca de 0,6% das cepas de Mtb genotipadas (LAZARINI et al., 2007). As cepas Beijing em outros países foram associadas com maior taxa de virulência, transmissibilidade e resistência a drogas incluindo MDR, multi-droga resistência. Devido a sua importância epidemiológica no cenário mundial, nós incluímos no nosso estudo todas as cepas Beijing isoladas no sudeste do Brasil disponíveis (7 cepas). Adicionalmente, foram caracterizadas cepas padrão H37Rv, H37Ra, e uma cepa da família Beijing isolada na Rússia que foi trazida para o Brasil pela Dra Elena Lassounskaia para fins de comparação com cepas Beijing brasileiras como parte do seu projeto de Pós-Doutoramento (Instituto Pasteur, São-Petersburgo, Rússia).

Primeiramente, nós comparamos a capacidade de adaptação (*fitness*) de crescimento de cada cepa bacteriana em meio de cultura próprio para seu crescimento, meio de cultura Middlebrook 7H9, num período de seis dias de crescimento. Nossos resultados demonstraram que a maioria das cepas de genótipos prevalentes no Brasil (LAM, Haarlem e T1) apresenta um padrão de crescimento igual ou superior a H37Rv. Diferentemente destas cepas, e da cepa Beijing isolada na Rússia, todas as cepas da família Beijing isoladas no Brasil tiveram um crescimento significativamente menor. É importante ressaltar que foi observada certa variação entre cepas pertencentes para o mesmo grupo genético: pelo menos uma cepa LAM1 e uma cepa Haarlem 3 cresceram significativamente menos que outras do mesmo grupo.

Estes dados mostram que não podemos associar um determinado grupo genético com um determinado padrão de crescimento em meio líquido. Entretanto, uma menor taxa de crescimento no meio líquido, pode refletir uma menor capacidade de adaptação, foi apresentada por cepas que podem ser consideradas não prevalentes: cepas da família Beijing isoladas no Brasil e algumas cepas LAM 1 e Haarlem 3, aquelas que segundo dados epidemiológicos disponíveis, representaram casos únicos (não cluster) de tuberculose. Desta forma, podemos sugerir que um menor crescimento em meio líquido pode estar associado com cepas menos transmissíveis, isoladas de casos únicos de tuberculose. Mas, essa hipótese necessita de confirmação através da análise de um maior número de cepas prevalentes versus cepas de isolados únicos.

Nós avaliamos o crescimento intracelular das diferentes cepas de Mtb como um dos parâmetros para a determinação de virulência de uma cepa. Os macrófagos foram infectados em baixa dose de infecção, uma bactéria por macrófago, que, diferentemente das altas doses de infecção, permite avaliar melhor a capacidade da bactéria de reproduzir-se no ambiente hostil de uma célula fagocítica sem alteração de viabilidade do macrófago (ZHANG et al, 1998). Os resultados obtidos demonstraram que todos os isolados clínicos de Mtb prevalentes no Brasil (LAM, Haarlem e T1) apresentam um crescimento em macrófagos significativamente maior do que a cepa padrão H37Rv. O crescimento de algumas destas cepas foi semelhante a da cepa Beijing da Rússia, que apresentou um dos maiores índices, crescendo 6 vezes mais que H37Rv. Estes dados sugerem que o alto crescimento da cepa Beijing da Rússia observado em nosso modelo corresponde à sua alta capacidade de transmissão na população humana já descrita na literatura (NARVSKAYA et al, 2002). Inesperadamente, o crescimento da maioria das cepas da família Beijing isoladas no Brasil foi menor, principalmente para cepas que foram consideradas ancestrais, de acordo com os dados de PCR IS6110 inverso.

O crescimento de Mtb em macrófagos foi relacionado à indução de necrose em macrófagos infectados. A maioria dos isolados clínicos de Mtb prevalentes no Brasil e a cepa Beijing da Rússia apresentaram maior capacidade de induzir morte nos macrófagos por necrose do que a cepa padrão H37Rv. Diferentemente destes, a maioria das cepas da família Beijing isoladas no Brasil induziram a necrose de forma similar a cepa H37Rv. Mais uma vez, estes dados demonstram uma grande diferença entre as cepas Beijing isoladas no Brasil e na Rússia, sugerindo que diferentemente da cepa russa, as cepas Beijing isoladas no Brasil possuem menor virulência. Estes dados são importantes, pois demonstram a heterogenicidade das cepas Beijing, que antigamente foram consideradas mais virulentas do que outras famílias genéticas. As diferenças na virulência das diferentes cepas Beijing isoladas nos Estados Unidos, demonstradas recentemente, contribuem para esta hipótese (THEUS et al, 2007). A virulência da linhagem Beijing provavelmente não é constitutiva, mas associada com algumas sub-linhagens que evoluíram aumentando sua virulência através da sua circulação na população humana suscetível em regiões de prevalência de cepas Beijing.

O perfil de morte celular por necrose observada nas culturas infectadas pelas diferentes cepas de Mtb também foi diferente. A maioria das cepas induziu a

necrose dos macrófagos a partir do 3<sup>o</sup> dia de infecção e a quantidade de células mortas na cultura aumentou com o tempo. As células mortas apresentaram marcas de necrose (permeabilização de membrana), mas continuaram integras, contendo as micobactérias em seu interior. Entretanto, algumas cepas induziram a necrose das células mais rapidamente, levando à perda da integridade celular seguida da liberação das bactérias, que continuaram seu crescimento no meio extracelular, formando aglomerados celulares (microcolônias). Este padrão de necrose foi observado nas culturas infectadas por cepas que apresentaram maior capacidade de crescimento intracelular, como a cepa Beijing da Rússia e cepas LAM1.

As propriedades descritas – maior crescimento intracelular e no meio de cultura líquido e a destruição dos macrófagos, levando a liberação das micobactérias e sua proliferação – sugerem alta virulência das micobactérias que possuem estas características. Os dados epidemiológicos disponíveis confirmam que a cepa Beijing 1471 que pertence a um cluster chamado B0, determinado por RFLP-IS6110 e 12 MIRU-VNTR perfil –M9 circula na Rússia como um clone predominante provocando numerosos casos de tuberculose nos pacientes epidemiologicamente não-relacionados e em diferentes regiões da Rússia (NARVSKAYA et al, 2002; MOKROUSOV et al, 2004; DROBNIEWSKI et al, 2005), comprovando o alto poder de transmissão desta cepa.

As cepas LAM1 também são altamente prevalentes no estado do Rio de Janeiro (LAZARINE et al, 2007). As cepas desta linhagem possuem marcas distintas que permitiram caracterizá-las como cepas RD<sup>rio</sup>, estando relacionadas a cerca de 30% dos casos de tuberculose no estado do Rio de Janeiro provocados por cepas da família LAM, sugerindo alta transmissibilidade destas cepas (LAZARINE et al, 2007).

Outro fator que pode contribuir para maior virulência da micobactéria é a sua capacidade de subverter a resposta imune, inata e/ou adaptativa, direcionada contra bactéria. Foi demonstrado que nem todas as cepas com maior capacidade de crescimento são capazes de induzir a doença apesar de sua alta transmissibilidade. Nos Estados Unidos, foi isolada a cepa 1551 que provocou um surto em escolas, infectando grande número de alunos (comprovado através da positividade da reação PPD), embora poucos tenham desenvolvido a tuberculose (VALWAY et al, 1998). Em experimentos *in vitro* e *in vivo* foi demonstrado que esta cepa induz alto nível de imunidade protetora no organismo infectado, que corresponde a alta produção de

citocinas pró-inflamatórias por macrófagos infectados, IL-12 e TNF- $\alpha$ , contribuindo para controle da infecção (MANCA et al, 1999). Por outro lado, as bactérias com maior grau de virulência (incluindo cepas da família Beijing que foram mais bem caracterizadas) são capazes de induzir nos macrófagos citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-13, IL-10 (MANCA et al, 2004), levando a redução na produção das citocinas pró-inflamatórias, prejudicando o desenvolvimento da resposta imune adaptativa protetora.

Para verificar a resposta dos macrófagos THP-1 a cepas de genótipos diferentes, nós quantificamos a síntese das citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-12, e anti-inflamatórias, IL-13, TGF- $\beta$  e IL-10, pelos macrófagos infectados. Foi possível observar três padrões de resposta de produção de citocinas pelos macrófagos infectados. Em primeiro lugar, macrófagos infectados pela cepa Beijing da Rússia tiveram uma alta produção de TNF- $\alpha$  em 24h, que diminuiu após 72h, sendo acompanhada por uma alta produção de IL-13 e TGF- $\beta$ , sugerindo que a diminuição do TNF- $\alpha$  em 72h foi devido ao perfil anti-inflamatório desenvolvido.

Em segundo lugar, os macrófagos infectados pelas cepas das famílias prevalentes no Brasil tiveram em geral uma produção de citocinas semelhante e/ou maior do que macrófagos infectados com a cepa padrão H37Rv. Apesar de terem produzido TNF- $\alpha$  (pró-inflamatória), também tiveram alta produção de citocinas anti-inflamatórias, com exceção dos macrófagos infectados com cepas da família Haarlem que apresentaram uma produção de IL-13 menor. Em terceiro lugar, os macrófagos infectados com cepas da família Beijing do Brasil apresentaram um perfil de produção de citocinas diferenciado para cepas ancestrais e modernas. A indução de citocinas pelas cepas ancestrais foi semelhante a H37Rv, com produção de TNF- $\alpha$  e baixa produção de citocinas anti-inflamatórias, comparando-se ao perfil observado para H37Rv. Já as cepas modernas induziram menos TNF- $\alpha$  e mais IL-13 e TGF- $\beta$  quando comparadas a H37Rv. De modo geral, os dados demonstraram que cepas de isolados clínicos mais competitivos induzem mais citocinas anti-inflamatórias em comparação com a cepa H37Rv.

Os dados obtidos neste estudo sugerem que cepas de genótipos prevalentes numa determinada região, que por algumas razões foram mais competitivas e/ou adaptaram-se para a população local e como consequência circulam na região transmitindo-se para vários novos hospedeiros, sofrendo evolução do seu genótipo através da seleção dos sub- clones mais virulentos. O aparecimento de novas sub-

linhagens na família Beijing foi demonstrada recentemente na África do Sul (HANEKOM et al, 2007), mas os autores deste trabalho não caracterizaram a virulência destas linhagens. Ao contrário de outras regiões do mundo, como Ásia e China, as cepas Beijing são raramente encontradas no Brasil assim como em outros países desta região (BRUDEY et al, 2006).

Nós não sabemos de qual região do mundo estas cepas Beijing foram trazidas e quanto tempo elas estão no Brasil. Uma cepa, de acordo com os dados disponíveis, provavelmente foi trazida da Bolívia (comunicação pessoal de Dra Maria Alice). Dados de PCR inverso demonstraram que aproximadamente 30% das cepas Beijing do Brasil apresentam marcas genéticas das linhagens ancestrais em sua filogenia, e na Rússia e China estas cepas ancestrais são minoritárias, representando menos de 3% dos casos (MOKROUSOV et al, 2006 (a), MOKROUSOV et al, 2006 (b)). Estes dados demonstram que as cepas encontradas no Brasil apresentam um perfil diferente em comparação com os países asiáticos, sugerindo que pelo menos a maioria destas possivelmente tem origem em outros países Latino-Americanos, que apresentam maior incidência de casos de TB provocados por cepas Beijing do que no Brasil, mas também não sendo consideradas cepas prevalentes.

Apesar desta diferença observada entre as cepas Beijing do Brasil e da Rússia, outro aspecto que chama atenção é certa semelhança genética entre as cepas Beijing encontradas no Brasil e Rússia, através de uma análise feita por MIRU-VNTR. Aproximadamente 30% das cepas Beijing isoladas no Brasil apresentaram um perfil 12MIRU-VNTR-M9, que foi também encontrado na Rússia, China, Estados Unidos, América do Sul e Moçambique, inclusive na cepa 1471 usada neste trabalho (comunicação pessoal do Dr. Philip Suffys). Entretanto, as características associadas à virulência destas cepas foram bem diferentes, sugerindo que estas cepas têm origem em diferentes sub-linhagens da família Beijing, demonstrando um poder limitado de diferenciação de cepas individuais através da metodologia de MIRU-VNTR, pelo menos quando são analisados apenas 12 loci.

Diferentemente dos Estados Unidos, os países da América Latina não possuem intenso fluxo de imigrantes oriundos de países asiáticos e da Rússia e possuem menor probabilidade de importação destas cepas Beijing mais virulentas. Todas estas considerações permitem sugerir que a virulência das cepas Beijing

encontradas nas regiões de baixa prevalência destas cepas pode ser em geral menor do que em regiões de alta prevalência. Em compensação, as cepas de outros genótipos prevalentes nestas regiões (como LAM, Haarlem e T1 no Brasil) podem sofrer uma evolução, levando a um aumento da sua virulência. Esta hipótese ainda deve ser verificada num estudo maior.

Podemos concluir, com base nos dados apresentados, que as cepas das famílias prevalentes no Brasil, LAM (com seus subtipos), Haarlem 3 e T1, analisadas neste trabalho, apresentaram um perfil de virulência maior do que as cepas Beijing isoladas no nosso meio, demonstrando menor importância epidemiológica destas últimas.

## 6. CONCLUSÕES

---

- ❖ A maioria dos isolados clínicos de Mtb prevalentes no Brasil apresentou um crescimento no meio líquido igual ou um pouco maior que a cepa padrão H37Rv. O crescimento das cepas da família Beijing isoladas no Brasil foi significativamente menor.
- ❖ Todos os isolados clínicos de Mtb prevalentes no Brasil apresentaram um crescimento intracelular nos macrófagos significativamente maior que a cepa padrão H37Rv. O crescimento da maioria das cepas da família Beijing isoladas no Brasil foi menor.
- ❖ A maioria dos isolados clínicos de Mtb prevalentes no Brasil apresentou maior capacidade de induzir a morte dos macrófagos por necrose que a cepa H37Rv. A maioria das cepas da família Beijing isoladas no Brasil induziu a necrose de forma similar a cepa H37Rv.
- ❖ Existe diferença entre grupos genéticos de Mtb em relação a produção das citocinas pró- e anti-inflamatórias pelos macrófagos infectados.
- ❖ As cepas da família LAM em comparação com a cepa padrão H37Rv induziram maior produção das todas citocinas testadas. Entretanto, houve uma certa diferença para as cepas da subfamília LAM 1 testadas, que induziram menos TNF- $\alpha$  e IL-13 em comparação com outras cepas da família LAM.
- ❖ O perfil de produção para as cepas da família Haarlem foi, em geral, semelhante ao da família LAM, com exceção para uma produção menor de IL-13.
- ❖ O perfil de produção para cepas da família T1 foi semelhante para a cepa H37Rv, com exceção para uma produção maior de TGF- $\beta$ .
- ❖ O perfil de produção de citocinas para cepas da família Beijing isoladas no Brasil foi diferente para cepas ancestrais e modernas. A indução de citocinas pelas

cepas ancestrais foi semelhante para as cepas padrão H37Rv. As cepas modernas induziram menos TNF- $\alpha$  e mais IL-13 e TGF- $\beta$  quando comparadas a H37Rv.

❖ Foi demonstrada grande diferença entre cepas da família Beijing isoladas no Brasil e a cepa isolada na Rússia em relação às características associadas a virulência testadas. Diferentemente da cepa russa, que apresenta alto nível de virulência, as cepas isoladas no Brasil foram menos virulentas de acordo com as características testadas. Isto demonstra que a alta virulência não é uma característica geral da família Beijing.

❖ A virulência das cepas de famílias genéticas prevalentes no Brasil foi tão alta como a virulência da cepa Beijing da Rússia, de acordo com as características avaliadas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- BALCEWICZ-SABLINSKA M.K.; KEANE J.; KORNFELD H.; REMOLD H.G. Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF $\alpha$ . **The Journal of Immunology**, v.161, p.2636-2641, 1998.
- BIFANI P. J.; MATHEMA B.; KUREPINA N. E.; KREISWIRTH B. N. Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains. **TRENDS in Microbiology**, v.10, n.1, p. 45-52, 2002.
- BOLETIM INFORMATIVO. **Tuberculose**. Programa de controle da tuberculose do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro (PCT/SES/RJ), 2005.
- BRUDEY K.; DRISCOLL J. R.; RIGOUTS L.; PRODINGER W. M.; GORI A.; AL-HAJOJ S. A.; ALLIX C.; ARISTIMUÑO L.; ARORA J.; BAUMANIS V.; BINDER L.; CAFRUNE P.; CATALDI A.; CHEONG S.; DIEL R.; ELLERMEIER C.; EVANS J. T.; FAUVILLE-DUFAUX M.; FERDINAND S.; de VIEDMA D. G.; GARZELLI C.; GAZZOLA L.; GOMES H. M.; GUTTIEREZ M. C.; HAWKEY P. M.; van HELDEN P. D.; KADIVAL G. V.; KREISWIRTH B. N.; KREMER K.; KUBIN M.; KULKARNI S. P.; LIENS B.; LILLEBAEK T.; LY H. M.; MARTIN C.; MARTIN C.; MOKROUSOV I.; NARVSKAĀ O.; NGEOW Y. F.; NAUMANN L.; NIEMANN S.; PARWATI I.; ZEAUR R.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY V.; RASOLONAVALONA T.; ROSSETTI M. L.; RÜSCH-GERDES S.; SAJDUDA A.; SAMPER S.; SHEMYAKIN I. G.; SINGH U. B.; SOMOSKOVI A.; SKUCE R. A.; van SOOLINGEN D.; STREICHER E. M.; SUFFYS P. N.; TORTOLI E.; TRACEVSKA T.; VINCENT V.; VICTOR T. C.; WARREN R. M.; YAP S. F.; ZAMAN K.; PORTAELS F.; RASTOGI N.; SOLA C. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, v.6, p.23, 2006.

BURGOS M. V.; MÉNDEZ J. C.; RIBON W. Molecular epidemiology of tuberculosis: methodology and applications. **Biomédica**, v.24., p. 188-201, 2004.

CDC. **Questions and Answers About TB**. Department of Health and Human Services, CDC, United States, 2005.

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

CHEN M.; GAN H.; REMOLD H. G. A Mechanism of Virulence: Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strain H37Rv, but Not Attenuated H37Ra, Causes Significant Mitochondrial Inner Membrane Disruption in Macrophages Leading to Necrosis. **The Journal of Immunology**, v.176, p.3707–3716, 2006.

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

COSMA C.L.; SHERMAN D.R.; RAMAKRISHNAN L. The Secret Lives of the Pathogenic *Mycobacteria*. **Annual Review Microbiology**, v.57, p.641-676, 2003.

DAVIES A.P.; BILLINGTON O. J.; BANNISTER B. A.; WEIR W. R.; MCHUGH T. D.; GILLESPIE S. H. Comparison of fitness of two isolates of *Mycobacterium tuberculosis*, one of which had developed multi-drug resistance during the course of treatment. **Journal of Infection**, v.41, n.2, p.184-187, 2000.

DOHERTY T. M.; ANDERSEN P. Vaccines for Tuberculosis: Novel Concepts and Recent Progress. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p. 687-702, 2005.

DROBNIIEWSKI F.; BALABANOVA Y.; NIKOLAYEVSKY V.; RUDDY M.; KUZNETZOV S.; ZAKHAROVA S.; MELENTYEV A.; FEDORIN I. Drug-Resistant

Tuberculosis, Clinical Virulence, and the Dominance of the Beijing Strain Family in Russia. **JAMA**, v.293, n.22, p.2726-2732, 2005.

FERDINAND S.; VALÉTUDIE G.; SOLA C.; RASTOGI N. Data mining of *Mycobacterium tuberculosis* complex genotyping results using mycobacterial interspersed repetitive units validates the clonal structure of spoligotyping-defined families. **Research in Microbiology**, v.155, p.647–654, 2004.

FILLIOL I.; DRISCOLL J. R.; van SOOLINGEN D.; KREISWIRTH B. N.; KREMER K.; VALÉTUDIE G.; ANH D. DUC.; BARLOW R.; BANERJEE D.; BIFANI P. J.; BRUDEY K.; CATALDI A.; COOKSEY R. C.; COUSINS D. V.; DALE J. W.; DELLAGOSTIN O.; DROBNIOWSKI F.; ENGELMANN G.; FERDINAND S.; GASCOYNE-BINZI D.; GORDON M.; GUTIERREZ M. C.; HAAS W. H.; HEERSMA H.; KÄLLENIUS G.; KASSA-KELEMBHO E.; KOIVULA T.; LY H. M.; MAKRISTATHIS A.; MAMMINA C.; MARTIN G.; MOSTRÖM P.; MOKROUSOV I.; NARBONNE V.; NARVSKAYA O.; NASTASI A.; NIOBE-EYANGO S. N.; PAPE J. W.; RASOLOFO-RAZANAMPARANY V.; RIDELL M.; ROSSETTI M. L.; STAUFFER F.; SUFFYS P. N.; TAKIFF H.; TEXIER-MAUGEIN J.; VINCENT V.; de WAARD J. H.; SOLA C.; RASTOGI N. Global Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Spoligotypes. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.11, p.1347-1349, 2002.

FLYNN J.L.; CHAN J. Immunology of Tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v.9, p.93-129, 2001.

FLYNN J.L.; ERNST J.D. Immune responses in tuberculosis. **Current Opinion in Immunology**, v.12, p.432-436, 2000.

FRATAZZI C.; ARBEIT R.D.; CARINI C.; REMOLD H.G. Programmed cell death of *Mycobacterium avium* Serovar-4-infected human macrophages prevents the mycobacteria from spreading and induces mycobacterial growth inhibition by freshly added, uninfected macrophages. **The Journal of Immunology**, v.158, p.4320-4327, 1997.

- GAO L.Y.; KWAIK Y.A. The modulation of host cell apoptosis by intracellular bacterial pathogens. **Trends In Microbiology**, v.8, n.7, p. 306-313, 2000.
- GLICKMAN M.S.; JACOBS W.R.JR. Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. **Cell**, v.104, p.477-485, 2001.
- GOYAL M.; SAUNDERS N. A.; van EMBDEN J. D. A.; YOUNG D. B.; SHAW R. J.. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.3, p.647–651, 1997.
- HANEKOM M.; van DER SPUY G. D.; van PITTIUS N. C. G.; MCEVOY C. R. E.; NDABAMBI S. L.; VICTOR T. C.; HOAL E. G.; van HELDEN P. D.; WARREN R. M. Evidence that the Spread of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with the Beijing Genotype Is Human Population Dependent. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.7, p.2263–2266, 2007.
- ISMAIL N.; OLANO J.P.; FENG H.M.; WALKER D.H. Current status of immune mechanisms of killing of intracellular microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.207, p.111-120, 2002.
- KANDUMA E.; MCHUGH T.D.; GILLESPIE S.H. Molecular methods for *Mycobacterium tuberculosis* strain typing: a users guide. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.781–791, 2003.
- KAUFMANN S. H. E. How can Immunology contribute to the control of Tuberculosis? **Nature Reviews Immunology**, v.1, p.20-30, 2001.
- KEANE J.; BALCEWICZ-SABLINSKA M.K.; REMOLD H.G.; CHUPP G.L.; MEEK B.B.; FENTON M.J.; KORNFIELD H. Infection by *Mycobacterium tuberculosis* promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infection and Immunity**, v.65, n.1, p.298-304, 1997.

KREMER K.; GLYNN J. R.; LILLEBAEK T.; NIEMANN S.; KUREPINA N. E.; KREISWIRTH B. N.; BIFANI P. J.; van SOOLINGEN D. Definition of the Beijing/W Lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the Basis of Genetic Markers. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p.4040–4049, 2004.

LANÇA M.A. Tuberculose Pulmonar. **ABC DA SAÚDE**. Publicado em 01/11/2001 e revisado em 30/11/2006. Acessado em: 09/10/2007. Disponível em: <<http://www.abcdasaude.com.br/artigo.php?432>>.

LAZZARINI L. C. O.; HUARD R. C.; BOECHANEO L. T.; GOMES H. M.; OELEMANN M. C.; KUREPINA N.; SHASHKINA E.; MELL F. C. Q.; GIBSON A. L.; VIRGINIO M. J.; MARSICO A. G.; W. BUTLER R.; KREISWIRTH B. N.; SUFFYS P. N.; e SILVA J. R. L.; HO J. L. Discovery of a Novel *Mycobacterium tuberculosis* Lineage that is a Major Cause of Tuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.12, p.3891-3902, 2007.

LI Q.; WHALEN C. C.; ALBERT J. M.; LARKIN R.; ZUKOWSKI L.; CAVE M. D.; SILVER R. F. Differences in Rate and Variability of Intracellular Growth of a Panel of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates within a Human Monocyte Model. **Infection and Immunity**, v.70, n.11, p.6489–6493, 2002.

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

MANCA C.; TSENOVA L.; BARRY C.E. 3<sup>rd</sup>; BERGTOLD A.; FREEMAN S.; HASLETT P. A.; MUSSER J. M.; FREEDMAN V. H.; KAPLAN G. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. **The Journal of Immunology**, v.162, n.11, p.6740-6746, 1999.

- MANCA C.; REED M. B.; FREEMAN S.; MATHEMA B.; KREISWIRTH B.; BARRY C.; KAPLAN G. Differential Monocyte Activation Underlies Strain-Specific *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.72, n.9, p.5511–5514, 2004.
- MATHEMA B.; KUREPINA N. E.; BIFANI P. J.; KREISWIRTH B. N. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n.4, p.658–685, 2006.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias – Guia de bolso**. Brasília, DF, 6<sup>a</sup>ed., 2006.
- MOKROUSOV I.; NARVSKAYA O.; LIMESHENKO E.; VYAZOVAYA A.; OTTEN T.; VYSHNEVSKIY B. Analysis of the allelic diversity of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Units in *M. tuberculosis* strains of the Beijing family: practical applications and evolutionary considerations. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2438-2444, 2004.
- MOKROUSOV I.; JIAO W. W.; SUN G. Z.; LIU J. W.; VALCHEVA V.; LI M.; NARVSKAYA O.; SHEN A. D. Evolution of drug resistance in different sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.8, p.2820-2823, 2006 (a).
- MOKROUSOV I.; JIAO W. W.; VALCHEVA V.; VYAZOVAYA A.; OTTEN T.; LY H. M.; LAN N. N.; LIMESHENKO E.; MARKOVA N.; VYSHNEVSKIY B.; SHEN A. D.; NARVSKAYA O. Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and its ancient and modern sublineages by IS6110-based inverse PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2851-2856, 2006 (b).
- MOSTRÖM P.; GORDON M.; SOLA C.; RIDELL M.; RASTOGI N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, n.11, p.694-704, 2002

MURRAY P.R. et al. Mycobacterium. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia Médica**. 3° ed. Guanabara Koogan, 2000. Cap. 40, p.266-269.

NARVSKAYA O.; OTTEN T.; LIMESCHENKO E.; SAPOZHNIKOVA N.; GRASCHENKOVA O.; STEKLOVA L.; NIKONOVA A.; FILIPENKO M. L.; MOKROUSOV I.; VYSHNEVSKIY B. Nosocomial Outbreak of Multidrug-Resistant Tuberculosis Caused by a Strain of Mycobacterium tuberculosis W-Beijing Family in St. Petersburg, Russia. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.21, p.596–602, 2002.

NGUYEN L.; PIETERS J. The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages. **TRENDS in Cell Biology**, v.15, n.5, p.269-276, 2005.

NORTH R.J.; JUNG Y.J. Immunity to Tuberculosis. **Annual Review Immunology**, v.22, p.599-623, 2004.

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

PIETERS J. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. **Microbes and Infection**, v.3, p.249-255, 2001.

RAJA A. Immunology of tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.12, p.213-232, 2004.

RIENDEAU C.J.; KORNFELD H. THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection. **Infection and Immunity**, v.71, n.1, p.254-259, 2003.

SCHLUGER N.W.; ROM W.N. The host immune response to Tuberculosis. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**, v.157, p.679-691, 1998.

SHARMA S. K.; MOHAN A. Multidrug-resistant tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p.354-376, 2004.

SHARMA M. K.; AL-AZEM A.; WOLFE J.; HERSHFIELD E.; KABANI A. Identification of a predominant isolate of *Mycobacterium tuberculosis* using molecular and clinical epidemiology tools and *in vitro* cytokine responses. **BMC Infectious Diseases**, v.3, 2003.

SILVER R. F.; LI Q.; ELLNER J. J. Expression of Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within Human Monocytes: Virulence Correlates with Intracellular Growth and Induction of Tumor Necrosis Factor Alpha but Not with Evasion of Lymphocyte-Dependent Monocyte Effector Functions. **Infection and Immunity**, v.66, n.3, p. 1190–1199, 1998.

SMITH I. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. **Clinical Microbiology Reviews**, v.16, n.3, p.463–496, 2003.

STEWART G. R.; ROBERTSON B. D.; YOUNG D. B. Tuberculosis: A Problem With Persistence. **Nature Reviews Microbiology**, v.1, p.97-105, 2003.

STOKES A.; DOXSEE R. The receptor-mediated uptake, survival, replication, and drug sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* within the macrophage-like cell line THP-1: a comparison with human monocyte-derived macrophages. **Cellular Immunology**, v.197, p.1-9, 1999.

SUPPLY P.; MAZARS E.; LESJEAN S.; VINCENT V.; GICQUEL B.; LOCHT C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. **Molecular Microbiology**, v.36, n.3, p.762-771, 2000.

THEUS S. A.; CAVE M. D.; EISENACH K. D. Activated THP-1 Cells: an Attractive Model for the Assessment of Intracellular Growth Rates of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Infection and Immunity**, v.72, n.2, p.1169–1173, 2004.

THEUS S. A.; CAVE M. D.; EISENACH K. D. Intracellular Macrophage Growth Rates and Cytokine Profiles of *Mycobacterium tuberculosis* Strains with Different Transmission Dynamics. **The Journal of Infectious Diseases**, v.191, p.453–60, 2005.

**THEUS S.; EISENACH K.; FOMUKONG N.; SILVER R. F.; CAVE M. D. Beijing family *Mycobacterium tuberculosis* strains differ in their intracellular growth in THP-1 macrophages.** The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, v.11, n.10, p.1087–1093, 2007.

VALWAY S.E.; SANCHEZ M.P.; SHINNICK T.F.; ORME I.; AGERTON T.; HOY D.; JONES J.S.; WESTMORELAND H.; ONORATO I. M. An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. **New England Journal of Medicine**, v.338, n.10, p.633-639, 1998. Erratum in: **New England Journal of Medicine**, v.338, n.24, p.1783, 1998.

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

van HELDEN E. G. H.; STANTON L.-A.; WARREN R.; RICHARDSON M.; van HELDEN P. D. Diversity of in Vitro Cytokine Responses by Human Macrophages to Infection by *Mycobacterium tuberculosis* Strains. **Cell Biology International**, v.25, n.1, p.83-90, 2001 (a).

van HELDEN E. G. H.; HON D.; LEWIS L.-A.; BEYERS N.; van HELDEN P. D. Mycobacterial Growth in Human Macrophages: Variation According to Donor, Inoculum and Bacterial Strain. **Cell Biology International**, v.25, n.1, p.71–81, 2001 (b)

YANG Z. H.; IJAZ K.; BATES J. H.; EISENACH K. D.; CAVE M. D. Spoligotyping and Polymorphic GC-Rich Repetitive Sequence Fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Having Few Copies of IS6110. **Clinical Microbiology**, v.38, n.10, p.3572–3576, 2000.

WHO. **Global tuberculosis control - surveillance, planning, financing**. Geneva: WHO, 2007.

ZHANG M.; GONG J.; LIN Y.; BARNES P. F. Growth of Virulent and Avirulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains in Human Macrophages. **Infection and Immunity**, v.66, p.794–799, 1998.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)