

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PEDRO COSTA CAMPOS FILHO**

**FREQÜÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES KATG E KASA EM CEPAS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A ISONIAZIDA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

**ILHÉUS - BAHIA
2010**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

PEDRO COSTA CAMPOS FILHO

**FREQÜÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES KATG E KASA EM CEPAS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A ISONIAZIDA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

Dissertação apresentada, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia e Biotecnologia de Microorganismos, à Universidade Estadual de Santa Cruz.

Área de Concentração: Resistência Microbiana

Orientador: Dr. Fabrício Rios Santos

Co-orientador: Dr. João Carlos Teixeira Dias

ILHÉUS - BAHIA

2010

PEDRO COSTA CAMPOS FILHO

**FREQÜÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES KATG E KASA EM CEPAS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A ISONIAZIDA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

Ilhéus-BA, 07/01/2010.

Fabício Rios Santos – Dr.
UESC
(Orientador)

Renato Fontana – Dr.
UESC

Paulo Paes de Andrade – Dr.
UFPE

DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais e àqueles que ao longo do tempo me ajudaram a erguer e sustentar os pilares da minha vida, contribuindo na construção do homem que sou, dedico.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares, por tudo que sou.

A Dr. Fabrício Rios, pela orientação, mas principalmente pela confiança e amizade.

Ao professor Dr. João Carlos Teixeira Dias, pela sua co-orientação, apoio moral e em especial pelas horas de discussões enriquecedoras.

Ao meu amigo, irmão e orientando (IC) Jairo Muniz, por ter se dedicado plenamente a esse projeto, mas principalmente, pela amizade e respeito que temos um ao outro.

A professora MsC Silvia Maria Santos Carvalho, exemplo de docente, amiga, irmã (mãe) e digna de toda a minha admiração.

Aos professores da I Turma (2008) do PPG de Biologia e Biotecnologia de Microorganismos da UESC, pela disseminação do conhecimento.

Aos amigos pelo incentivo, apoio constante e compreensão pela minha ausência social.

A minha mãe, Maria do Carmo Oliveira, por todo amor e compreensão que tem despendido desde o momento de minha concepção.

Ao meu pai, Pedro Costa Campos, por todo o carinho e atenção, mesmo que a distancia.

A minha irmã, Daniella Oliveira Campos, não apenas pelos finais de semana e noites “perdidos” no auxílio da tradução de alguns textos, como também pela paciência de me ouvir, compreender e principalmente amar incondicionalmente.

A minha irmã MsC Danusa Oliveira Campos, por me incentivar na procura e crescimento profissional, dando-me seu próprio exemplo.

A minha irmã Jamille Oliveira Campos, que mesmo a distância, sempre vibrou positivamente pelas minhas conquistas e vitórias.

Ao amigo MsC. Iderval Borges pelo contínuo apoio, compreensão e fonte de força para ultrapassar os limites, fazendo-me acreditar continuamente na capacidade de superação.

A minha amiga Inatiane Martins, pelo companheirismo de todas as noites mal dormidas, mas divertidas, durante o processo de elaboração e escrita dessa dissertação.

A minha amiga-irmã Ana Paula Mariano, pela amizade, carinho, mas principalmente por acreditar no meu trabalho e me apoiar sempre.

Ao todos os colegas do LAFEN e do PPGBBM, agora grandes amigos, em especial a: Gustavo, Leonardo, Thiago, Gilvia, Lucas, Flamélia, Flávia e Renata.

Aos LACEN-BA, em especial a Dr. Cristiane Mota, pelos anos de amor e dedicação ao entendimento, estudo e excelência no diagnóstico da tuberculose na Bahia e Nordeste. Sem o apoio de vocês, nada disso teria acontecido.

A biomédica e amiga Joilda Nery, por todo o apoio, desde o início do projeto (dos contatos a execução do mesmo). Serei eternamente grato a tudo que fez por mim.

As biomédicas Glauceca Cabral, que em parceria com a Joilda, pôde ser minhas mãos em Salvador, possibilitando uma logística mais ágil dentro do projeto.

Ao amigo Marcelo Magalhães, que mostrou ser um verdadeiro amigo, auxiliando naquilo que era preciso, lá em Salvador.

Ao Laboratório NB3 da FIOCRUZ-BA, em nome do Dr. Sergio Arruda, por permitir a manipulação e extração do DNA das cepas de *M. tuberculosis*.

Aos pacientes com tuberculose que de forma incomparável e anônima, contribuíram para esse estudo.

“O que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.”

William Shakespeare

**FREQÜÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES *KATG* E *KAS4* EM CEPAS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A ISONIAZIDA EM
ISOLADOS CLÍNICOS DO ESTADO DA BAHIA, BRASIL.**

RESUMO

Esse trabalho objetivou conhecer a freqüência mutacional dos genes *katG* e *kasA* em 104 cepas de *M. tuberculosis* selecionadas na micobacterioteca do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz, do Estado da Bahia (LACEN-BA), isolados no ano de 2007. Após o cultivo do microorganismo em meio Löwenstein-Jensen e a extração do seu DNA, tal material foi analisado através da técnica de PCR-RFLP, utilizando-se os primers e enzimas de restrição responsáveis respectivamente pela obtenção do fragmento específico relacionados aos códons 315 do gene *katG* e 269 do *kasA*, e identificação da presença ou não de mutação nas cepas. Os dados mostram que 46,2% das micobacterias resistentes a INH tinha mutação para *katG*, e 34,6% apresentavam mutação em *kasA*. Das cepas sensíveis a esse mesmo fármaco, observou-se uma freqüência nula para o *katG*, enquanto que para o *kasA* foi de 46,2%. Foi avaliada também a analogia entre os genes mutantes e a produção de cepas resistentes aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da tuberculose, além da relação de dependência entre os mesmos. Os resultados encontrados permitem considerar que o *katG* funciona como um bom marcador para identificação de cepas resistentes a INH, enquanto que para o *kasA* essa realidade é adversa. Vale lembrar ainda que a freqüência de mutação encontrada em *katG* é baixa quando comparada com os achados de outras publicações, e que trabalhos posteriores devem ser realizados, com o objetivo de elucidar a freqüência de mutação de outros genes, como *tbnat*, *inhA* e *ahpC*.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistência; Isoniazida.

**FREQUENCY OF MUTATIONS IN GENES *KAS*A AND *KAT*G IN STRAINS OF
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTANT TO ISONIAZID IN CLINICAL
ISOLATES IN THE STATE OF BAHIA, BRAZIL.**

ABSTRACT

This study has investigated the frequency of *katG* and *kasA* genes mutation in 104 strains of *M. tuberculosis* selected at the Central Laboratory of Public Health Professor Gonçalo Muniz, Bahia State (LACEN-BA), identified in 2007. After culturing the microorganism in Löwenstein-Jensen and extracting their DNA, this material was analyzed by PCR-RFLP, using primers and restriction enzymes which are responsible for attainment of specific fragment related to codon 315 of gene *katG* and 269 *kasA*, and identifying the presence or absence of mutation in the strains respectively. Data showed that 46.2% of mycobacteria resistant to INH had *katG* mutation, and 34.6% had a mutation in *kasA*. In strains sensitive to the same drug, there was a null frequency for the *katG*, whereas for the *kasA* was 46.2%. We also evaluate the analogy between genes and the production of mutant strains resistant to other chemotherapeutic drugs used to treat tuberculosis and the relation of dependence between them. The results support the view that *katG* works as a good marker for identification of strains resistant to INH, even so for the *kasA* that reality is adverse. It is also worth noting that the frequency of mutations found in *katG* is low compared with the findings of other publications, and that further studies should be performed in order to elucidate the frequency of mutation of other genes, as *tbnat*, *inhA* and *ahpC*.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; Resistance; Isoniazid.

LISTA DE FIGURAS

1	Meio LJ contendo colônias de <i>M. tuberculosis</i>	23
2	Modelo esquemático da parede celular do <i>M. tuberculosis</i>	24
3	Técnica de BAAR positiva, mostrando bacilos corados em roxo.....	27
4	Cultura crescida de <i>M. tuberculosis</i>	27
5	Estrutura molecular da INH.....	34
6	Mecanismo de ação da isoniazida em <i>M. tuberculosis</i>	36
7	Passos do mecanismo de catalase ocorrida no <i>M. tuberculosis</i>	41
8	Polimorfismos na proteína katG, identificadas em cepas resistentes de <i>M. tuberculosis</i>	42
9	Estrutura tridimensional da proteína kasA.....	43
10	Polimorfismo encontrados no gene Kas (A e B), no <i>M. tuberculosis</i>	44
11	Número total de cepas analisadas no ano de 2007 pelo LACEN e o percentual de cepas selecionadas no trabalho.....	45
12	RFLP do códon 315 do gene <i>katG</i> , mostrando cepas selvagens e mutantes.....	50
13	RFLP do códon 269 do gene <i>kasA</i> , mostrando cepas selvagens e mutantes.....	50
14	Frequência de mutação no códon 315 do gene <i>katG</i> e sua relação com a produção de cepas resistentes a INH.....	53
15	Distribuição da frequência da mutação do gene <i>katG</i> no mundo.....	56
16	Frequência de mutação no códon 315 do gene <i>katG</i> e sua relação com a produção de cepas resistentes a RMP.....	57
17	Frequência de mutação no códon 315 do gene <i>katG</i> e sua relação com a produção de cepas resistentes a EMB.....	58
18	Frequência de mutação no códon 315 do gene <i>katG</i> e sua relação com a produção de cepas resistentes a ST.....	59

LISTA DE QUADROS

1	Classificação dos antibióticos utilizados no tratamento da TB.....	31
---	--	----

LISTA DE TABELAS

1	Taxa de Incidência da Tuberculose no Brasil e na Região Nordeste.....	28
2	Taxa de Mortalidade da Tuberculose no Brasil e na Região Nordeste.....	29
3	Diferentes esquemas utilizados para o tratamento da TB.....	32
4	Inquérito de Prevalência da Resistência no Brasil entre 1995 a 1997.....	33
5	Genes relacionados à produção de cepas resistentes/sensíveis no <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
6	Esquema utilizado para a realização do PCR.....	47
7	Passos utilizados para a amplificação do fragmento de interesse.....	47
8	Características peculiares dos Primers e das Enzimas de Restrição utilizadas no atual trabalho.....	48
9	Reagentes utilizados para o preparo da reação de RFLP.....	48
10	Diferentes tempos utilizados para cada reação (RFLP).....	49
11	Publicações sobre frequência do gene katG, realizadas no Brasil, nos últimos dez anos.....	54
12	Análise da relação entre mutação em <i>kasA</i> e produção de cepas resistentes aos quimioterápicos utilizados para o tratamento da TB.....	62
13	Relação de dependência entre INH e RMP.....	65
14	Relação de dependência entre INH e EMB.....	66
15	Relação de dependência entre INH e ST.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Proteína Carreadora de Enoil-acil
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
BAAR	Bacilos Álcool-Ácido Resistentes
CC	Coeficiente de Contigência
COI	Composto I
COII	Composto II
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EIA	East-African-Indian
EMB	Etambutol
EUA	Estados Unidos da América
FAZ	Síntese de ácidos graxos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Adquirida
INH	Isoniazida
INHR	Resistente a Isoniazida
INHS	Sensível a Isoniazida
KAS	β -Cetoacil-ACP Sintetase
LACEN-BA	Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz, do Estado da Bahia
LJ	Löwenstein-Jensen
MDR-TB	<i>M. tuberculosis</i> multi-resistentes a drogas
MIC	Concentração Inibitória Mínima

NAD	Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina
OR	Odds Ratio
PAS	Ácido p-Aminosalicílico
PCC	Citocromo C Peroxidase
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Purified Protein Derivative
PZA	Pirazinamida
RFLP	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição
RMP	Rifampicina
RNA _r	Ácido Ribonucléico Ribossomal
ROS	Espécies de Oxigênio Reativo
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD	Superoxido Dismutase
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
ST	Streptomycina
TB	Tuberculose
TME	Taxa de Mortalidade Específica
UV	Ultravioleta
WHO	Organization Health World
.OH	Radicais Hidroxil

SUMÁRIO

	Resumo	vii
	Abstract	viii
1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Objetivos	20
1.1.1	Objetivo Geral.....	20
1.1.2	Objetivo Específico.....	20
2	TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS	21
2.1	A doença	21
2.2	Características do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.3	Diagnóstico	26
2.4	Epidemiologia	28
2.5	Tratamento	30
2.6	Isoniazida (INH)	33
2.6.1	Mecanismos de ação da INH.....	34
2.6.2	Determinantes genéticos da resistência à INH.....	37
2.6.3	katG (Catalase-Peroxidase).....	39
2.6.3.1	Características do katG.....	40
2.6.3.2	<i>KatG versus</i> Resistência Micobacteriana.....	41
2.6.4	<i>KasA</i> (β -Cetoacil-ACP Sintetase).....	42
2.6.4.1	Características do <i>kasA</i>	43
2.6.4.2	<i>kasA versus</i> Resistência Micobacteriana.....	44
3	Materiais e Método	45

3.1	Obtenção e Seleção das cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
3.2	Cultivo, identificação e antibiograma	46
3.3	Técnica de Extração do DNA do <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	46
3.4	Eletroforese da extração do DNA	46
3.5	Quantificação do DNA das amostras	47
3.6	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	47
3.7	Eletroforese das ampliações	48
3.8	Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP)	48
3.9	Eletroforese das restrições e suas análises	49
3.10	Avaliação estatística dos dados	51
4	Resultados e Discussão	52
4.1	Gene <i>katG</i>	52
4.1.1	Enzimas de restrição.....	52
4.1.2	Análise de frequência de mutação do gene <i>katG</i> em cepas resistentes e sensíveis a INH e a outros fármacos.....	53
4.1.2.1	<i>KatG versus</i> INH.....	53
4.1.2.2	<i>KatG versus</i> RMP.....	57
4.1.2.3	<i>KatG versus</i> EMB.....	58
4.1.2.4	<i>KatG versus</i> ST.....	59
4.1.3	Análises da mutação em <i>katG</i> associado a produção de resistência a INH e aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB.....	60
4.2	Gene <i>kasA</i>	61
4.2.1	<i>kasA versus</i> INH.....	61
4.2.2	Análises da mutação em <i>kasA</i> associado a produção de resistência aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB.....	63

4.3	Teste de dependência entre os fármacos.....	63
4.3.1	INH <i>versus</i> RMP.....	64
4.3.2	INH <i>versus</i> EMB.....	65
4.3.3	INH <i>versus</i> ST.....	66
4.3.4	INH <i>versus</i> ETH e PZA.....	67
4.4	Interação entre <i>katG</i> com RMP, EMB e ST e a nova conduta de tratamento para TB.....	67
5	CONCLUSÃO.....	69
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
	Apêndice A.....	83
	Apêndice B.....	84

1 INTRODUÇÃO

A Tuberculose (TB) é a segunda doença infecto-contagiosa que mais mata em todo o mundo, estimando-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja infectada pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o que resulta em dois milhões de mortes a cada ano. Essa doença atingiu proporções alarmantes, e hoje é considerado um agravo a saúde pública, principalmente em virtude da redução dos investimentos em medidas profiláticas durante duas décadas, sobretudo, desde a implantação da Isoniazida (nos anos 50) na quimioterapia de curto prazo para TB quando se acreditava que a doença estivesse sob controle. Somando-se a isso a combinação de fatores demográficos, os movimentos populacionais, a expansão da epidemia do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) e o aumento da resistência às drogas.

Em 1993, a OMS declarou a TB como emergência global e, desde então, vem desenvolvendo políticas para contê-la. Estima-se que se a efetividade do controle da TB não obtiver melhoras substanciais, o número de casos novos passará dos 200 milhões em 2001 para perto de um bilhão no ano de 2020. O Brasil está entre os principais países, ocupando a 15ª posição entre as regiões com a maior prevalência da doença.

Apesar do agente causador da TB humana ser altamente infectante, sua capacidade de desenvolver a doença clínica é relativamente baixa. Os fatores predisponentes ao desenvolvimento da doença não foram totalmente elucidados, mas, de maneira geral, eles são atribuídos a uma combinação entre fatores ambientais e sociais, características do hospedeiro e da linhagem do *M. tuberculosis*.

Fatores sociais típicos de nações em desenvolvimento, como pobreza, desnutrição, estresse, superpopulação e exposição à micobactérias ambientais, influenciam a susceptibilidade à TB. Contudo, existem evidências de que características genéticas multifatoriais, idade, estado imunológico do indivíduo, além de doenças concomitantes e/ou pré-estabelecidas podem predispor os indivíduos, seja de forma positiva ou negativa.

Adicionalmente, a emergência e a disseminação de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a múltiplas drogas (MDR-TB) também se tornaram uma séria ameaça para o controle da TB. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2008), para que uma cepa seja considerada MDR-TB, ela precisa ser resistente a pelo menos isoniazida e rifampicina. Vale ressaltar que tais fármacos, juntamente com a pirazinamida, compõem a primeira linha de tratamento dessa doença.

A isoniazida (INH) é classificada como o mais potente quimioterápico utilizado no tratamento da TB, não apenas em comparação aos fármacos da primeira linha de tratamento, mas também quando comparado a todos os outros utilizados para a destruição das micobactérias. Isso acontece por que ela apresenta diferentes mecanismos de ação no microorganismo, que vão desde destruição e inibição da parede celular, até a perda de macromoléculas do microorganismo, como por exemplo, o seu ácido desoxirribonucléico (DNA).

Esse antibiótico é classificado como uma pró-droga, encontrando-se inativo antes de penetrar no microorganismo. Após a ingestão do medicamento, ele irá se distribuir sericamente por todos os tecidos até atingir os bacilos de Koch. Depois da internalização do fármaco pelo microorganismo, o mesmo será ativado através da enzima catalase-peroxidase, sintetizada pelo gene *katG*, alterando a estrutura tridimensional deste quimioterápico e ativando-o.

A catalase-peroxidase é uma enzima produzida por muitas bactérias, dentre elas a *Escherichia coli* e o próprio *Mycobacterium tuberculosis*. Essa proteína está envolvida nos mecanismos moleculares de defesa do microorganismo contra o oxigênio reativo e radicais livres, transformando-os em água e gases não tóxicos que serão liberados ou re-utilizados pelo próprio organismo. Entretanto, ela também é responsável por reagir com a INH, transformando-a em subprodutos tóxicos para o microorganismo, como o Ácido Iso-Nicotínico, Piridina 4-Carboxialdeído e radicais Acila, dentre outros substratos.

A descoberta da relação entre a função do gene *katG* (em 1992) e a susceptibilidade à INH, associado com a observação do número crescente de cepas resistentes apenas a INH (INH^R) e/ou cepas MDR-TB, direcionou investimentos científicos objetivando melhor

entendimento desse gene. Trabalhos posteriores foram realizados nas mais diferentes regiões do globo, mostrando que todas as cepas mutantes eram resistentes ou apresentavam uma Concentração Inibitória Mínima (MIC) aumentada, contudo, observou-se que nem todas as cepas resistentes a INH tinham necessariamente alguma mutação nesse gene.

Em meados da década de 90, o gene *kasA* começou a ser apontado, também, como um possível gene-foco na produção de resistência, pois ele mostrou-se importante na codificação de uma proteína transportadora, conhecida como β -Cetoacil Sintetase. Tal proteína está envolvida no alongamento dos ácidos graxos (principal sítio de ação da INH), intermédio na via de biossíntese dos ácidos micólicos, importante para a formação da parede celular dos microorganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. No entanto, essa relação entre *kasA* versus cepas INHR ainda não está muito bem elucidada.

Outros genes também foram apontados como ligados a resistência a INH. Dentre eles, pode-se citar o *inhA*, responsável na participação da síntese protéica do ácidos micólicos que compõem a parede celular das micobactérias; e o operon *OxyR-ahpC*, formado pelo gene *oxyR*, responsável pelo processos oxidativos induzidos na presença de H_2O_2 , e por regular o gene *ahpC*. Esse último, por sua vez, codifica uma pequena subunidade da enzima Alquil-Hidroperoxidase Redutase, responsável por reduzir peróxidos orgânicos por seus respectivos alcoóis, ativando também a INH.

Atualmente, estudos moleculares destes genes permitem, dentre outras coisas, traçar o perfil epidemiológico molecular das distribuições das cepas INHR e/ou MDR-TB espalhadas pelo mundo. Além do mais, possibilitam o entendimento da dinâmica de transmissão e a identificação dos fatores de risco em uma comunidade micobacteriana, bem como a compreensão dos seus diferentes mecanismos, que, por sua vez, auxiliam na descoberta de novos agentes terapêuticos, assim como no desenvolvimento de métodos de diagnóstico moleculares rápidos e eficientes, objetivando um tratamento direcionado, eficaz e com menor efeito lesivo para o paciente.

Diante do exposto, esta pesquisa busca conhecer a incidência da mutação dos genes *katG* e *kasA* em cepas de *M. tuberculosis* resistentes e sensíveis a INH isolados do estado da Bahia (2007), assim como verificar se o aparecimento de cepas mutantes estarão obrigatoriamente vinculados ao surgimento de microorganismos não responsivos ao tratamento com a INH, além dos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência de mutação nos genes *katG* e *kasA* em isolados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes/sensíveis a INH, no estado da Bahia, correlacionando as mutações com o surgimento de cepas não responsivas ao tratamento.

1.1.2 Objetivos específicos

- Verificar a frequência de mutação para os genes *katG* e *kasA* em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*;
- Relacionar a influencia da mutação com o surgimento de fenótipos resistentes/sensíveis a INH, para ambos os genes;
- Relacionar a influencia dessas mutações com a produção de resistência e/ou multirresistência a outros fármacos utilizados no tratamento da TB;
- Analisar a relação de dependência entre a INH e o outros fármacos utilizados no tratamento da TB.

2 TUBERCULOSE: ASPECTOS GERAIS

2.1 A doença

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa de caráter crônico causada pelo complexo *Mycobacterium tuberculosis*, o qual inclui *M. tuberculosis* (também conhecida como bacilo de Koch), *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e o mais recentemente descoberto *M. canettii*. Humanos são os reservatórios primordiais do *M. tuberculosis* e *M. africanum*, e os bovinos para o *M. bovis*, entretanto, a pasteurização do leite foi responsável pela diminuição do número de casos dessa última espécie (BERTOLLI FILHO, 2001).

A Peste Branca, como também é conhecida essa doença, foi definida desde meados do século passado como sendo uma “moléstia social” que, alinhada à sífilis e ao alcoolismo, constituíram-se em um dos principais conjuntos desafiadores da ordem social (BERTOLLI FILHO, 2001).

De acordo com a *American Thoracic Society* (2000), existem vários fatores determinantes na infecção por TB, sendo eles: Infectividade do paciente que expõe as partículas contaminadas; a concentração de organismos no ar, determinado pelo volume do espaço, ventilação e a distância da exposição, e; o estado imunológico do indivíduo expostos.

A transmissão do *M. tuberculosis* ocorre através de tosse e espirro ou outros aerossóis contendo quantidade suficiente de microorganismo. Tais partículas apresentam de 1 a 5µm de tamanho e podem permanecer suspensas no ar por um longo período de tempo, após terem sido expulsos dos alvéolos. Em contraste, grandes partículas depositadas na parede das vias respiratórias são efetivamente levadas pelo aparato mucociliar para o trato respiratório superior e apesar de dificilmente serem dispersas, apresentam uma carga bacteriana relativamente alta (TIRUVILUAMALA e REICHMAN, 2002).

Após serem inalados, os microorganismos se depositarão nos alvéolos, encontrando-se com os macrófagos alveolares, onde serão posteriormente fagocitados. Apesar de ainda não se conhecer nenhuma endotoxina ou exotoxina produzida por esse microorganismo, o mecanismo de digestão do *Mycobacterium* não ocorrerá dentro daquela célula, fazendo com que a mesma conduza-o consigo por via linfática através do corpo, podendo se instalar em outros órgãos. O estabelecimento da TB em pessoas com a resposta imune intacta é caracterizado pela formação do granuloma, ocorrendo à ativação dos linfócitos e formação de agregados de macrófagos, limitando a multiplicação do *M. tuberculosis* naquele local (BRASIL, 2008).

A TB pulmonar pode se apresentar em diferentes formas, sendo a primária e a secundária as mais comuns. A primária resulta da infecção inicial do bacilo, sendo a inalação o principal mecanismo utilizado pra a invasão; a secundária, por sua vez, se caracteriza pelo estabelecimento do microorganismo no corpo do paciente, caracterizando a fase crônica da doença (TIRUVILUAMALA e REICHMAN, 2002).

Outra forma clinicamente observada é a tuberculose ectópica. Nesse tipo de lesão, observar-se-á o acometimento de outros órgão do corpo, como ossos, fígado, rins, linfonodo, etc (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVALENCE, 1994).

2.2 Características do *Mycobacterium tuberculosis*

O *Mycobacterium tuberculosis* é um bacilo álcool-ácido resistente, que mede aproximadamente de 1 a 10 µm de comprimento por 0,2 a 0,6 µm de largura, aflagelado, e não formador de esporos, nem produtor de toxinas. É um microorganismo aeróbio estrito e intracelular facultativo, podendo ser encontrado intracitoplasmaticamente parasitando e se multiplicando em células fagocitárias. Além disso, ele possui longo período de geração (de 16 a 48 horas), dependendo da oferta de oxigênio, de nutrientes e do pH do meio (KRITSKI et al., 2000).

Quando crescidos em meio de cultura, apresentam colônias de cor creme (Figura 1), rugosas. De acordo com o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008), o meio adequado para o seu crescimento é o Löwenstein-Jensen (LJ), e o microorganismo deverá ser inoculado em temperatura de 37° C.



Figura 1 - Meio LJ contendo colônias de *M. tuberculosis*.

Fonte: Autor.

Morfológicamente, o envelope microbiano tem sido apresentado por diversos autores como um modelo esquemático, composto por parede celular, membrana citoplasmática, além de outros componentes, como serão posteriormente citados. Sua complexa parede celular (Figura 2) é composta majoritariamente por ácidos graxos, como o ácido micólico, que são covalentemente ligados ao arabinogalactano (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). Tais ácidos possuem certa afinidade com o corante Fucsina, gerando complexos que são responsáveis pela característica tintorial de resistência a descoloração por soluções álcool-ácidas, apresentada por esse microorganismo, que são então designados como Bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR). Tais características tintoriais e o aspecto morfológico não permitem a diferenciação das espécies micobacterianas, embora algumas se apresentem morfológicamente mais espessas e curvas (BRASIL, 2008). Para a definição da espécie é preciso que os bacilos sejam isolados em meio de cultivo e identificados por testes fenotípicos e/ou moleculares (BRASIL, 2008; DEL PORTILLO, 1991).

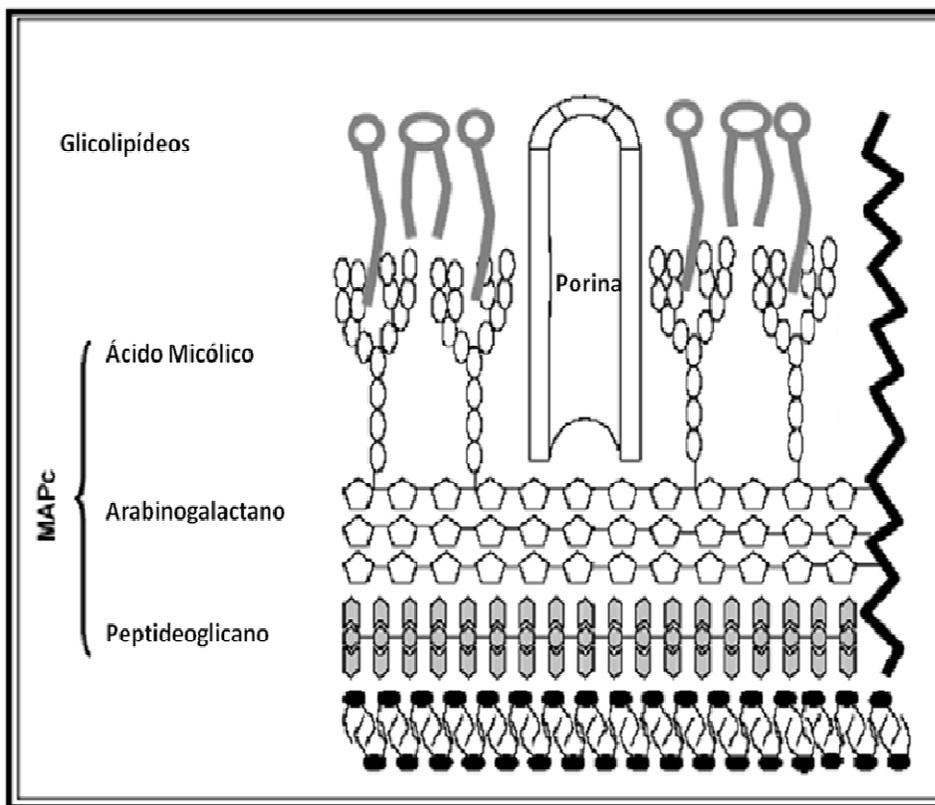


Figura 2 - Modelo esquemático da parede celular do *M. tuberculosis*.

Fonte: Brennan e Nikaido, 1995.

Os ácidos micólicos são longas cadeias de ácidos graxos α -alquil- β -hidroxi (R^{\prime} -CH[OH]-CH[$R^{\prime\prime}$]-COOH) exclusivos da micobactéria e outros microorganismos com taxonomias próximas. R^{\prime} representa a cadeia de meromicolato contendo de 50 a 56 átomos de carbono e $R^{\prime\prime}$ é um curto alifático possuindo de 22 a 26 átomos de carbono. A biossíntese de ácidos graxos na micobactéria, diferente das outras bactérias, apresentam duas vias distintas, nomeadas por síntese de ácidos graxos tipo I (FAZ-I) e síntese de ácidos graxos do tipo II (FAZ-II) (KREMER et al., 2002). O FAZ-I, que possui um multidomínio contendo todas as funções enzimáticas necessárias requeridas para a síntese de um novo ácido graxo, produz uma saturação bimodal de ácidos graxos de palmitato ($C_{16:0}$) e tetracosanoato ($C_{24:0}$ ou C_{26}). FAZ-II subsegue os produtos finais de FAZ-I para formar longas cadeias de ácidos graxos ou meromicolatos. Cadeias acil vinculados a uma Proteína Carreadora de Enoil-acil (ACP) são alongadas por ciclos repetitivos de condensação, ceto redução, desidratação enoil-redução catalisada por um cetoacil-ACP-redutase, um hidroxiaçil-ACP desidratase, e um enoil-ACP

redutase, respectivamente. A cadeia meromicolato resultante é então condensada com auxílio do ácido graxo C₂₆ para formar o ácido micólico. Embora as estruturas do ácido micólico tenham sido bem caracterizadas, a utilização de ferramentas genéticas e da enzimologia da biossíntese de tais componentes começaram a ser elucidados recentemente (KREMER et al., 2000; BHATT et al., 2005).

M. tuberculosis, *M. bovis* e *M. smegmatis*, apresentam genes conhecidos por codificarem enzimas de FAZ-II, que são encontrados em dois loci. Um locus é o operon que incluem genes que codificam duas β-cetoacil-ACP sintetase (*kasA* e o *kasB*) e da proteína carreadora de acil (*acpM*). Os genes da cetoreductase (*mabA*) e os da enoil redutase (*inhA*) estão presentes em outro operon (BHATT et al., 2005). É importante ressaltar que as funções do FAZ-II ainda não estão totalmente esclarecidas, e que alguns desses genes citados anteriormente serão discutidos mais adiante.

A Membrana Citoplasmática é formada por fosfolípidos que são invariavelmente derivados de ácido fosfatídico, sendo o fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e manoses os mais comuns, tendo tais características restritas a bactérias da ordem dos *Actinomycetales* (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). Essa interface vital fornece proteção osmótica e a regulação do tráfego de soluções específicas entre o citoplasma e o meio externo (PALOMINO et al, 2007).

Ainda na membrana, serão encontrados sensores de proteínas com diferentes funções, como por exemplo, os que mensuram a concentração de moléculas no ambiente, os que atuam como proteínas translocadoras de sinais para o maquinário genético e metabólico no citoplasma e os que realizam a mediação de carreadores seletivos na passagem de nutrientes e íons (PALOMINO et al, 2007). Além disso, também são conhecidos os glicosilfosfolipídeos, que apesar de serem encontrados nesta organela, estão diretamente envolvidos na biossíntese de outra, a parede celular (BRENNAN e NIKAIDO, 1995).

Os outros componentes ligados à membrana plasmática incluem um número de produtos de base-politerpeno, tais como os carotenóides e a niacina, e as menaquinonas que estão envolvidas no transporte eletrônico, e que são utilizados nos testes de identificação fenotípica das espécies (BRENNAN e NIKAIDO, 1995; BRASIL, 1997). Em relação aos transportes transmembrana, observa-se que substâncias hidrofílicas não conseguem ultrapassar a camada bilipídica, utilizando assim os canais de porina para essa finalidade. Por sua vez, os compostos lipofílicos possuem trânsito livre através da camada bilipídica, não utilizando dessa forma tais canais como transportador (NARDELL, 1989).

2.3 Diagnóstico

A TB pulmonar pode ser diagnosticada empregando-se diferentes análises, que vão desde a clínica (sintomatologia), a exames laboratoriais: filmes radiográficos, intradermorreação de Mantoux, análise microscópica do escarro, a cultura do mesmo e mais recentemente a utilização da biologia molecular. (BRASIL, 2008).

Como a TB é normalmente adquirida por inalação do bacilo, a localização inicial é no pulmão. Os sintomas gerais da TB pulmonar são febre, sudorese, perda ponderal, anorexia e adinamia. Todos estes sinais e sintomas são inespecíficos e podem estar presentes em outras enfermidades pulmonares (KRITSKI et al., 2000).

A radiografia do tórax, por sua vez, apresentará características das cavidades lobulares do pulmão, no entanto, em pacientes imunossuprimidos e HIV positivos podem apresentar lesões semelhantes às encontradas em outras doenças pulmonares não-tuberculosas (RUFFINO-NETTO, 2006).

Em análise microscópica (coloração de BAAR - Figura 3), para que uma amostra de escarro se positive, é necessária uma média de 5.000 a 10.000 bacilos por mL de secreção. Isso significa que um esfregaço negativo não exclui um caso de TB. Esse fato é ainda mais notável quando a infecção ocorre em órgãos (pleura, meninges), onde um número ainda menor de organismos pode causar manifestações clínicas; entretanto este continua sendo um dos principais métodos utilizados atualmente na rotina diagnóstica de TB (FERREIRA *et al.*, 2005; BLOOM, 1994).

Outro método utilizado é a prova ou teste tuberculínico, também conhecido como PPD (*Purified Protein Derivative* – Derivado Purificado da Protéica) ou reação de Mantoux, que é uma reação intradérmica que apenas verifica se o indivíduo teve ou não contato com o bacilo (BRASIL, 2009)

A cultura (Figura 4) se mostra uma técnica mais sensível (ainda utilizada atualmente como padrão ouro) podendo-se observar crescimento mesmo quando o microorganismo está encontrado em baixas quantidades (aproximadamente 10 a 100 bactérias por mL de escarro). A cultura é indicada para os suspeitos de TB pulmonares persistentemente negativos ao exame direto, para o diagnóstico de formas extrapulmonares e para os casos de suspeita de resistência bacteriana aos fármacos, quando deve ser realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (KUBICA e KENT, 1985; BRASIL, 2008).

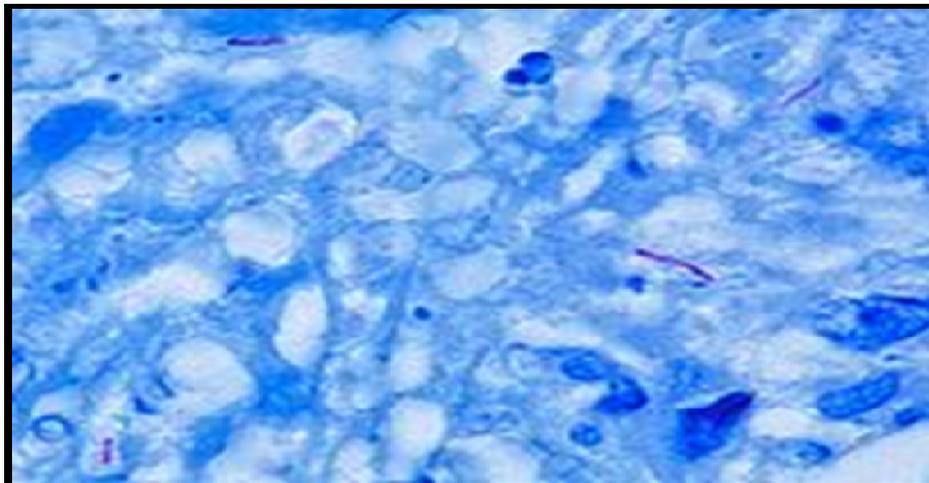


Figura 3 - Técnica de BAAR positiva, mostrando bacilos corados em roxo.

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/9/9b/Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_640.jpg/200px-Mycobacterium_tuberculosis_Ziehl-Neelsen_stain_640.jpg

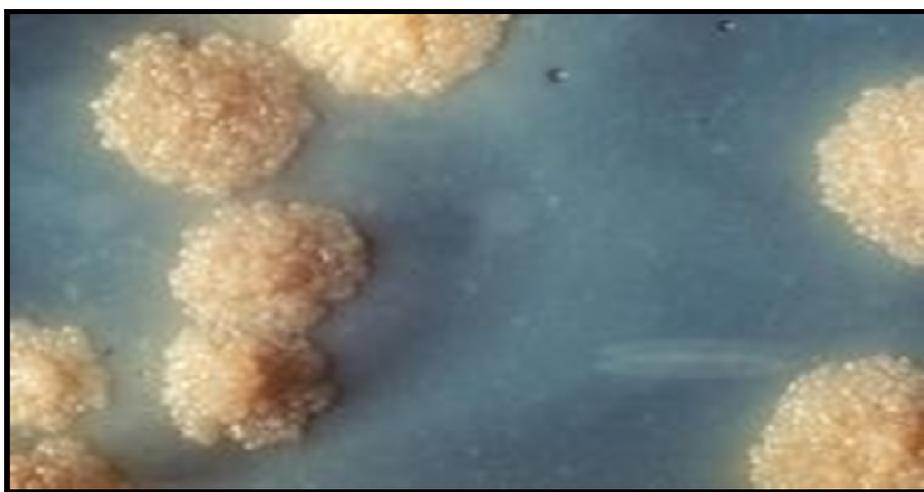


Figura 4 - Cultura crescida de *M. tuberculosis*

Fonte: http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/0/0a/TB_Culture.jpg/220px-TB_Culture.jpg

Tradicionalmente, o isolamento através da cultura tem sido realizado em meios sólidos e/ou líquidos, tais como o meio LJ, que é o mais utilizado, e aqueles que utilizam o Agar, como o meio Meddlebrook (7H-10 e 7H-11). O crescimento só é detectável 3 a 8 semanas após a inoculação (BRASIL, 2009; BLOOM e MURRAY, 1992).

A partir da década de noventa, técnicas de biologia molecular como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) passaram a ser utilizadas para o diagnóstico de diversas doenças, inclusive a TB. A vantagem destes testes é a alta sensibilidade e especificidade, além de oferecer o resultado em um curto espaço de tempo. A PCR permite a detecção de quantidades mínimas de material genético dependendo dos métodos utilizados para a extração da amostra e detecção do produto amplificado (ROSSETTI *et al.*, 1997).

2.4 Epidemiologia

Noventa e cinco por cento de todos os casos de TB ocorrem em países subdesenvolvidos, estimando-se que aproximadamente dois bilhões de pessoas estão infectadas ao redor do mundo, sendo que destes, oito milhões desenvolvem a doença. Dessa forma, a TB atualmente é classificada pela *Organization Health World* (WHO) como sendo a segunda doença infecto contagiosa que mais mata em todo o mundo, perdendo apenas para a AIDS (WHO, 2008).

Apesar dos números apontados pela WHO serem alarmantes, observa-se que a taxa de incidência e de mortalidade da TB encontrada no Brasil de 2000 a 2006 vem diminuindo com o passar dos anos (Tabela 1 e 2). A Bahia, também apresenta números decrescentes no que se refere a incidência e mortalidade, entretanto, essas taxas são mais elevadas quando comparadas proporcionalmente ao encontrado em todo o território brasileiro (Tabela 1 e 2) (BRASIL, 2008).

Tabela 1 – Taxa de Incidência da Tuberculose no Brasil e na Região Nordeste.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
BRASIL	47,8	43,1	44,7	44,8	43,8	42,0	38,9
Nordeste	47,6	46,3	44,4	46,5	46,2	45,6	41,2
Maranhão	52,0	46,9	47,6	45,3	46,0	45,5	42,0
Piauí	43,6	40,6	37,8	35,4	37,8	36,3	32,9
Ceará	46,0	47,6	47,5	51,0	49,6	50,1	43,5

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
R. G. do Norte	64,6	36,9	37,8	39,1	40,0	36,1	33,2
Paraíba	38,7	32,9	33,0	33,7	34,4	34,0	28,1
Pernambuco	48,0	47,7	50,2	52,9	54,3	53,2	48,3
Alagoas	40,8	39,9	39,7	40,9	40,3	41,7	37,8
Sergipe	30,8	23,3	24,4	27,5	25,1	32,1	28,9
Bahia	49,5	55,7	47,4	51,8	50,1	48,2	44,5

Fonte: Sinan/SVS/MS atualizado em 18/08/2008

Tabela 2 – Taxa de Mortalidade da Tuberculose no Brasil e na Região Nordeste.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
BRASIL	3,2	3,1	2,9	2,8	2,7	2,5	2,4
Nordeste	3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0	2,8
Maranhão	2,0	2,1	2,1	1,9	2,6	2,9	2,3
Piauí	2,2	1,9	2,7	2,4	2,1	2,4	2,2
Ceará	2,8	3,3	3,0	2,4	2,7	2,8	3,0
R. G. do Norte	2,4	2,3	1,6	1,5	1,6	1,7	1,2
Paraíba	1,7	1,5	2,4	3,2	2,2	3,9	2,9
Pernambuco	5,4	5,2	4,9	5,2	5,9	4,7	4,3
Alagoas	2,3	2,7	3,0	3,0	2,3	2,5	2,6
Sergipe	1,8	1,8	1,4	1,6	2,0	2,0	2,1
Bahia	3,3	3,2	3,5	3,1	3,0	2,7	2,7

Fonte: Sinan/SVS/MS atualizado em 18/08/2008

2.5 Tratamento

O desenvolvimento de agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças microbianas tem sido uma das aquisições mais buscadas nesse século, sendo que aproximadamente 50% de toda verba investida no mundo estão destinadas a produção de antibióticos (BRASIL, 2009).

A descoberta dos fármacos no combate à TB pode ser associada ao primeiro antibiótico a que o homem teve acesso, a Penicilina, descoberta por Alexander Fleming, no ano de 1928. No entanto, foram necessários 13 anos (1941) para aparecer no mercado a primeira forma injetável para uso terapêutico. Apesar da Penicilina ser um fármaco extremamente eficaz contra diversas doenças, mostrou-se curiosamente ineficaz contra a tuberculose (SOUZA e VASCONCELOS, 2005).

Em 1940, o tratamento da TB estava baseado no uso limitado de um número restrito de antibióticos, como a Estreptomicina (ST), ou a drogas sintéticas, como o Ácido p-Aminosalicílico (PAS) ou tiosemicarbazina. A ST, apesar de ser o quimioterápico mais potente conhecido na época, produzia alta toxicidade nos pacientes e nem sempre resultava na melhora completa dos mesmos. Inversamente, o PAS raramente produzia toxicidade, mas apresentava pouca ação sobre as micobactérias. Contudo, percebeu-se que o tratamento tornava-se eficiente com a associação destas duas drogas, além de reduzir a frequência de cepas resistentes a ambos (LEHMANN, 1946).

Em 1945, pesquisadores descobriram na Europa que a vitamina nicotinamida mostrara atividade antituberculosa. Para melhor entender esse achado, estudos começaram a ser realizados e muitos fármacos começaram a ser manipulados, criando-se uma nova molécula sintética com base em nicotinamida. A partir desse esforço, a PZA foi descoberta (FOX, 1952).

Em outra tentativa, ainda buscando aperfeiçoar a atividade da nicotinamida e de compostos de tiosemicarbazonas, β e γ -Piridialdeido tiosemicarbazonas foram sintetizados e mostraram uma ação ainda maior em relação aos compostos anteriormente produzidos, sendo que um dos intermediários obtido com a síntese desses compostos, Hidrazina do Ácido Isonicotínico (INH) apresentava atividade aumentada contra a TB, mostrando-se muito superior a qualquer outro composto, natural ou sintético. Esta descoberta foi feita no ano de

1952, mas levaria mais de 50 anos para que seus possíveis mecanismos de ação fossem propostos (VILCHÈZE e JACOBS, 2007).

Atualmente, existem diversos quimioterápicos utilizados no tratamento da TB, classificados em duas diferentes categorias: 1- Agentes de amplo espectro que inicia a ação anti-bacteriana sobre as micobacterias e sobre outras espécies bacterianas; 2- Agentes de espectro restrito, cuja atividades são primariamente restritas as micobactérias (CHOPRA e BRENNAN, 1998). O Quadro 01 apresenta os principais farmacoterápicos encontrados nessas duas categorias.

Quadro 01 – Classificação dos antibióticos utilizados no tratamento da TB.

Agentes de amplo espectro	Cicloserina; Fluoroquinolona; Macrolídeos; Rafampicina; Estreptomicina.
Agentes de espectro restrito	Isoniazida; Capreomicina; Clofazimina; Dapsone; Etambutol; Etionamida; Ácido p-aminosalicílico; Pirazinamida; Tiacetazona.

Atualmente, a primeira linha de tratamento da tuberculose é realizada com a utilização de INH, RMP e PZA. Cada uma delas age de forma diferenciada na população bacilar (BRASIL, 2008). Os esquemas de tratamento estão mostrados na Tabela 3.

A INH é utilizada no Esquema I, pois ela possui uma ação mais rápida e eficiente, quando comparada com os outros fármacos. Do ponto de vista da farmacocinética, o início do tratamento seria o equivalente a uma monoterapia, tendo unicamente a atuação da INH na morte microbiana, com posterior ação dos outros antibióticos. Entretanto, quando uma determinada cepa apresenta resistência a esse fármaco, se utilizará de outras condutas terapêuticas, menos eficientes, para tratar o paciente (NATAL et al., 2003; MITCHISON, 1998).

Estudos recentes apresentados pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2008) confirmam o crescente número de casos de cepas MDR-TB, observados tanto no âmbito de tratamento regional, como global. Estimativas do número de casos de MDR-TB, apresentando resistência pelo menos a INH e RMP, indicam aproximadamente 489.000 casos no ano de

2008, sendo que desses, cerca de 40.000 casos apresentavam resistência a outros fármacos, como a Fluoroquinolona, Amicacina, Canamicina ou Capreomicina.

Tabela 3 - Diferentes esquemas utilizados para o tratamento da TB.

Esquemas de Tratamento da TB		
Sem tratamento anterior casos novos de todas as formas exceto meningite tuberculosa	Esquema I	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH
Com tratamento anterior casos de retratamento em recidivas ou retorno após abandono do E-1	Esquema I Reforçado	2 meses: RMP / INH / PZA 4 meses: RMP / INH / EMB
Meningite tuberculosa	Esquema II	2 meses: RMP / INH / PZA 7 meses: RMP / INH
Falência do E-1, E-1 R ou E-2	Esquema III	3 meses: SM / ETH / PZA 9 meses: ETH / EMB

Fonte: MS, BRASIL, 2008.

No Brasil, trabalho realizado por Braga et al. (2003) mostrou qual a realidade da número de cepas MDR-TB. Vale ressaltar que os dados apresentados pelos autores são referentes aos anos de 1995 a 1997 (Tabela 4).

Tabela 4 - Inquérito de Prevalência da Resistência no Brasil entre 1995 a 1997.

	Resistência Primária		Resistência Adquirida		Resistência Combinada	
	n ^o	%	n ^o	%	n ^o	%
PACIENTES ESTUDADOS	4.272	83,1	866	16,9	5.138	100,0
PACIENTES SUSCETÍVEIS	3908	91,5	684	79,0	4592	89,4
QUALQUER RESISTÊNCIA	364	8,5	182	21,0	546	10,6
ISONIAZIDA (INH)	10	4,4	16	11,3	26	7,0
RIFAMPICINA (RMP)	3	1,3	9	6,6	12	3,3
ETAMBUTOL (EMB)	2	0,1	1	0,1	3	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	8	0,2	6	0,8	14	0,3
MONORESISTÊNCIA	269	6,3	93	10,7	362	7,0
ISONIAZIDA (INH)	158	3,7	57	6,6	215	4,2
RIFAMPICINA (RMP)	8	0,2	10	1,2	18	0,4
ETAMBUTOL (EMB)	3	0,1	1	0,1	4	0,1
ESTREPTOMICINA (SM)	100	2,3	25	2,9	125	2,4
MULTIRESISTÊNCIA	45	1,1	68	7,9	113	2,2
INH+RMP	31	0,7	51	5,9	82	1,6
INH+RMP+EMB	1	0,0	1	0,1	2	0,0
INH+RMP+SM	11	0,3	15	1,7	26	0,5
INH+RMP+EMB+SM	2	0,1	1	0,1	3	0,1
OUTROS PADRÕES	50	1,2	21	2,4	71	1,4
INH+EMB	3	0,1	1	0,1	4	0,1
INH+SM	45	1,1	20	2,3	65	1,3
INH+EMB+SM	1	0,0	0	0,0	1	0,0

Fonte: Braga et al., 2003.

2.6 Isoniazida (INH)

Hidrazina do Ácido Isonicotínico, ou simplesmente INH (Figura 5), foi sintetizada pela primeira vez em 1923 por dois cientistas tchecos, mas sua potente atividade quimioterápica só foi detectada em 1952, tornando este fármaco mais utilizado para o tratamento da TB (HEYM et al., 1999). Sua fórmula química é $C_6H_7N_3O$ e seu peso molecular é de $137,14g.mol^{-1}$. Esse composto é também conhecido por diversos nomes

genéricos, em inglês, como: dinacrin, ditubin, isolyn, niconil; nydrazid; rimifon; tyvid, dentre outros (PALOMINO *et al.*, 2007; JOHNSON *et al.*, 1995).

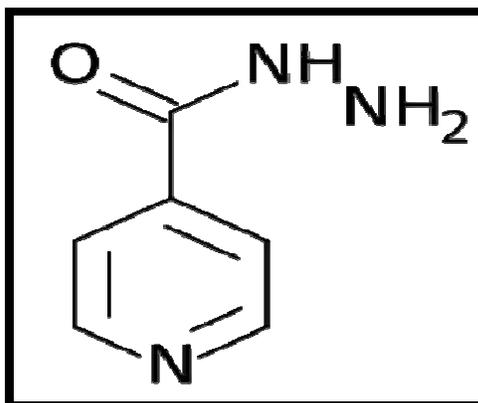


Figura 5 - Estrutura molecular da INH

Fonte: Chopra e Brennan, 1998.

2.6.1 Mecanismos de ação da INH

Sua ação é eficaz sobre algumas espécies do complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG e *M. africanum*), mostrando-se pouco eficiente ou completamente ineficaz para as outras micobacterias não-tuberculosas (WOLINSKY, 1979), isso é, ela apresenta ação exclusiva sobre as micobactérias que possuem crescimento lento (VILCHÈZE e JACOBS, 2007).

Sua MIC é de 0,02 a 0,05 $\mu\text{g ml}^{-1}$, sendo baixa quando comparada com os outros antibióticos utilizados no tratamento da TB. Em contraste, INH é 100 vezes menos ativa sobre aquelas micobacterias que apresentam crescimento rápido, como a *M. smegmatis* (VILCHÈZE e JACOBS, 2007).

Em 1953, foi descoberto o potencial bacteriostático da droga, sugerindo-se então que a INH inibia a síntese de compostos necessários a divisão celular (BARCLAY *et al.*, 1953). No mesmo ano, outro trabalho descreveu que a inibição do crescimento do *M. tuberculosis* pelo fármaco poderia ser revertida pela adição de α -cetoglutarato, piruvato de sódio, piridoxina e piridoxamina, e concluiu que a INH interferia em algumas vias metabólicas que envolviam piridoxal (POPE, 1953).

Ainda em 1953, cepas de *M. tuberculosis* isolados de escarros de diferentes pacientes foram cultivadas para posterior análise de seus antibiogramas, classificando as mesmas em diferentes grupos (resistentes/sensíveis a INH). Tais grupos foram posteriormente avaliados, associando o perfil de resistência a atividade da enzima catalase-peroxidase. Concluiu-se que todas as cepas que apresentavam uma MIC aumentada, tinham pouca ou nenhuma produção desta enzima (catalase-negativa), sugerindo a participação da mesma na ativação do fármaco (SEYDEL et al., 1976; HEYM et al., 1999).

Posteriormente, na década de 60, foi proposto um modelo onde o ácido iso-nicotínico era transformado através do sistema de catalase-peroxidase, ativando a droga (SEYDEL et al., 1976). Além disso, tais autores acreditavam que o principal mecanismo de ação do fármaco estava diretamente relacionado à troca do ácido iso-nicotínico pelo ácido nicotínico, pois os mesmos apresentam estruturas tridimensionais semelhantes (SEYDEL et al., 1976; HEYM et al., 1999).

Na seqüência, descobriu-se que o ácido nicotínico, normalmente sintetizado pela *M. tuberculosis*, é um importante precursor da Dinucleotídeo Nicotinamida Adenina (NAD), um co-fator indispensável para alguns sistemas enzimáticos da célula bacteriana (Figura 6) (JACKETT et al., 1977). Além disso, foi confirmado que a INH inibia a regulação do caminho do transporte dos eletrólitos pelo NAD⁺ para o nível desidrogenase NADH, como esquematizado na Figura 6 (DAVIS e WEBER, 1977).

Ainda no final da década de 60, pesquisadores observaram a formação de um pigmento precursor pela oxidação de INH na presença do NAD, e o acúmulo do mesmo foi atribuído a ação desse fármaco ou de um de seus metabólitos, como o ácido iso-nicotínico ou o 4-piridilmetanol, associados a enzima catalase-peroxidase (YOUATT e THAM, 1969). Subseqüentemente, pôde-se demonstrar que a presença de radicais livres, assim como a ativação e potencialização da toxicidade da INH, estavam diretamente associadas à enzima catalase-peroxidase (SHOEB et al., 1985).

Na década de 70, por sua vez, foram publicados os primeiros trabalhos sobre a inibição da síntese de ácidos nucléicos, da síntese de lipídios ou mais precisamente da biossíntese dos ácidos micólicos (WINDER e COLLINS, 1970).

Mais tarde, foi demonstrado que a INH inibe a síntese de ácidos graxos monoinsaturados C₂₄ e C₂₆, inibindo também a desaturase, enzima responsável pela produção desses ácidos graxos (DAVIDSON e TAKAYAMA, 1979).

Foi identificado também que a INH penetra na micobactéria por difusão passiva, apresentando uma ação bacteriostática nas primeiras 24 horas, tornando-se posteriormente

bactericida, matando apenas as bactérias que se encontram em divisão (fase LOG). Acredita-se que isso ocorra, pois sua atuação está mais centralizada na desestruturação dos ácidos graxos encontrados na parede celular, produzindo rugas superficiais e abaulamento na bactéria; além de produzir perda de estruturas internas, como já discutido anteriormente. Entretanto, microorganismos que crescem em condições anaeróbias ou se encontram na fase estacionária não sofrem ação do fármaco (VILCHÈZE e JACOBS, 2007).

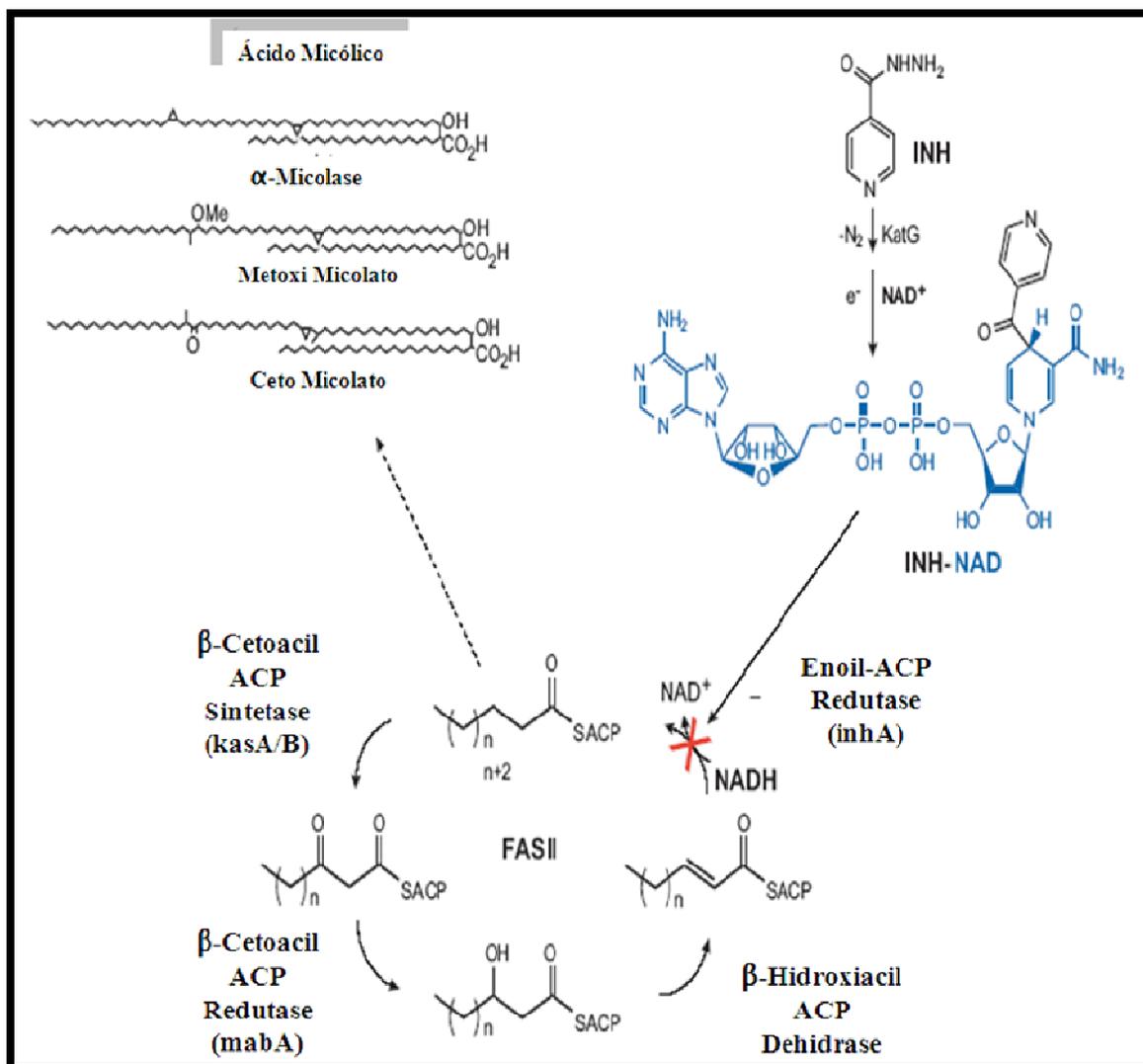


Figura 6 - Mecanismo de ação da isoniazida em *M. tuberculosis*. INH é ativado por KatG para formar o adutor INH-NAD. O adutor inibe InhA, Enoil-ACP redutase na sintase do ácido graxo do sistema tipo II (FAZII), que sintetiza ácidos micólicos (representação de três classes de ácido micólicos) (50). Isso resulta da inibição de ácidos micólicos e finalmente na morte microbiana.

Outros estudos demonstraram que cepas de *M. smegmatis* tratadas com INH começaram a desenvolver, após três horas, dobraduras na superfície, e com o aumento do tempo de tratamento, observou-se concomitante o aumento das pregas. Nove horas após a aplicação do fármaco, o número e o tamanho das dobras mostraram-se muito maiores, apresentando deformações no microorganismo (VILCHÈZE et al., 2000).

2.6.2 Determinantes genéticos da resistência à INH

As bactérias utilizam um número de estratégias para conseguir obter resistência a diferentes drogas. Telenti (1997) sumariza-as em três categorias: Mecanismos de barreira (diminuição da permeabilidade e a presença de bombas de efluxo); degradação ou inativação de enzimas (como a β -lactamase); e a modificação do alvo de ação das drogas (como o aparecimento de mutação simples no gene-chave). De acordo com o mesmo autor, tais características podem ser adquiridas ou herdadas através de elementos genéticos exógenos móveis (como os plasmídeos ou transposons) ou mutações do próprio cromossomo microbiano.

As micobactérias, por sua vez, não são muito diferentes quando comparada as outras bactérias. Diferem-se sim, nas características observadas em sua parede celular, apresentando peculiaridades a esse microorganismo, e, por conseguinte, resistência intrínseca a diversos fármacos (NIKAIDO, 1994; NIEDERWEIS, 2003). Enzimologicamente, sabe-se que a β -lactamase funciona como uma eficiente degradadora enzimática, modificando dessa forma a ação de algumas drogas (KWON et al., 1995).

No aspecto molecular, esses mecanismos ainda não estão evidentemente estabelecidos, principalmente no que diz respeito aos processos que comumente intermediam a resistência a multidrogas, comparado-as com outros microorganismos no que se refere aos elementos genéticos exógenos (DAVID, 1980).

Sendo assim, acredita-se que o emergente surgimento de cepas resistentes a drogas ocorreram pela pré-existência de mutações randômicas, e não simplesmente por causa de exposições anteriores ao medicamento. De fato, os antibióticos não predispõem o surgimento, mas sim a seleção das cepas resistentes (TELENTI, 1997; MARTILLA e SOINI, 2003).

O fato é que tais mutações não estão diretamente ligadas a um principio cardinal, isso é, ocorrem de forma aleatória, no que diz respeito a atual quimioterapia utilizada para a tuberculose. Pode-se citar como exemplo, mutações causando resistência concomitante a INH e RMP ao mesmo tempo, apresentando uma freqüência mutagênica de um para cada 10^8 e 10^9

replicações bacterianas, respectivamente. Dessa forma, para que se tenha o surgimento de uma cepa multi-resistente, a probabilidade desse fato ocorrer será de um para cada 10^{16} divisões celulares (MARTILLA e SOINI, 2003).

Por causa do emergente aumento de cepas resistentes aos antibióticos utilizados no tratamento a tuberculose – em especial a INH -, trabalhos vem sendo realizados nos últimos anos, objetivando melhor compreensão dos mecanismos de resistência e a identificação dos genes envolvidos. Um resumo dos principais genes ligados a produção de cepas resistentes a INH, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Genes relacionados à produção de cepas resistentes/sensíveis no *Mycobacterium tuberculosis*.

Genes Envolvidos na Resistência	Frequência de Mutações Associadas à Resistência	Mecanismo de Resistência
(I) <i>katG</i> (Catalase-Peroxidase)	29 a 100%	Sua mutação resulta em falência no processo de ativação da INH
(II) <i>kasA</i> (β -Cetoacil Sintetase)	8 a 52%	Importante chave enzimática dentro do sistema FAZ-II, para a síntese do ácido micólico
(III) <i>inhA</i> (Enoil-ACP Redutase)	21 a 34%	Expressão do gene permite a síntese do ácido micólico
(IV) <i>ahpC</i> (Alquil Hidroperóxido Redutase)	10 a 15%	Mutações podem servir apenas como marcador para lesões no <i>katG</i>
(V) <i>tbnat</i> (Arimina N-Acetil Transferase)	0 a 43%	Remoção da INH ativada do microorganismo. A mutação produz cepas sensíveis e não resistentes

Fonte: Douglas e Mcleod, 1999; Palomino et al., 2007; Kremer et al., 2002; Brennan e Nikaido, 1995.

Os genes apresentados na Tabela 5 já foram discutidos anteriormente, de forma sucinta, objetivando situar os diferentes mecanismos apresentados pelos mesmos. Na

seqüência, serão novamente comentados, de forma mais aprofundada, apenas os genes-foco do atual trabalho.

2.6.3 katG (Catalase-Peroxidase)

A enzima micobacteriana katG pertence a uma crescente classe de enzimas bacterianas conhecidas como Hidroperoxidase I ou Catalase-Peroxidase. Membros dessas classes vêm sendo isolados por uma variedade de diferentes bactérias, incluído a *Escherichia coli* B, *Bacillus stearothermophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Halobacterium halobium*, *Rhodobacter capsulatas* B10, *Streptomyces sp.* IMSNU-1, *Haloarcula marismortui*, *Synechococcus sp.*, *Penicillium simplicissimum*, *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium tuberculosis* (JOHNSSON et al., 1997). Entretanto, parte desses microorganismos não são sensíveis a INH, o que requer melhor entendimento dessa enzima em relação aos mesmos; sendo que a relação mutação *versus* produção de cepas resistentes, correlatos a esse gene e ao microorganismo em foco, já está mais do que estabelecido (CHOUCHANE et al., 2000).

O gene *katG* encontrado no *M. tuberculosis*, codifica importantes proteínas funcionais classificadas dentro da classe de enzimas katG, as quais protegem a célula da produção excessiva de peróxido de hidrogênio, em resposta ao stress oxidativo decorrente da contínua geração metabólica de subprodutos do oxigênio ou de fatores ambientais; e, dessa forma, contribuindo também para a sua sobrevivência no interior dos macrófagos e por conseguinte a produção de cepas mais virulentas (MURDER et al., 1999; HEYM et al., 1999; VILCHÈZE e JACOBS, 2007).

De acordo com Wilming e Johnsson (1999), a catalase-peroxidase tem evoluído pela duplicação do gene a partir de um ancestral peroxidase, que mostram homologia seqüencial entre si e entre outros membros da superfamília das bactérias, plantas e fungos, como o Citocromo C Peroxidase (PCC).

O superóxido (O_2^-) é gerado pela redução de elétrons simples de moléculas de oxigênio durante a respiração aeróbica, e pode reagir com outros constituintes celulares para a geração de outras Espécies de Oxigênio Reativo (ROS), como os radicais hidroxil (.OH). Bactérias aeróbicas, incluindo micobacterias saprofíticas e patogênicas, degradam O_2^- , transformando-os em água e em moléculas de oxigênio por uma ação seqüencial do Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (VINCENT et al., 2004).

Outra importante característica desse gene está associada com a susceptibilidade que o mesmo confere ao microorganismo, quando tratado com INH. Sendo assim, a análise dos

mecanismos de regulação desse gene pode contribuir para o maior conhecimento de ambas as interações no organismo do hospedeiro e as condições as quais conduzem a produção de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a INH (ZHANG et al., 1992; MURDER et al., 1999).

2.6.3.1 Características da enzima katG

O katG é uma enzima multifuncional que se apresenta em forma de homodímero ou homotetramero de aproximadamente 80 kDa, pertencentes a superfamília heme, sendo encontrados também em fungos e plantas. Ela se difere de outras catalises por possuir uma ativação peroxidase substancial sobre uma variedade de substrato (SINGH et al., 2008).

A determinação de sua estruturas cristalinas em uma cepa recombinante de *M. tuberculosis* CP (mtCP) se mostrou como um importante passo para o entendimento da ativação da enzima catalisadora na INH. Essa estrutura fornece um quadro tridimensional para racionalizar como elementos estruturais do sítio ativo dela podem contribuir para a ativação da INH (PIERATTELLI et al., 2004).

O mecanismo de catalise pode ser dividido em dois passos. No primeiro, os maquinismos de uma peroxidase ou catalase são heterologos da ligação oxigênio-oxigênio (Figura 7). Essa reação causa a liberação de uma molécula de água e direcionamento do segundo átomo de oxigênio para o centro da molécula de ferro. O resultado intermediário propiciará o rendimento de um radical cátion π porfirina oxiferril ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) o qual é chamado de Composto I (CoI). No segundo passo, o CoI reage com outras moléculas de peróxido de hidrogênio, permitindo que a enzima anterior volte ao seu estado de repouso, além da liberação equivalente de oxigênio e água (WILMING e JOHNSSON, 2001; ZÁMOCKÝ et al., 2001).

A principal diferença dos mecanismos enzimáticos entre catalase e peroxidase é o CoI redutase. No ciclo da catalase, a segunda molécula de peróxido é usada como um agente redutor pelo CoI. Esses dois elétrons reduzidos completam o ciclo formando catalase férrica (Figura 7, reação 2) e moléculas de oxigênio. No ciclo envolvendo peroxidase, há mais substratos CoI reduzido em duas etapas de elétron, através do Composto II (CoII), voltado para a enzima férrica (Figura 7, reação 3 e 4) (ZÁMOCKÝ et al., 2001).

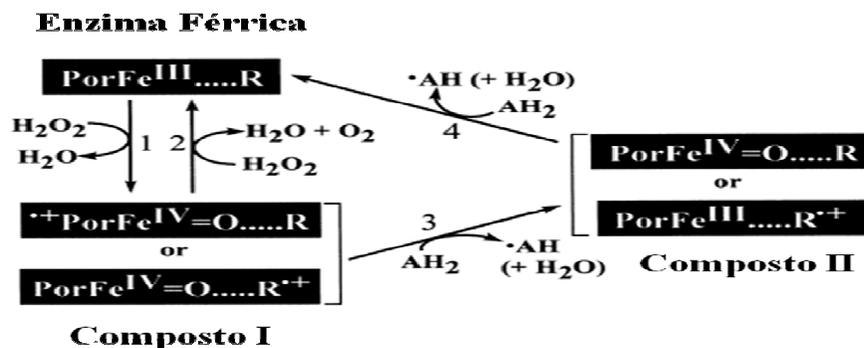


Figura 7 - Passos do mecanismo de catalase ocorrida no *M. tuberculosis*

Fonte: Zámocký M et al., 2001.

2.6.3.2 *KatG* versus Resistência Micobacteriana

Alterações no gene *katG* (Figura 8) estão associados a altos níveis de INHR em isolados clínicos de *M. tuberculosis* (VINCENT et al., 2004). Muitas dessas modificações estão ligadas a um único *locus* genético, o códon 315. Mutações pontuais nesse códon, com alteração de AGC para ACC, resultará em uma substituição da Ser por Thr, diminuindo ou anulando a produção de catalase, produzindo conseqüentemente cepas INHR. Outras mutações ocorridas no códon 315 também podem produzir características semelhantes em suas cepas (AHMAD e MOKADDAS, 2004; RAMASWAMY e MUSSER, 1998).

A ocorrência de ACC e de outras mutações no códon 315 variam consideravelmente em todo o mundo, e a elevada prevalência dessas mutações tem sido exploradas para o desenvolvimento de novas técnicas moleculares mais rápidas no diagnóstico de cepas resistentes (AHMAD e MOKADDAS, 2004).

Tem sido especulado também que deleções ou inserções raramente ocorrem no códon 315 (Figura 8), e que nem sempre essas alterações gênicas acabam por produzir cepas INHR, apesar de se observar a diminuição da síntese da catalase nesses microorganismos (PRETORIUS, 1995; RAMASWAMY e MUSSER, 1998).

Outro códon observado nessa mesma região gênica, o 463, também foi apontado como sendo responsável pela produção de cepas não responsivas ao tratamento com INH (Figura 8). Entretanto, alguns trabalhos já demonstraram que cepas sensíveis a INH também poderão apresentar mutações nesse códon, diferindo-se assim do 315 (RINDER et al., 1999).

conter até 56 carbonos, que funcionam como precursores do ácido micólico. Posteriormente, a proteína carreadora de Acil (AcpM) finaliza o crescimento de cadeias Acil, dentre outras funções (KREMER et al., 2002; SCHAEFFER et al., 2004; SWANSON, et al., 2009).

Por sua vez, a INH apresenta potencial inibitório de FAZ-II, acabando com a integridade estrutural da parede celular, mostrando-se inicialmente como uma droga bacteriostática (KREMER et al., 2002; SCHAEFFER et al., 2004).

Outro potente agente tuberculostático que tem sido recentemente estudado como inibidor natural da FAZ-II é a Tiolactomicina (TLM), agindo através da inibição da β -cetoacil-ACP sintetase (Kas) (KREMER et al., 2000).

2.6.4.1 Características do kasA

A proteína KasA (Figura 9) catalisa a condensação entre o Malonil-AcpM e a via crescente da cadeia Acil, apresentando entre os mesmos um mecanismo de *feedback* positivo, sendo esse o primeiro dos quatro passos no alongamento do ciclo dos ácidos graxos (LUCKNER et al., 2009).

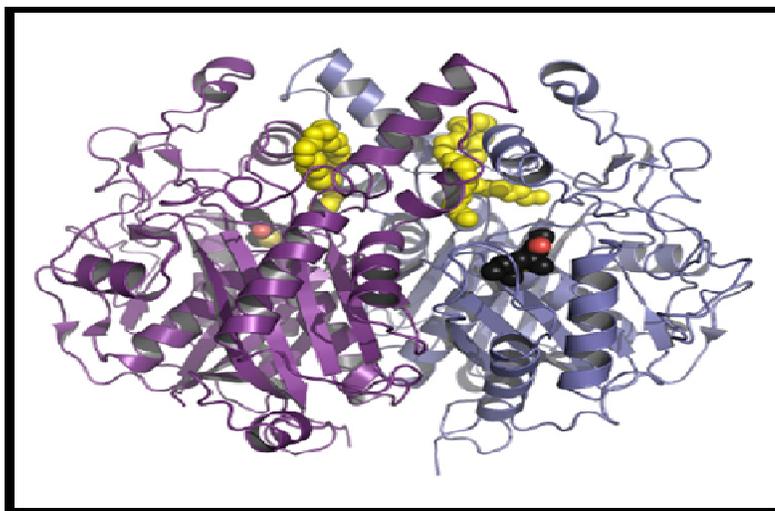


Figura 9 - Estrutura tridimensional da proteína kasA

Fonte: Luckner et al., 2009.

No primeiro passo, a cadeia Acil é transferida para o sítio de ativação da cisteína, resultando em um KasA-intermediário acetilado. Subseqüentemente, a cadeia Acil é alongada

por dois átomos de carbono derivados de um segundo substrato Malonil-AcpM em uma reação de condensação com o KasA-intermediário (LUCKNER et al., 2009).

Com base nessa linha de raciocínio, vários trabalhos investigativos sobre esse gene vêm sendo realizado, e alguns deles mostraram que o gene *kasA* é essencial para as micobactérias, pois quando o mesmo apresenta-se condicionalmente depletado, haverá a indução de lise celular e morte microbiana (BHATT et al., 2005). Outros autores também demonstraram a ação desse gene utilizando de transposons-sítios hibridizados, confirmando ser ele um importante produtor de proteínas essenciais para o crescimento desse microorganismo (SASSETTI et al., 2003; LUCKNER et al., 2009).

2.6.4.2 *kasA* versus Resistência Micobacteriana

Nesse gene, já foram identificados quatro principais mutações que podem estar diretamente ligada à produção de resistência. Sendo assim, nucleotídeos e seqüências de aminoácidos podem ser alterado nos códons 66 (GAT para AAT), 269 (GGT para AGT), 312 (GGC para AGC) e 413 (TTC para TTA) do gene *kasA* (Figura 10). Tais mutações tem sido postuladas como estando associadas com a resistência a INH porque as mesmas haviam sido encontradas em isolados de cepas INHR (SUN et al., 2007).

Desde o surgimento dessa hipótese, mutações nos códons G269S e G312S também começaram a ser encontradas não apenas em cepas INHR, mas como naquelas que também se observava determinada susceptibilidade àquele fármaco, tornando assim, seu papel como incerto na produção de resistência a INH (SUN et al., 2007).

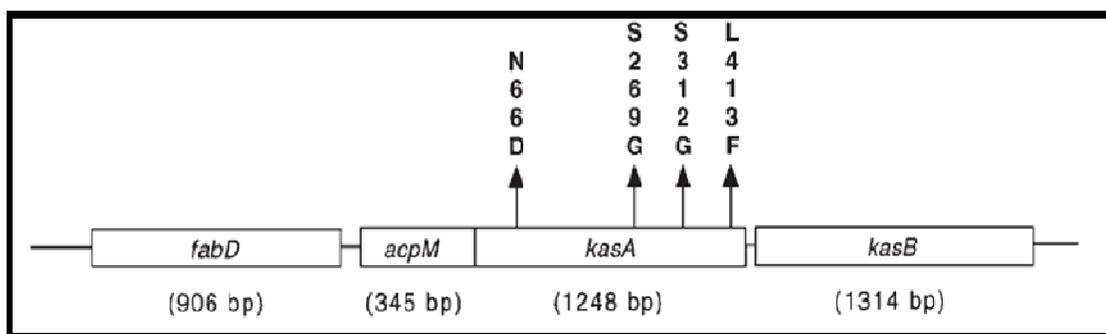


Figura 10 – Polimorfismo encontrados no gene *Kas* (A e B), no *M. tuberculosis*

Fonte: Ramaswamy e Musser, 1998.

3 Materiais e Método:

3.1 Obtenção e Seleção das cepas de *Mycobacterium tuberculosis*

Foram coletadas 104 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* resistentes e sensíveis a INH (52 de cada), selecionadas de um total de 581 isolados clínicos diagnosticados e conservados na micobacterioteca do Laboratório Central de Saúde Pública Prof. Gonçalo Muniz, do Estado da Bahia (LACEN-BA). Para a seleção de tais cepas, utilizou-se os seguintes critérios: serem microorganismos advindos de espécimes clínicos e de origem pulmonar (tuberculose pulmonar, e não ectópica); terem sido diagnosticados no ano de 2007; e se conhecer previamente os resultados do seu antibiograma (principalmente no que se diz respeito a INH).

Daquele total, 259 cepas mostraram resistência a INH, enquanto que 322 foram sensíveis a esse mesmo fármaco. Desse total, foram utilizados daquele ano 19,3% de todas as cepas INHR, e 15,5% de todas aquelas que se apresentaram sensibilidade a INH (INHS) (Figura 11).

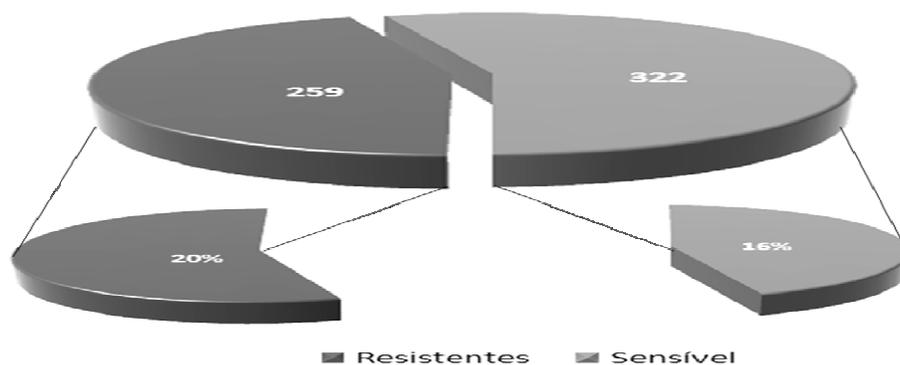


Figura 11 - Número total de cepas analisadas no ano de 2007 pelo LACEN e o percentual de cepas selecionadas no trabalho.

3.2 Cultivo, identificação e antibiograma

Após a seleção das cepas da micobacterioteca, as mesmas foram re-cultivadas e re-avaliadas. Para o cultivo e identificação adequada do *Mycobacterium tuberculosis*, foram utilizados todos os critérios preconizados pelo Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias (BRASIL, 2008). Para tanto, as cepas foram inoculadas em meio Löwenstein-Jensen (LJ), onde se realizou os testes em meio ácido p-nitrobenzóico (500µg/mL) e o de Niacina.

A resistência as diferentes drogas foi realizada utilizando-se o Método das Proporções em LJ, sendo empregadas as seguintes concentrações para cada fármaco: 0,2µg/mL de Isoniazida (INH); 40µg/mL de Rifampicina (RMP); 2µg/mL de Etambutol (EMB); e 4µg/mL de Estreptomicina (ST).

Todos os testes realizados para a obtenção final das cepas desejadas nesse estudo foram realizados no laboratório de micobacteriologia do LACEN-BA - referencia nacional em identificação e cultivo de tais microorganismos.

3.3 Técnica de Extração do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*

Após a realização do crescimento e da re-avaliação das cepas em estudo, as amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Micobacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – NB3, localizado na cidade de Salvador, Bahia, onde foi processada a extração do DNA. Para a realização deste procedimento, foi utilizado o *Mycobacterium tuberculosis* Protocols (Apêndice A) (Parish e Stoker, 2001).

3.4 Eletroforese da extração do DNA

Para verificar a integridade do DNA extraído, o mesmo foi transferido para um gel de agarose a 3% acrescido de brometo de etídio (0,5µL/mL), corrido em uma cuba de eletroforese e submetidas a uma corrente de 100V por 20 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador da marca Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System* - EDAS 120), empregando luz ultravioleta (UV).

3.5 Quantificação do DNA das amostras

O DNA extraído foi diluído a 1:70 e quantificado por leitura de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro gene-QuantII (Pharmacia Biotech) no comprimento de onda $\lambda = 260$ nm.

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O método de PCR foi padronizado e processado utilizando as diluições e concentrações, como apresentado na Tabela 6.

Essa técnica foi empregada para a amplificação dos códons 315 do gene *katG* e 269 do genes *kasA*, para que seu produto final fosse utilizado na reação subsequente, o Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP). O protocolo e os ciclos do PCR estão detalhadamente explicados nas Tabelas 6 e 7. Os desenhos dos primers estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 6 - Esquema utilizado para a realização do PCR.

Reagentes	Concentração Final	Quantidade para 1A*
Água	-	16,55 μ L
Tampão da <i>Taq</i>	1X	2,5 μ L
MgCl ₂	1.5 mM	0,75 μ L
dNTPs	0.2 mM	2,0 μ L
Primer F	1 pM/ μ L	1,0 μ L
Primer R	1 pM/ μ L	1,0 μ L
<i>Taq</i> Polimerase	1U	0,20 μ L
DNA	50 a 300 ng/ μ L	0,5 μ L

*1A= 01 amostra

Tabela 7 - Passos utilizados para a amplificação do fragmento de interesse.

PASSOS	<i>katG</i>	<i>kasA</i>
Desnaturação 1	94 °C por 4 minutos	94 °C por 5 minutos
Desnaturação 2	94 °C por 1 minuto	94 °C por 1 minuto
Anelamento	59,7 °C por 1 minuto	60,3 °C por 1 minuto
Extensão	72 °C por 1 minuto	72 °C por 1 minuto
Extensão Final	72 °C por 4 minutos	72 °C por 4 minutos
Hold (quando necessário)	15 °C por tempo indeterminado	15 °C por tempo indeterminado

30 Ciclos

35 Ciclos

3.7 Eletroforese das ampliações

Após a amplificação, a qualidade do fragmento de DNA foi avaliada em cuba de eletroforese contendo gel de agarose a 3% acrescido de brometo de etídio (0,5µL/mL), submetidas a uma corrente de 100V por 20 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System - EDAS 120*), empregando luz UV.

3.8 Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (RFLP)

Após a obtenção do amplificado, foram utilizadas diferentes enzimas de restrição, sendo que para o códon 315 do gene *katG*, foram utilizadas as enzimas MspI e SatI, enquanto que para o códon 269 do gene *kasA*, utilizou-se apenas a MspI.

As características de cada uma das enzimas estão apontadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Características peculiares dos Primers e das Enzimas de Restrição utilizadas no atual trabalho.

Gene	Primer	Fragmento*	Enzima	Mutação
katG	F 5' – 3' AGCTCGTATGGCACCGGAAC R 5' – 3' TTGACCTCCCACCCGACTTG	620pb	MspI	315 AGC→ACC
				315 AGC→GGC
			SatI	315 AGC→ACC
				315 AGC→AAC 315 AGC→ACA 315 AGC→GGC
kasA	F 5' – 3' - TCCATGATGCGGGCCAT R 5' - 3' - AGCTCCAGCGAGCGAGTCAT	263pb	MspI	269 GGT→AGT

* Frag.: Tamanho do fragmento do PCR.

As reações (mix) do RFLP foram realizadas conforme apresentadas na Tabela 9:

Tabela 9 - Reagentes utilizados para o preparo da reação (mix) de RFLP.

Reagente	Concentração Final	Quantidade para 1A*
Água Ultra Pura	-	3,5 µL
Tampão da Enzima	1X	2,5 µL
Enzima de Restrição	5.000U/ml	0,25 µL

*1A= 01 amostra

Após o preparado, foram distribuídas alíquotas contendo 6,25 μL em cada mix, para cada microtubo com 20 μL do amplificado da PCR. Em seguida, o mesmo foi levado ao banho-maria com temperatura regulada em 37 °C, variando o tempo para cada uma das enzimas, como apresentado pela Tabela 10.

Tabela 10 - Diferentes tempos utilizados para cada reação (RFLP).

Gene	Enzima	Tempo de Incubação
KatG	MspI	5 horas
KatG	SatI	16 horas
KasA	MspI	5 horas

3.9 Eletroforese das restrições e sua análise

Após a restrição, os fragmentos de DNA foram corridos em gel de agarose a 3% acrescido de brometo de etídio (0,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$), em cuba de eletroforese e submetidos a uma corrente de 95 Volts por 40 minutos. O gel foi fotografado em fotodocumentador Kodak Digital (*Science Electrophoresis Documentation Analysis System* - EDAS 120), empregando luz UV.

Para a análise do gel, observou-se o peso molecular dos fragmentos resultantes, diferenciando as amostras em cepas selvagens ou mutantes. Tal avaliação normalmente é de fácil reconhecimento, de acordo com Marttila e Soini (2003), pois após a fragmentação dos amplicons com a enzima, as mesmas irão apresentar pesos moleculares e padrões de corridas bem diferenciados (Figuras 12 e 13).

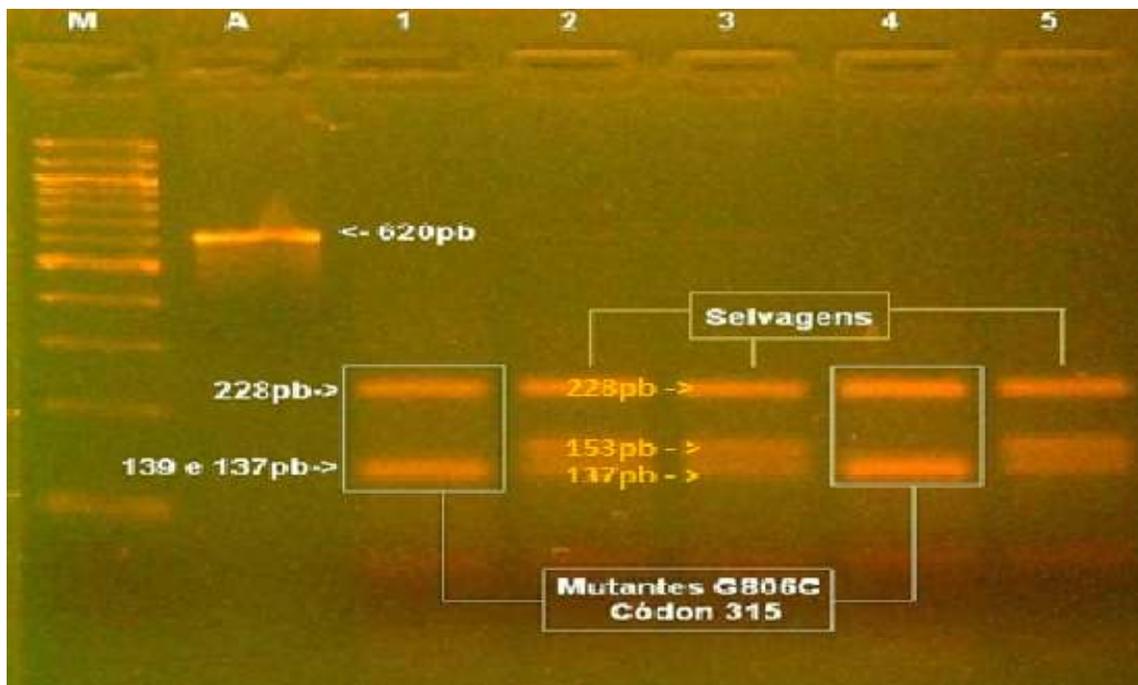


Figura 12 - RFLP do códon 315 do gene *katG*, mostrando cepas selvagens e mutantes, onde M (Marcador de 100pb); A (Amplificado – PCR).

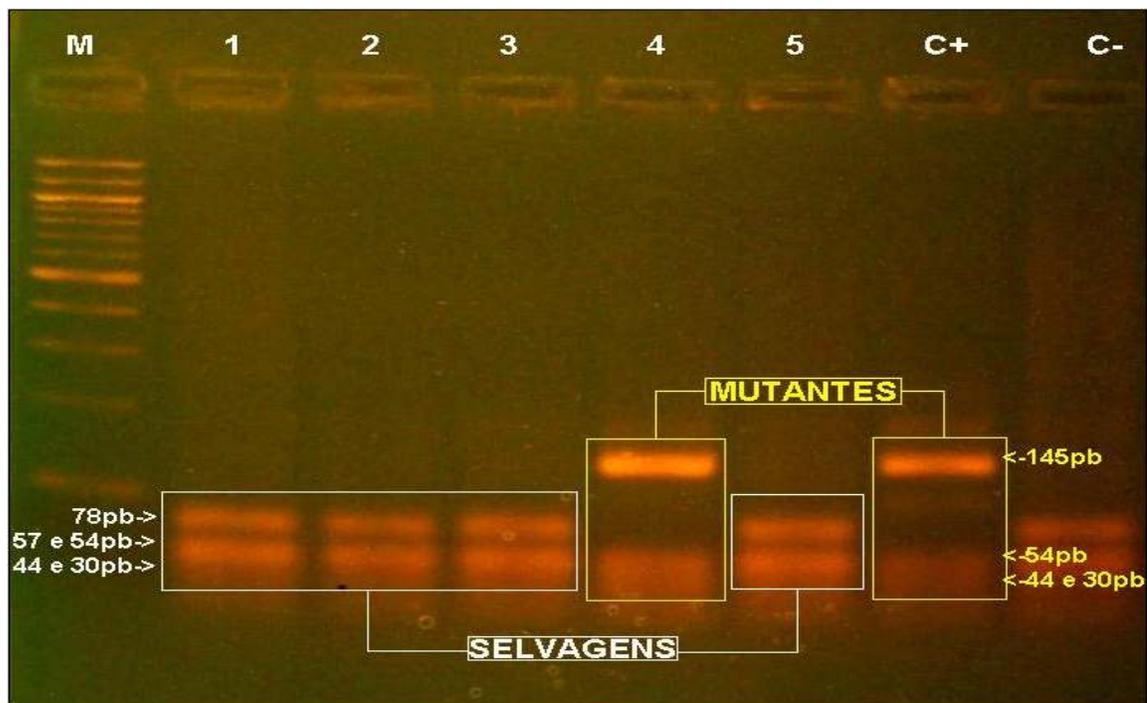


Figura 13 - RFLP do códon 269 do gene *kasA*, mostrando cepas selvagens e mutantes, onde M (Marcador de 100pb); C- (Controle Negativo); C+(Controle Positivo).

3.10 Avaliação estatística dos dados

Todos os resultados (realizados em duplicata) foram plotados em tabela de Microsoft Office Excel® e analisados com auxílio da ferramenta estatística SPSS®, versão 10.

De acordo com cada resultado encontrado, utilizou-se diferentes testes estatísticos: Qui-Quadrado, Odds Ratio e Coeficiente de Contingência; cuja aplicação, dependendo das condições de cada avaliação, ocorreu isoladamente ou em conjunto.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Gene *katG*

4.1.1 Enzimas de restrição

De todas as cepas de *M. tuberculosis* analisadas, 46,2% apresentaram-se restringidas (mutantes) quando utilizada a enzima *SatI*, sendo esse mesmo valor encontrado para a *MspI*. Analisando os dados comparativos encontrados nesse trabalho, percebe-se que não existe diferença da frequência de mutação entre as mesmas.

Conhecendo-se as mutações que podem ser identificadas pelas enzimas utilizadas nesse trabalho (como apresentadas na Tabela 8) e associando isso à análise dos dados, pode-se afirmar que as cepas mutantes apresentam apenas duas possíveis mutações (AGC-ACC e/ou AGC-GGC) para as enzimas utilizadas. As outras duas mutações que são identificadas apenas pela *SatI* (AGC-AAC e AGC-ACA) possivelmente apresentam frequência baixa ou inexistente para a população de cepas de *M. tuberculosis* isolados no estado da Bahia, pois nenhuma daquelas selecionadas apresentou tais alterações.

Em outro trabalho realizado na Espanha, os resultados foram divergentes quando comparados com os do atual, pois a enzima *MspI* apontou uma frequência mutacional de 43,8%, enquanto que 49,5% (5,7% a mais) das cepas mutantes foram identificadas utilizando a enzima *SatI*, sendo esta última mais eficaz para aquele grupo amostral (HERRERA-LÉON *et al.*, 2005).

Em trabalho realizado no Kuwait, Dubai e Beirut, pesquisaram essa mutação utilizando outra enzima além da *MspI*, a *MspAII*. Encontraram uma frequência de 60% para a primeira, e 65% para a segunda. De acordo com os autores, a enzima *MspAII* se mostrou mais eficiente na identificação de mutações quando comparada com a primeira, e que a

mesma é capaz de identificar todas as alterações observadas na região AGC (com exceção da AGC-CGC), incluído aquelas apontadas pela MspI (AHMAD e MOKADDAS, 2004).

4.1.2 Análise de frequência de mutação do gene *katG* em cepas resistentes e sensíveis a INH e a outros fármacos

4.1.2.1 *KatG* versus INH

De todas as análises realizadas com as amostras que apresentaram resistência a INH, 53,8% (28) se mostraram selvagens, enquanto que os 46,2% (24) restantes apresentaram mutação no códon 315 do gene *katG*. Além disso, todas as cepas que foram sensíveis a INH não continham mutação nesse códon (Figura 14).

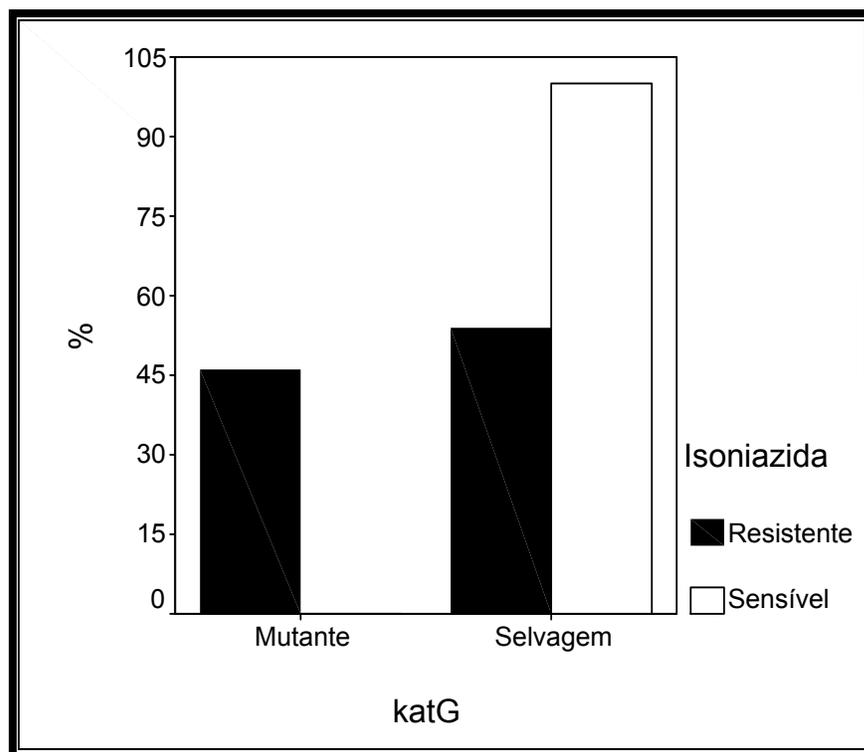


Figura 14 - Frequência de mutação no códon 315 do gene *katG* e sua relação com a produção de cepas resistentes a INH.

A análise comparativa entre o grupo das cepas resistentes/mutantes com aquelas sensíveis/mutantes foi realizada para observar se existia diferença significativa entre os dois grupos, e para tal, foi utilizado o teste de Qui-Quadrado (χ^2). Os resultados mostram haver diferença significativa entre esses dois grupos quando analisados, obtendo um p-valor menor do que 0,01. Sendo assim, os dados evidenciam que existe uma relação direta entre o aparecimento da mutação no gene *katG* e o surgimento de cepas INHR, podendo assim afirmar, que esse gene funciona como um bom marcador para a identificação de cepas não responsivas a INH.

No Brasil, o número de artigos nos últimos dez anos sobre o tema ainda é pequeno. (Tabela 11). Comparando as frequências observadas no atual trabalho (46,2%) com aquelas encontradas em outras publicações, percebe-se ser essa a menor taxa já encontrada nesse país.

Título 11 - Publicações sobre frequência do gene *katG*, realizadas no Brasil, nos últimos dez anos

Ano de Publicação	Autor	Estados	Número Amostral	Frequência de Mutação
2000	Ferrazoli <i>et al.</i>	São Paulo	293	88,8%
2003	Silva <i>et al.</i>	Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo	69	87,15%, 60,9% e 60%
2004	Cardoso <i>et al.</i>	Paraná e São Paulo	97	61,9%
2005	Höfling <i>et al.</i>	São Paulo	48	60,4%
2008	Clemente <i>et al.</i>	Minas Gerais	21	70%
2009	Cecon	São Paulo	125	68,4%
2009	Siqueira <i>et al.</i>	Brasília	97	85,5%

Outras publicações encontradas ao redor do mundo corroboram com os dados encontrados nessa pesquisa, observando frequências menores que 50% de mutantes. Na Itália esse achado foi de 38,5% (com um número amostral igual a 13) (RINDER *et al.*, 1999);

47,1% (25) no Egito (ABBADI *et al.*, 2008); 43,8% (297) na Espanha (HERRERA-LÉON *et al.*, 2005); 46% (13) em países do continente Sul Africano (POST *et al.*, 2004); e 46 % (403) em amostras coletadas nas mais diferentes localidades, como Austrália, Colômbia, Índia, México, cidade de Nova York, Espanha e Texas (HAZBÓN *et al.*, 2006). Contudo, em outras publicações sobre o assunto, tal frequência tende a ser maior que 75% (Figura 14 e Apêndice B), obtendo frequências que chegam a 100% na Turquia (DURMAZ *et al.*, 2003); no Canadá (BLACKWOOD *et al.* 2003), e na França (ELIA-PASQUET *et al.*, 2000).

Contabilizando os resultados de todos as 66 publicações que abordavam o mesmo tema (Apêndice B e Figura 15), observa-se que aproximadamente 12% (08) delas apresentaram mutação no gene *katG* com frequência menor que 50%; 27% (18) com mutação entre 51% e 75%; e 61% (40) cuja frequência variava entre 76 e 100%. Analisando esses dados, percebe-se que a frequência de mutação identificada pelo atual trabalho está entre aquelas que apresentam menor percentual em todo o mundo.

Essas diferenças numéricas se devem a vários fatores, como as diversas técnicas aplicadas para a identificação das mutações (RFLP, SSCP, Multiplex PCR, Sequenciamento, Spoligotyping e Hibridização), o número de cepas analisadas em cada trabalho ou até mesmo as características peculiares relacionadas à região/população de microorganismos estudados.

Essa baixa frequência mutacional também sugere trabalhos complementares, principalmente no que se refere à análise de outros genes apontados como responsáveis pela produção de cepas INHR (*inhA*, *ahpC*, *tbnat...*), buscando elucidar quais deles poderiam estar diretamente relacionados com a produção dessas cepas, sem que tivessem necessariamente mutação no gene *katG*. As frequências de mutação desses outros genes tendem a ser muito menores quando comparadas com a encontrada no *katG* (SILVA *et al.*, 2003; RAMASWAMI e MUSSER, 1998; KIEPIELA *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2003; UNISSA *et al.*, 2007; HERRERA *et al.*, 2004; SKOTNIKOVA *et al.*, 2003). Entretanto, como essa taxa de mutação foi relativamente baixa nesse estudo, tal achado faz pensar que as frequências mutacionais dos outros genes podem estar mais elevadas quando comparadas ao encontrado em outros trabalhos. No entanto, apenas pesquisas complementares posteriores poderão comprovar essa hipótese.

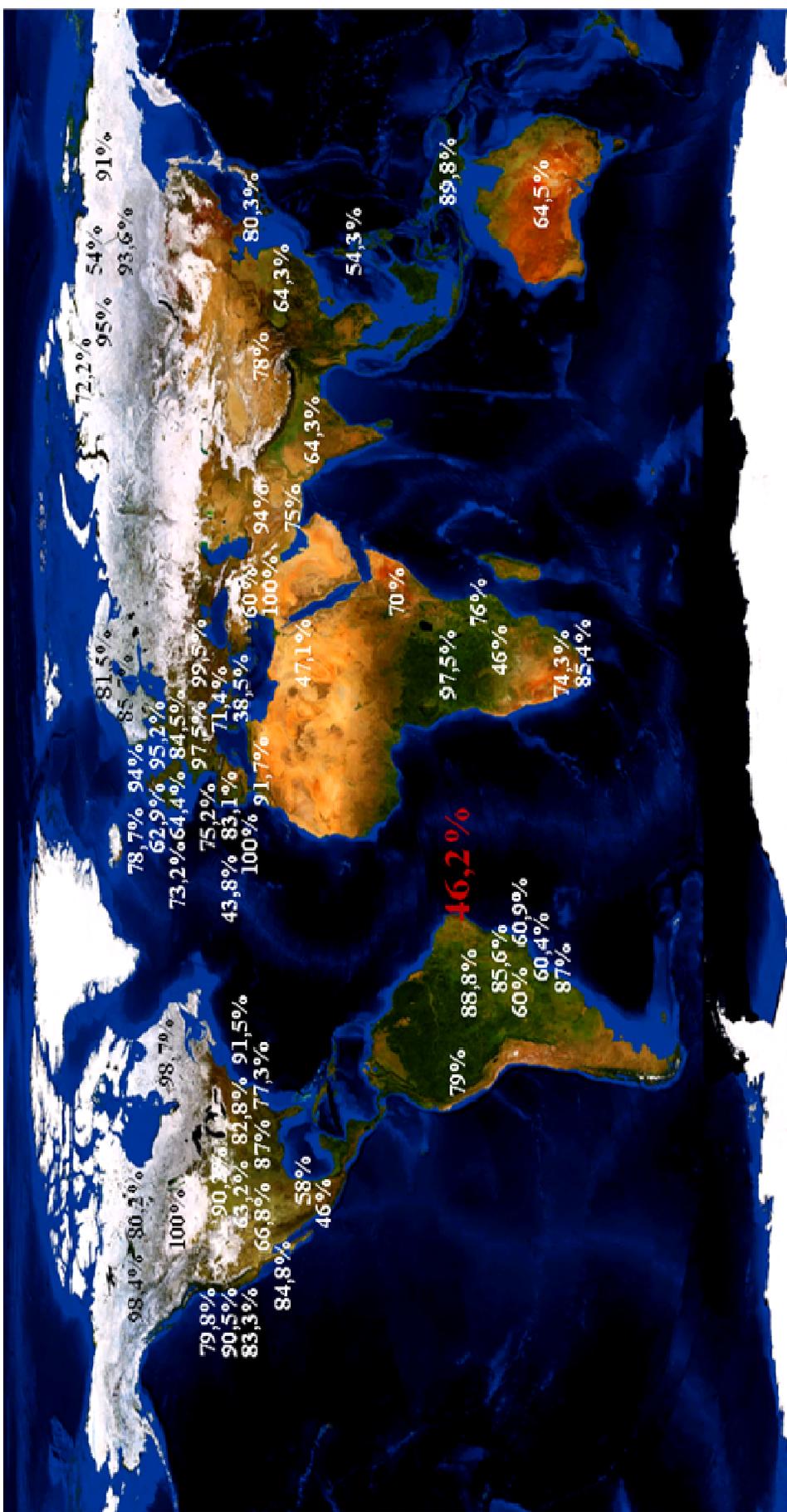


Figura 15 - Distribuição da frequência da mutação do gene *kaiG* no mundo.

4.1.2.2 *KatG* versus RMP

A mutação no gene *katG* esteve associado a resistência a RMP em 48,8% (20) das cepas classificadas como resistentes/mutantes, enquanto que 51,2% (21) delas apresentavam resistência a esse quimioterápico, contudo não traziam nenhuma mutação nesse códon. Avaliando, por sua vez, as cepas sensíveis a RMP, apenas 6,3% (4) delas tinham mutação no códon 315, enquanto que os 93,7% (59) restantes eram selvagens (Figura 16).

Comparando os grupos resistentes/mutantes daqueles sensíveis/mutantes para RMP, o p-valor do teste de χ^2 foi de 0,01, mostrando que há diferença significativa entre os dois grupos, existindo então relação direta de dependência entre mutação no códon 315 do gene *katG* com o aparecimento de cepas resistentes a RMP. Além disso, a análise realizada com Odds Ratio (OR) corrobora com os resultados apontados por χ^2 , além de demonstrar que a probabilidade de se ter uma cepa resistente a RMP e mutante para o gene *katG* é 14 (4,3 - 45,8) vezes maior do que a produção de uma cepa sensível/mutante.

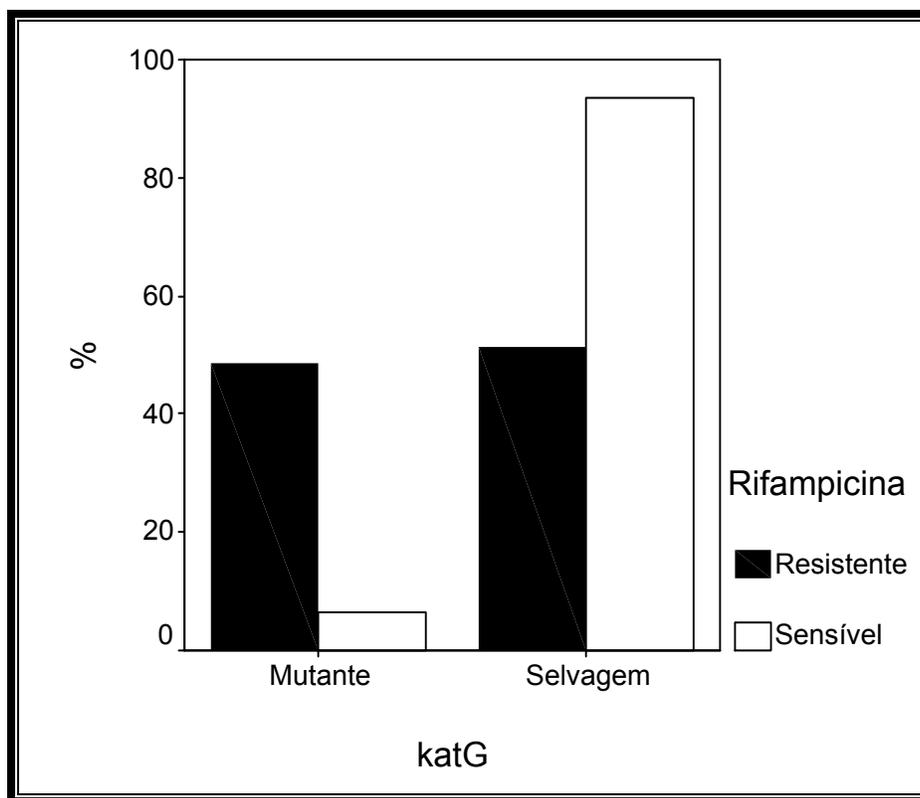


Figura 16 - Frequência de mutação no códon 315 do gene *katG* e sua relação com a produção de cepas resistentes a RMP.

4.1.2.3 *KatG* versus EMB

Na seqüência, foi avaliada a relação de dependência entre mutação no códon 315 do gene *katG* com a produção de cepas resistentes a EMB. Analisando os dados, observou-se que 50% (14) das cepas estudadas que apresentavam resistência a EMB, tinham mutação no códon 315. Por outro lado, analisando aquelas que apresentaram sensibilidade ao fármaco, apenas 13,2% (10) delas são mutantes, enquanto que a maioria, 86,8% (66), se mostrou selvagens (Figura 17).

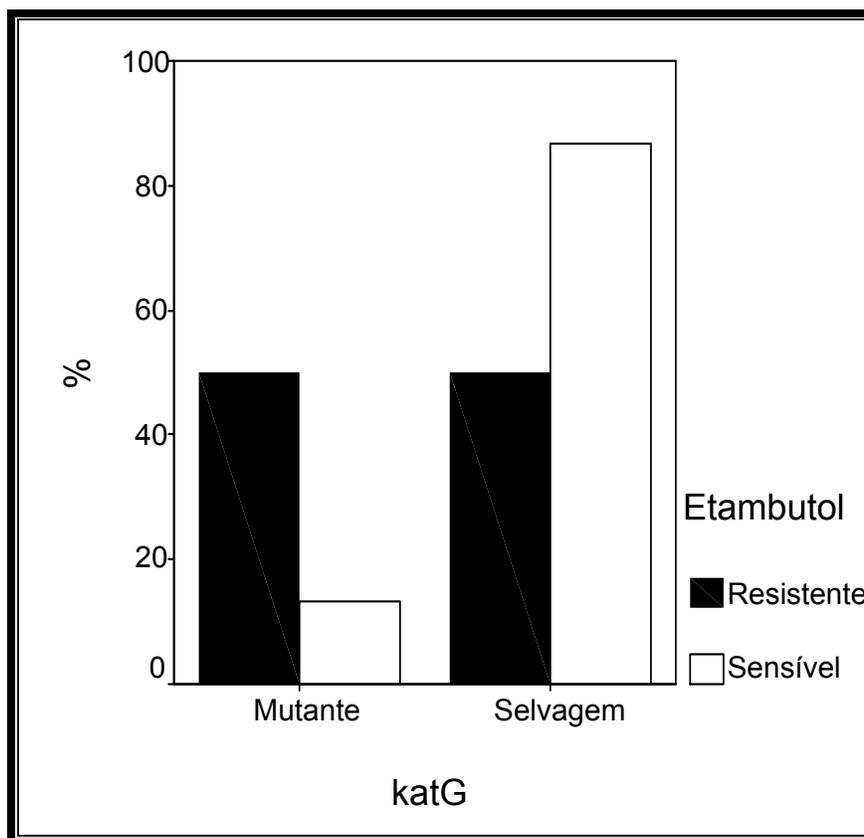


Figura 17 - Frequência de mutação no códon 315 do gene *katG* e sua relação com a produção de cepas resistentes a EMB.

O teste de χ^2 obteve um p-valor inferior a 0,01, quando comparados os grupos resistente/mutante e sensível/mutante, demonstrando haver diferença significativa entre os mesmos, sendo esses dados corroborados com a avaliação de OR. Além disso, o OR sugere

que a probabilidade de se ter uma cepa resistente e mutante ao mesmo tempo seja 6,6 (2,4 – 17,8) vezes maior do que aquelas que apresentem o fenótipo de sensibilidade e o genótipo mutante. Sendo assim, pode-se afirmar com esses dados, que existe relação direta entre mutação no códon 315 do gene *katG* e o surgimento de cepas não apenas resistentes a INH, como também a EMB.

4.1.2.4 *KatG* versus ST

Para a ST, por sua vez, o mesmo questionamento foi realizado, procurando elucidar a existência da relação de dependência entre a mutação no *katG* e o aparecimento de cepas resistentes a esse quimioterápico. Dessa forma, foi observado que 36,7% (11) das cepas se mostraram resistentes/mutantes, enquanto que as outras 63,3% (19) eram resistentes, mesmo não havendo mutação no gene em foco. Das cepas sensíveis, por sua vez, 23,1% (24) delas tinham mutação, enquanto que 76,9% (80) foram selvagens (Figura 18).

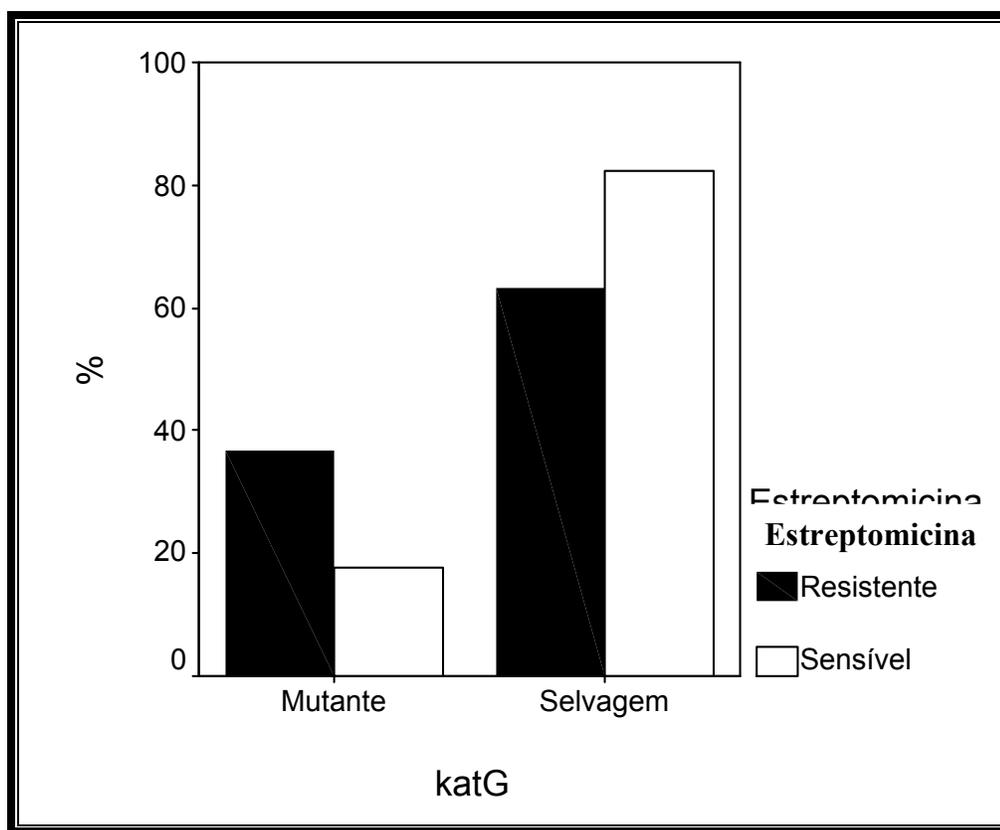


Figura 18 - Frequência de mutação no códon 315 do gene *katG* e sua relação com a produção de cepas resistentes a ST.

Ao analisar os grupos resistente/mutante e sensível/mutante com o teste de χ^2 , o p-valor foi inferior a 0,036, mostrando ainda haver relação de dependência entre os grupos. OR corrobora novamente com os resultados analisados por χ^2 , e afirma que a probabilidade de se ter uma cepa resistente/mutante é de 2,7 (1,04 – 7,0) vezes maior do que dessa mesma cepa ser sensível/mutante. Sendo assim, existe ligação entre mutação no *katG* e produção de cepas resistentes a ST.

4.1.3 Análises da mutação em *katG* associado a produção de resistência a INH e aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB

Observando os resultados encontrados, conclui-se que todas as cepas mutantes para o gene *katG* obrigatoriamente produzirão resistência a INH. Isso se justifica pela alteração tridimensional da proteína *katG*, responsável pela produção da catalase-peroxidase - enzima responsável pela ativação desse fármaco.

Avaliando a relação entre mutação em *katG* e o surgimento de resistência a outros quimioterápicos, conclui-se também haver dependência entre esses dois eventos. Analisando em ordem de grandeza esses achados, percebe-se que a probabilidade de se ter mutação no gene *katG* e de se produzir uma cepa resistente a RMP é 14 vezes maior, quando comparada a produção de cepas mutantes/sensíveis; de 6,6 vezes para a produção de resistência a EMB; e 2,7 vezes, para a ST.

É importante ressaltar, que os mesmos questionamentos e avaliações mostrados anteriormente também foram testados para a ETH e PZA, mas ambas mostraram que tanto para o teste de χ^2 (com p-valor > 0,05) como para OR (apresentando a variável 1), não existia diferença significativa entre os grupos resistente/mutante e sensível/mutante, provando então não haver relação entre o surgimento do fenótipo de resistência associado à mutação do gene *katG*. Contudo, em outro trabalho onde foram analisadas 41 cepas resistentes à ETH coletadas em diferentes países (21 dos USA, 6 da Rússia e 6 do Brasil), observou-se haver relação direta entre a mutação do códon 315 com o aparecimento da resistência à aquele fármaco, onde 37% (15) dos microorganismos analisados classificaram-se como resistentes/mutantes (MORLOCK *et al.*, 2003). Vale relatar, que os autores não apresentam nenhuma explicação plausível para justificar esse achado.

Além disso, foi observado que nenhuma outra publicação fez análise dessa relação entre o surgimento de mutação no gene *katG* e o aparecimento de cepas resistentes a outros fármacos, como a RMP, EMB e ST.

4.2 Gene *kasA*

4.2.1 *kasA* versus INH

O mesmo questionamento utilizado anteriormente para o códon 315 foi realizado para o códon 269 (GGT-AGT), só que dessa vez, do gene *kasA*. A associação e correlação entre o surgimento da mutação desse gene com a produção de cepas resistentes a INH e a outros fármacos se mostram importantes, principalmente por conta da dúbia funcionalidade do mesmo, quando correlato com a produção de resistência. Alguns dos trabalhos publicados na atualidade colocam em cheque a capacidade do gene mutante ser responsável pela produção de resistência, principalmente no que se refere à INH (CARDOSO *et al.*, 2004; HAZBÓN *et al.* 2006; LEE *et al.*, 1999; UNISSA *et al.*, 2008).

Correlacionando a mutação em *kasA* com a produção de cepas resistentes a INH, pode-se observar que 34,6% (18) das mesmas foram mutantes, sendo que 65,4% (34) delas foram selvagens. Por sua vez, analisando as cepas sensíveis à aquele fármaco, observou-se que 46,2% (24) eram mutantes, enquanto que 53,8% (28) foram selvagens.

Analisados os grupos resistentes/mutantes e sensíveis/mutantes com o teste do χ^2 , o p-valor foi de 0,230, mostrando que não existe diferença significativa entre os mesmos, isso é, o surgimento de mutação no gene *kasA* não é indicativo de sensibilidade ou resistência para a INH. Por sua vez, o OR de 0,62 (0,280 – 1,361) confirma as análises de χ^2 , apresentando a variável 1 em sua análise, afirmando com isso que o grupo das cepas resistentes/mutantes e sensíveis/mutantes não se diferem (Tabela 12).

Quando avaliados para os outros fármacos (RMP, EMB, PZA, ST e ETH), tanto o p-valor de χ^2 , quanto os valores encontrados em OR demonstram não haver relação de dependência direta entre a produção de cepas resistentes, quando o genótipo for mutante (Tabela 12). Sendo assim, o gene *kasA* não se mostra um bom marcador para a identificação de cepas resistentes à INH, bem como para nenhum outro fármaco utilizado atualmente no tratamento da tuberculose. Além disso, o percentual de mutação foi maior em cepas INHS do que naquelas INHR.

Tabela 12: Análise da relação entre mutação em *kasA* e produção de cepas resistentes aos quimioterápicos utilizados para o tratamento da TB.

Fármaco	<i>kasA</i> n (%)		OR (IC 95%)	<i>p</i> -valor de χ^2
	Selvagem	Mutante		
Isoniazida				
Sensível	28 (53,8)	24 (46,2)	1	–
Resistente	34 (65,4)	18 (34,6)	0,62 (0,28 - 1,36)	0,23
Rifampicina				
Sensível	36 (57,1)	27 (42,9)	1	–
Resistente	26 (63,4)	15 (36,6)	0,77 (0,34 - 1,72)	0,524
Pirazinamida				
Sensível	59 (58,4)	42 (41,6)	1	–
Resistente	3 (100)	0 (0)	–	0,271*
Etambutol				
Sensível	48 (63,2)	28 (36,8)	1	–
Resistente	14 (50,0)	14 (50,0)	1,71 (0,71 - 4,11)	0,225
Etionamida				
Sensível	58 (58,6)	41 (41,4)	1	–
Resistente	4 (80,0)	1 (20,0)	0,35 (0,04 - 3,28)	0,646*
Estreptomicina				
Sensível	42 (56,8)	32 (43,2)	1	–
Resistente	20 (66,7)	10 (33,3)	0,65 (0,27 - 1,59)	0,351

Outros trabalhos corroboram com os resultados encontrados no atual, como aquele realizado em cepas isoladas dos estados de São Paulo e Paraná (Brasil), onde se notificou uma frequência mutacional de 13,4% (97) em cepas INHR e 25% (60) INHS (CARDOSO *et al.*, 2004). Em diferentes artigos publicados nos demais países, resultados não muito discrepantes são observados. Em um desses estudos, foram analisadas 608 cepas INHS com 16% de

mutação e 403 INHR com apenas 11%. Tais amostras foram coletadas em diferentes regiões do mundo (HAZBÓN *et al.*, 2006). Em Singapura, foram analisadas 160 amostras INHR com frequência de 10% e 32 INHS com 19% de mutantes (LEE *et al.*, 1999). Em trabalho recentemente publicado, foram analisadas 25 amostras INHR coletadas da Índia, mas não se observou mutação em nenhuma delas. Cepas sensíveis não foram testadas nesse estudo (UNISSA *et al.*, 2007).

4.2.2 Análises da mutação em *kasA* associado a produção de resistência aos outros quimioterápicos utilizados no tratamento da TB

Todos esses resultados revogam aqueles trabalhos que afirmam ter a INH o papel de inibição do FAZ-II, regulada pelo gene *kasA*, acreditando-se ser esse um importante gene marcador de cepas resistentes a aquele quimioterápico (KREMER *et al.*, 2002; SCHAEFFER *et al.*, 2004). Vale ressaltar ainda que, Kremer *et al.* em seu trabalho revisado e publicado em 2003, revidam as informações dadas pelo seu próprio grupo no ano anterior e afirmam que a INH não atua diretamente no *kasA* como alvo, e sim o gene *inhA*, sendo esse último o real responsável pela produção de cepas resistentes não apenas a INH, como também ao EMB.

Outro trabalho sugere que mutações no gene *kasA*, tanto para o códon 269 quanto para o 312, não estejam diretamente relacionadas a produção de cepas resistentes à INH, contudo podem representar uma seqüência de polimorfismo associados a grupos de diferentes linhagens. De acordo com os mesmos autores, mutações no códon G312S possivelmente estejam ligadas a identificação de linhagem Africana-Indiana-Leste (do inglês *East-African-Indian*, EAI), enquanto que o G269S esteja relacionado com a família T do *M. tuberculosis* (T1 a T4, que representam subclassificações de genótipos antigos desse microorganismo). Sendo assim, esse gene funciona melhor como marcador para diferentes famílias do *M. tuberculosis*, e não como responsável por produção de cepas resistentes (SUN *et al.*, 2007).

4.3 Teste de dependência entre os fármacos

Foram realizadas análises para verificar o grau de dependência entre os fármacos utilizados para o tratamento da TB, para saber se essa dependência tem ligação direta com a associação entre mutação do gene *katG* e RMP, *katG* e EMB, e *katG* e ST, como discutidas

anteriormente. Dessa forma, foi analisado o nível de relação entre a INH e os diferentes quimioterápicos.

A lógica de associação entre os fármacos se deu com base na atual conduta medicamentosa utilizada para o tratamento da TB (Tabela 03).

Analisando esses esquemas e os resultados de associação entre mutações no *katG* e outras drogas (que não a INH), fez-se pensar numa possível relação de dependência entre tais fármacos, e a produção de cepas resistentes aos mesmos, por conta da conduta medicamentosa utilizada (por se tratar de uma politerapia, e não de monoterapia). Nenhum daqueles trabalhos revisados aqui apresenta esse tipo de análise, dificultando a comparação dos resultados encontrados com os de outros grupos de cepas de *M. tuberculosis* MDR.

4.3.1 INH *versus* RMP

Na primeira análise, relacionou-se o nível de dependência entre INH e RMP. De todas aquelas amostras que apresentavam resistência a INH (52), 78,8% (41) também eram resistentes a RMP. O restante desse total (21,2%) se mostrou apenas resistente a INH. Em contrapartida, das 52 amostras analisadas que eram sensíveis a esse fármaco, 100% (52) delas também foram sensíveis a RMP (Tabela 13).

Através da análise com o teste de χ^2 , pode-se observar que existe uma relação de dependência entre os grupos de cepas resistentes a INH *versus* resistentes a RMP (p-valor < 0,05). Além disso, a realização da análise através do Coeficiente de Contingência (CC) corroborou com aquele resultado apontado por χ^2 , apresentando um valor igual a 0,628. O CC possui um intervalo, que varia de zero a um (0 – 1), sendo que quanto mais próximo a zero, menor será a relação entre os grupos comparados, e quanto mais próximo a um, maior será essa relação.

Esses dados demonstram então que, quando se tem uma cepa resistente a INH existe uma alta probabilidade desse mesmo microorganismo ser também resistente a RMP, e isso possivelmente se deve ao Esquema I de tratamento utilizado atualmente no Brasil. Vale lembrar que, ambos os fármacos são administrados concomitantemente e que o período de administração dos mesmos é de seis meses, o que aumenta a probabilidade de seleção de cepas MDR-TB.

Tabela 13: Relação de dependência entre INH e RMP.

		Rifampicina		Total
		Resistente	Sensível	
Isoniazida	Resistente	41	11	52
		78,8%	21,2%	100%
	Sensível		52	52
			100%	100%
Total		41	63	104
		39,4%	60,6%	100%

4.3.2 INH *versus* EMB

Na seqüência, foi avaliado o grau de relação entre INH e EMB. De acordo com a análise dos dados, observou-se que 53,8% (28) dos microorganismos que apresentaram resistência a INH, também foram resistentes a EMB, sendo que os 46,2% (24) restantes foram resistentes a aquele fármaco, mas sensível a este. Ao analisar as cepas sensíveis a INH, por sua vez, observou-se que todas elas (100%) também eram sensíveis a EMB (Tabela 14).

Analisando esses dados com o teste de χ^2 , e comparando os grupos de cepas resistentes a INH *versus* resistentes a EMB, observou-se que existe relação de dependência entre os fármacos (p -valor $< 0,05$), sendo esse resultado corroborado com a análise realizada pelo CC, obtendo um valor de 0,519.

Esses valores demonstram existir relação de dependência entre os quimioterápicos analisados, sendo menor quando comparada com INH e RMP. Entretanto, observa-se que essa dependência continua sendo elevada, e isso possivelmente se deve ao Esquema IR, onde são utilizados tanto a INH quanto o EMB durante todos os seis meses de tratamento.

Tabela 14: Relação de dependência entre INH e EMB.

		Etambutol		Total
		Resistente	Sensível	
Isoniazida	Resistente	28	24	52
		53,8%	46,2%	100%
	Sensível		52	52
			100%	100%
Total		41	76	104
		26,9%	73,1%	100%

4.3.3 INH *versus* ST

A relação de dependência entre esses dois antibióticos também foi realizada. Observou-se que 48,1% (25) das cepas que eram resistentes a INH, era igualmente resistente a ST, sendo que 51,9% (27) delas eram sensíveis a este fármaco, mas tinha resistência à aquele. Por sua vez, 90,4% (47) de todas aquelas cepas analisadas foram sensíveis a ambos os fármacos, sendo que apenas 9,6% (5) apresentavam resistência a ST somente (Tabela 15).

Analisando esses dados, com o auxílio de χ^2 (p-valor < 0,05), observou-se que existia relação de dependência entre os antibióticos, quando comparados grupos de cepas resistentes a INH *versus* resistentes a ST. Além disso, o CC apresentou um valor de 0,391, corroborando com o resultado analisado por χ^2 , demonstrando que há relação de dependência, mas ela é menor quando comparada com a mesma associação entre INH e os outros dois quimioterápicos analisados anteriormente.

Por fim, o OR também pôde ser utilizado como ferramenta estatística, pois nenhuma das lacunas foi nula nessa relação, confirmando os resultados apontados pelos dois outros testes estatísticos, e afirmando ainda que a probabilidade de uma cepa ser resistente a INH e ao mesmo tempo ser resistente a ST é 8,7 vezes maior do que dessa mesma cepa ser resistente para INH e sensível para ST.

Tabela 15: Relação de dependência entre INH e ST.

		Estreptomicina		Total
		Resistente	Sensível	
Isoniazida	Resistente	25	27	52
		48,1%	51,9%	100%
	Sensível	05	47	52
		9,6%	90,4%	100%
Total		30	74	104
		28,8%	71,2%	100%

4.3.4 INH *versus* ETH e PZA

Análises posteriores também foram realizadas, comparando o nível de dependência que a INH apresenta em relação à ETH e à PZA, isoladamente.

Estatisticamente, o p-valor de χ^2 foi maior do que 0,05, mostrando não existir nenhuma relação de dependência entre os fármacos analisados. Corroborando com esses resultados, o valor de CC foi igual a zero e o OR apresentou variável passando por 1, mostrando não haver relação entre os grupos analisados.

Esses resultados corroboram com aqueles dados apresentados no item 4.1.3, que afirmam não existir analogia entre mutação em *katG* e surgimento de resistência a tais fármacos.

4.4 Interação entre *katG* com RMP, EMB e ST e a nova conduta de tratamento para TB

A identificação de mutações no códon 315 do gene *katG* se mostrou um bom marcador para a identificação não apenas de cepas resistentes a INH, como também a RPM, EMB e ST. Isso possivelmente se deve por conta da relação de dependência em que os mesmos possuem

com a INH, como mostrado anteriormente. Logo, quanto maior for o percentual de cepas multirresistentes, maior também será a função do gene *katG* como marcador para tais quimioterápicos. Essa relação de dependência também pode ser explicada, observando-se os Esquemas de tratamento preconizados pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Mais recentemente, o Ministério da Saúde sugeriu alterações no Esquema I da terapêutica para a TB. A nota técnica objetivou divulgar modificações no sistema de tratamento para a tuberculose a ser implementado pelo Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT)/Ministério da Saúde. Essas mudanças aplicar-se-ão aos indivíduos com 10 anos ou mais (BRASIL, 2009).

A primeira mudança consiste na introdução do EMB como quarto fármaco na fase intensiva de tratamento (dois primeiros meses) do esquema básico, e tem como justificativa a constatação do aumento da resistência primária à INH (de 4,4 para 6,0%) e a resistência primária à INH associada à RMP (de 1,1 para 1,4%), observado no II Inquérito Nacional de resistência aos fármacos anti-TB conduzido em 2007-2008, em comparação com os resultados do I Inquérito Nacional, realizado no período de 1995 a 1997 (BRASIL, 2009).

No esquema anterior, o EMB era utilizado apenas em pacientes recidivantes ou que não respondessem a primeira linha de tratamentos, mas mesmo assim, os resultados obtidos demonstraram existir uma alta relação daquele quimioterápico com a INH.

Com a utilização do EMB no Esquema I, espera-se no futuro um aumento ainda maior da relação entre esse fármaco e a INH, devido a seleção de cepas que apresentem resistência a ambos os fármacos.

5 CONCLUSÃO

As análises realizadas nesse trabalho possibilitaram concluir que:

- Para o grupo amostral selecionado, a enzima MspI se mostrou tão eficiente na identificação de mutações no códon 315 do gene *katG*, quando comparada com a *SatI*;
- 46,2% das cepas que apresentavam resistência a INH, também foram mutantes para o gene *katG*;
- Não foi observado o aparecimento de mutação em *katG* em todas as cepas INHS, mostrando ser esse gene um bom marcador para a identificação de cepas resistentes a esse fármaco;
- A frequência mutacional do gene *katG* foi a menor já encontrada em trabalhos realizados no Brasil, sendo baixa também quando comparada aos percentuais observados em outros países ao redor do mundo;
- Mutações no gene *katG* também estão diretamente relacionadas a produção de cepas resistentes a RMP, EMB e ST. Sendo assim, o *katG* também poderá funcionar como um marcador de resistência a essas outras drogas.
- A relação entre mutação em *katG* e produção de resistência aos outros quimioterápicos apresentam proporções diferentes, sendo que para a RMP, essa relação de acordo com OR é de 14; de 6,6 para EMB; e 2,7 para ST.
- O gene *kasA* apresentou uma frequência mutacional de 34,6% em cepas resistentes a INH. Entretanto, seu percentual foi ainda maior (46,2%) naqueles microorganismos que apresentaram sensibilidade a esse mesmo fármaco.
- O gene *kasA*, não se mostrou ser um bom marcador para identificação de cepas resistentes a INH, e também a nenhum outro fármaco utilizado no tratamento da TB;
- O teste de dependência entre a INH e os outros fármacos mostrou existir analogia entre o surgimento de resistência a INH e a RMP, EMB e ST, separadamente;
- O teste de dependência entre a INH e os outros fármacos possivelmente explica o porquê da relação entre mutação em *katG* e o surgimento de cepas resistentes a RMP, EMB e ST;
- Os esquemas utilizados para o tratamento da tuberculose, preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil, é possivelmente o principal fator responsável pela seleção de cepas MDR-TB;

- A atual alteração do Esquema I do tratamento possivelmente possibilitará a seleção de cepas resistentes a INH e EMB concomitantemente, aumentando ainda mais a relação entre esses fármacos;
- Quanto maior for a relação de dependência entre os quimioterápicos com a INH, maior também será a relação entre mutação no gene *katG* e produção de cepas resistentes aos mesmos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises realizadas nesse trabalho possibilitaram considerar que:

- Trabalhos complementares relacionados a outros genes também apontados como responsáveis por produção de cepas resistentes a INH devem ser realizados, para melhor se conhecer suas frequências e elucidar quais as principais vias utilizadas para a produção de resistência, pelas cepas de *M. tuberculosis* isoladas da Bahia;
- Pesquisas complementares sobre a real função do gene *kasA* devem ser realizadas, para melhor elucidar a sua relação com as famílias EAI e T do *Mycobacterium tuberculosis*;
- O entendimento dessas vias genético-metabólicas poderá possibilitar o direcionamento e elaboração de novos agentes terapêuticos mais eficazes do que aqueles utilizados na atualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATE, G; HOFFNER, S. E.; OSTERGAARD THOMSEN, V. *et al.* Characterization of Isoniazid-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* on the Basis of Phenotypic Properties and Mutations in katG. **J. Clin. Microbiol. Infect. Dis** 20:329-333, 2001.

ABBADI, S. H.; SAMEAA, G. A.; MORLOCK, G. *et al.* Molecular Identification of Mutations Associated with Anti-Tuberculosis Drug Resistance Among Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Internatioal Journal of Infectious Diseases**. 10:1-6, 2008.

AHMAD, S.; MOKADDAS, E. Contribution of AGC to ACC and Other Mutations at Codon 315 of the katG Gene in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from the Middle East. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 23:473-9, 2004.

American Thoracic Society - Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, 161:1376-1395, 2000.

ARISTIMUÑO L.; ARMENGOL, R.; CEBOLLADA, A. *et al.* Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in the First National Survey of Anti-Tuberculosis Drug Resistance from Venezuela. **BioMed Central Microbiology**. 6 (90):1-12, 2006.

BARCLAY, S.; ELBERT, R. H.; KOCHWESER, D. Mode of Action of Isoniazid. **Am Rev Tuberc**;;, 67:490-96, 1953.

BERTOLLI FILHO, C. **História Social da Tuberculose e do Tuberculoso**. Rio de Janeiro, Editora: FIOCRUZ, 245p, 2001.

BHATT, A.; KREMER, L.; DAÍ, A. Z.; *et al.* Conditional depletion of kasA, a key enzyme of mycolic acid biosynthesis, leads to Mycobacterial cell lysis. **J. Bacteriol.**, 187:7596-7606, 2005.

BISHAI W R, GRAHAM N M, HARRINGTON S, *et al.* Molecular and geographic patterns of tuberculosis transmission after 15 years of directly observed therapy. **JAMA**, 280:1679–1684, 1998.

BLACKWOOD K S, AL AZEM A, ELLIOTT L J, *et al.* Conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Manitoba. **BMC Infect Dis**, 3:18, 2003.

BLOOM, B. R. e MURRAY, C. J. Tuberculosis: Commentary on a Reemergent Killer. **Science**, 257:1055-64, 1992.

BLOOM, B. R. **Tuberculosis: Patogenesis, Protection and Control**. Washington: ASM, 1994.

BRADEN C R, TEMPLETON G L, CAVE M D, *et al.* Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from a state with a large rural population. **J Infect Dis**, 175: 1446–1452, 1997.

BRAGA, J. U; BARRETO, A. M. W.; HIJJAR, M. A. Inquérito epidemiológico da resistência às drogas usadas no tratamento da tuberculose no Brasil 1995 – 1997, IERDTB. Parte III: principais resultados. **Boletim de Pneumologia Sanitária**, 11(1):76-81, 2003.

BRASIL. DATASUS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/index.php>. Acesso em: 01 de Dezembro de 2009.

BRASIL. **Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose e Outras Micobactérias**. Departamento de vigilância epidemiológica, Brasília: Ministério da Saúde, 2008.

BRASIL. **Programa Nacional de Controle a Tuberculose**. Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes, Ministério da Saúde. 2009.

BRENNAN, P. J.; NIKAIIDO, H. *The envelope of Mycobacteria*. **Ann. Rev. Biochem.**, 64:29-63, 1995.

BURMAN W J, REVES R R, HAWKES A P, *et al.* DNA fingerprinting with two probes decreases clustering of *Mycobacterium tuberculosis*. **Am J Respir Crit Care Med**, 155: 1140–1146, 1997.

CACHO C J, ASTRAY M J, PEREZ M A, *et al.* Ten-year populationbased molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Madrid, Spain. **Int J Tuberc Lung Dis**, 9: 1236–1241, 2005.

CAI, L.; KONG, F.; JELFS, P. *et al.* Rolling Circle Amplification and Multiplex Allele-Specific PCR for Rapid Detection of katG and inhA Gene Mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **International Journal of Medical Microbiology**. 10:1-8; 2009.

CARDOSO, R. F.; COOKSEY, R. C.; MORLOCK, G. P. *et al.* Screening and Characterization of Mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Obtained in Brasil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(9):3373-81, 2004.

CECON, L. **Mutações no gene nat de isolados de *Mycobacterium tuberculosis***: efeito na atividade enzimática e no perfil de resistência à isoniazida. 2009. 150f. Tese (Doutorado) – Universidade de Ciência Farmacêutica – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Center for Disease Control and Prevalence – Morbidity and Mortality Weekly Report. **U. S. Department of Health and Human Services**. 43: 141, 1994.

CHAN-YEUNG M, TAM C M, WONG H, *et al.* Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in Hong Kong: a population-based prospective study. **J Clin Microbiol**, 41: 2706–2708, 2003.

CHOPRA, I.; BRENNAN, P. Molecular action of antimycobacterial agents. **Tuberculosis and Lung Disease.**, 78 (2), 89-98, 1998.

CHOUCHANE, S.; LIPPAI, I.; MAGLIOZZO, R. S. Catalase-Peroxidase (*Mycobacterium tuberculosis* katG) Catalysis and Isoniazid Activation. **Biochemistry**, 39:9975-83, 2000.

COSTA, E. R. D.; RIBEIRO, M. O.; SILVA, M. S. N. *et al.* Correlations of Mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* Genes and *in vitro* Susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains Segregated by Spoligotype Families from Tuberculosis Prevalent Countries in South America. **BMG Microbiology**. 9(39):1-11, 2009

DANILCHANKA, O.; MAILAENDER, C.; NIEDERWEIS, M. Identification of a Novel Multidrug Efflux of *Mycobacterium tuberculosis*. **Int J Tuberc Lung Dis**,52(7):2503-11, 2008.

DAVID, H. L. Drug-Resistance in *M. tuberculosis* and Other Mycobacteria. **Clin Chest Med**; 1(2):227-30, 1980.

DAVIDSON, L. A.; TAKAYAMA, K. Isoniazid Inhibition of the Synthesis of monounsaturated Long-Chain Fatty Acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob Agents Chemother**, 16:104-5. 1979.

DAVIS, W. E.; WEBER, M. M. Specificity of Isoniazid on Growth Inhibition and Competition for an Oxidized Nicotinamide Adenine Dinucleotide Regulatory Site on the Electron Transport Pathway in *Mycobacterium phlei*. **Antimicrob Agents Chemoter**, 12:213-18, 1977.

DE BRUYN G, ADAMS G J, TEETER L D, *et al.* The contribution of ethnicity to *Mycobacterium tuberculosis* strain clustering. **Int J Tuberc Lung Dis**, 5: 633–641, 2001

DEL PORTILLO, P., L. A. MURILLO, M. E. PATARROYO. Amplification of species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. **J. Clin. Microbiol.** 29:2163-2168, 1991.

DIEL R, SEIDLER A, NIENHAUS A, *et al.* Occupational risk of tuberculosis transmission in a low incidence area. **Respir Res**, 6: 35, 2005.

DURMAZ R, GUNAL S, YANG Z, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Turkey. **Clin Microbiol Infect**, 9: 873–877, 2003.

ELIA-PASQUET S, DABIS F, TEXIER-MAUGIEN J, *et al.* [Transmission of tuberculosis in Gironde: epidemiologic investigation by genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis*]. **Rev Epidemiol Sante Publique**, 48: 127–136. 2000.

ELLIS B A, CRAWFORD J T, BRADEN C R, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in a sentinel surveillance population. **Emerg Infect Dis**, 8: 1197–1209, 2002.

ESCARLANTE, P.; RAMASWAMY, S.; SANABRIA, H. *et al.* Genotypic Characterization of Drug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Peru. **Tubercle and Lung Disease**. 79(02):111-118, 1998.

- FERRAZOLI L, PALACI M, MARQUES L R, *et al.* Transmission of tuberculosis in an endemic urban setting in Brazil. **Int J Tuberc Lung Dis**, 4: 18–25, 2000.
- FERREIRA, A. A. A.; QUEIROZ, K. C. S.; TORRES, K. P. *et al.* Os fatores Relacionados a Tuberculose Pulmonar e a Baciloscopia: Uma Contribuição ao Diagnóstico nos Serviços de Saúde Pública. **Rev. Brasileira de Epidemiologia**. 8(2):142-9, 2005.
- FITZGERALD J M, FANNING A, HOEPNNER V, *et al.* The molecular epidemiology of tuberculosis in western Canada. **Int J Tuberc Lung Dis**, 7: 132–138, 2003.
- FOX, H. H. The Chemical Approach to the Control of Tuberculosis. **Science**, 116:129-34, 1952.
- FOX, W.; ELLARD, G. A.; MITCHISON, D. A. Studies on the treatment of tuberculosis undertaken by British Medical Research Council Tuberculosis Units. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 3: 231-279.
- GENG E, KREISWIRTH B, DRIVER C, *et al.* Changes in the transmission of tuberculosis in New York City from 1990 to 1999. **N Engl J Med**, 346: 1453–1458. 2002.
- GLYNN J R, BAUER J, DE BOER A S, *et al.* Interpreting DNA fingerprint clusters of Mycobacterium tuberculosis. European Concerted Action on Molecular Epidemiology and Control of Tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, 3: 1055–1060, 1999.
- GUTIERREZ M C, VINCENT V, AUBERT D, *Et al.* Molecular fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. **J Clin Microbiol**, 36: 486–492, 1998.
- HAZBON, M. H.; BRIMACOMBE, M; BOBADILLA DEL VALLE, M. *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutational spoligotyping database (SploDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiol**, 6:23, 2006.
- HELDAL E, DAHLE U R, SANDVEN P, *et al.* Risk factors for recent transmission of Mycobacterium tuberculosis. **Eur Respir J**, 22: 637–642, 2003.
- HERNANDEZ G, KUNIMOTO D, WANG L, *et al.* Predictors of clustering of tuberculosis in Greater Vancouver: a molecular epidemiologic study. **Can Med Assoc J**, 167: 349–352, 2002.
- HERRERA, L.; VALVERDE, A.; SAIZ, P. *et al.* Molecular Characterization of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Strains in the Philippines. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 23:572-576, 2004.
- HERRERA-LEÓN, L.; MOLINA, T.; SAÍZ, P. *et al.* New Multiplex PCR for Rapid Detection of Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49(01):144-7, 2005.
- HEYM, B.; SAINT-JOANIS, B.; COLE, S. T. The Molecular Basis of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* **Tubercle and Lung Disease**, 79(4):267-71, 1999.

HÖFLING, C. C.; PAVAN, E. M.; GIAMPAGLIA, C. M. S *et al.* Prevalence of KatG Ser315 Substitio and rpoB mutations in Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Brasil. **International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases**, 7: 87-93, 2005.

INIGO J, ARCE A, MARTIN-MORENO J M, *et al.* Recent transmission of tuberculosis in Madrid: application of capture-recapture analysis to conventional and molecular epidemiology. **Int J Epidemiol**, 32: 763-769, 2003.

ISAKOVA, Zh. T. Frequency of Occurrence and Types of Mutations in the rpoB, katG, inhA and ahpC Genes Associated with Rifampicin and Isoniazid Resistance in *M. tuberculosis* Strains Circulating in the Kyrgyz Republic. **Molecular Genetics, Microbiology and Virology**. 23(04):202-4, 2008.

JACKETT, P. S.; ABER, V. R.; MITCHISON, D. A. The Relationship Between Nicotinamide Adenine Dinucleotide Concentration and Antibacterial Activity of Isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. **Am Rev Resp Dis**, 115:601-7, 1977.

JOHNSSON, K.; FROLAND, W. A.; SCHULTZ, P. G. Overexpression, Purification and Characterization of the Catalase-Peroxidase katK from *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Biological Chemistry**, 272 (5):2834-40, 1997.

JOHNSSON, K.; KING, D. S.; SCHULTZ, P. G. Studies on the Mechanism of Action of Isoniazid and Ethionamide in the Chemotherapy of Tuberculosis. **J. Am. Chem. Soc.**, 117:5009-10, 1995.

KEMPF M C, DUNLAP N E, LOK K H, *et al.* Long-term molecular analysis of tuberculosis strains in Alabama, a state characterized by a largely indigenous, low-risk population. **J Clin Microbiol**, 43: 870-878, 2005.

KIEPIELA, P.; BISHOP, K. S.; SMITH, A. N. *et al.* Genomic Mutations in the katG, inhA and ahpC Genes Are Useful for the Prediction of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Keazulu Natal, South Africa. **Tubercle and Lung Disease**. 80(01):47-56, 2000.

KREMER, L., DOVER, L. G.; CARRÈRE, S.; *et al.* Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochem. Journal**, 364:423-430, 2002.

KREMER, L.; DOUGLAS, J. D.; BAULARD, A. R.; *et al.* Thiolactamycin and related-analogues as novel anti-mycobacterial agents targeting KasA and KasB condensing enzymes in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Biol. Chem.**, 275:16857-16864, 2000.

KRITSKI, A. L.; CONDE, B. C.; SOUZA, G. R. M. **Tuberculose: Do Ambulatório à Enfermaria**. 3 edição, Ed. Atheneu, 259p, 2000.

KUBICA, G. P.; KENT, P. T. The Sputum Digestion Process in the *Mycobacterium* Laboratory: Contributions of Centrifugal-Efficiency and Digestant Toxicity. CDC, **Proceedings on Laboratory of Mycobacteriology**, 1985.

KULAGA S, BEHR M, MUSANA K, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Montreal. **Can Med Assoc J**, 167: 353–354, 2002.

KWON, H. H.; TOMIOKA, K; SAITO, H. Distribution and Characterization of β -Lactamases of Micobacteria and Related Organisms. **Tubercle Lung**, 76:141-8, 1995.

LEE, A. S. G. *et al.* Contribution of kasA analysis to detection of Isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 43(8):2087-2089, 1999.

LIPIN, M. Y.; STEPANSHINA, V. N.; SHEMYAKIN, I. G. *et al.* Association of Specific Mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs Genes with Spoligotypes of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates in Russia. **Clin. Microbiol. Infect.** 13:620-6, 2007.

LUCKNER, S. R.; MACHUTTA, C. A.; TONGE, P. J. *et al.* Crystal Structures of *Mycobacterium tuberculosis* kasA Show Mode of Action Within Cell Wall Biosynthesis and its Inhibition by Thiolactomycin. **Structure**, 17:1004-13, 2009.

MAGUIRE H, DALE J W, MCHUGH T D, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995–7 showing low rate of active transmission. **Thorax**, 57: 617–622, 2002.

MARTTILA, H. J.; SOINI, H. Molecular Detection of Resistance to Antituberculous Therapy. **Clin Lab Med**, 23:823-41, 2003.

MITCHISON, D. A. How drug resistance emerges as a result of poor compliance during short course chemotherapy for tuberculosis. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, 2:10-15, 1998.

MOKROUSOV, I.; NARVSKAYA, O.; OTTEN, T. *et al.* High Prevalence of katG Ser315Thr Substitution Among Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Clinical Isolates from Northwestern Russia, 1996 to 2001. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46(05):1417-1424, 2002

MORO M L, SALAMINA G, GORI A, *et al.* Two-year populationbased molecular epidemiological study of tuberculosis transmission in the metropolitan area of Milan, Italy. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, 21: 114–122, 2002.

MULDER, M. A.; ZAPPE, H.; STEYN, L. M. The *Mycobacterium tuberculosis* katG Promoter Region Contains a Novel Upstream Activator. **Microbiology**, 145:2507-18, 1999.

NATAL, S.; VALENTE, J. C.; SÁNCHEZ, A. R.; PENNA, M. L. F. Isoniazid and rifampicin resistance and prior treatment for tuberculosis. **Caderno de Saúde Pública**, 19(5):1277-1281, 2003.

NIEDERWEIS, M. Mycobacterial porins – New channel proteins in unique outer membranes. **Mol. Microbiol.**, 49:1167-77, 2003.

NIKAIDO, H. Prevention of Drug Access to Bacterial Targets: Permeability Barriers and Active Efflux. **Science**, 264:382-8, 1994.

PALOMINO, J. C.; LEÃO, S. C.; RITACCO, V. **Tuberculosis 2007**: From Basic Science to Patient Care, 686p. Livro retirado do site: www.TuberculosisTextbook.com. Acesso em Março de 2007.

PARSONS, L. M.; SALFINGER, M.; CLABRIDGE, A. *et al.* Phenotypic and Molecular Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Resistant to both Isoniazid and Ethambutol. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 49(06):2218-2225, 2005.

PENA M J, CAMINERO J A, CAMPOS-HERRERO M I, *et al.* Epidemiology of tuberculosis on Gran Canaria: a 4 year population study using traditional and molecular approaches. **Thorax**, 58:618–622, 2003.

PIERATTELLI, R.; BANCI, L.; EADY, N. A. J. *et al.* Enzyme-Catalyzed Mechanism of Isoniazid Activation in Class I and III Peroxidases. **The Journal of Biological Chemistry**, 279(37):39000-09, 2004.

POPE, H. Antagonism of Isoniazid by Certain Metabolites. **Am Rev Tuberc**, 68:938-39, 1953.

POST, F. A.; WILLCOX, P. A.; MATHEMA, B. *et al.* Genetic Polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates from Patients with Chronic Multidrug-Resistant Tuberculosis. **The Journal of Infectious Diseases**. 190:99-106, 2004.

PRETORIUS, G. S.; VAN HELDEN, P. D.; SIRGEL, F. *et al.* Mutations in katG Gene Sequences in Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* Are Rare. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 39(10):2276-2281, 1995.

RAMASWAMY, S.; MUSSER, J. M. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. **Tubercle and Lung Disease**, 79(1):3-29, 1998.

RHEE J T, TANAKA M M, BEHR M A, *et al.* Use of multiple markers in population-based molecular epidemiologic studies of tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis**, 4: 1111–1119, 2000.

RINDER, H.; FELDMANN, K.; TORTOLI, E. *et al.* Culture-Independent Prediction of Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by katG Gene Analysis Directly from Sputum Sample. **Molecular Diagnosis**, 4:145-52. 1999.

ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S *et al.* Improvement of *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples Using DNA Purified by Glass matrix. **Journal of Microbiological Methods**, 28: 139-146, 1997.

ROSSETTI, M. L. R.; JARDIM, S. B.; RODRIGUES, V. F. S. *et al.* Improvimento of *Mycobacterium tuberculosis* Detection in Clinical Samples Using DNA Purified by Glass Matrix. **Journal Microbiological Methods**, 28:139-146, 1997.

RUFFINO-NETTO, A. Comentário: Detecção de Casos de Tuberculose por Raio-X em Massa. **Rev. Saúde Pública**, 40 (3): 400-1, 2006.

SAMPER S, IGLESIAS M J, RABANAQUE M J, *et al.* The molecular epidemiology of tuberculosis in Zaragoza, Spain: a retrospective epidemiological study in 1993. **Int J Tuberc Lung Dis**, 2: 281–287, 1998.

SASSETTI, C. M.; BOYD, D. H.; RUBIN, E. J. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. 2003. **Mol. Microbiol.** 48, 77-84.

SCHAEFFER M. L.; CARSON, J. D.; KALLENDER, H.; LONSDALE, J. T. Development of a Scintillation Proximity Assay for the *Mycobacterium tuberculosis* kasA and kasB Enzymes Involved in Mycolic Acid Biosynthesis. **Tuberculosis**, 84:353-60, 2004.

SEYDEL, J. K.; SCHAPER, K. J.; WEMPE, E.; CORDES, H. P. Mode of Action and Quantitative Structure-Activity Correlations of Tuberculostatic Drug of the Isonicotinic Acid Hydrazide Type. **J. Med. Chem.**, 19:483-91, 1976.

SHOEB, H. A.; BOWMAN JR, B. U.; OTTOLENGHI, A. C.; MEROLA, A. J. Evidence for the Generation of Active Oxygen by Isoniazid Treatment of Extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Antimicrob Agents Chemother.**, 27:404-7, 1985.

SILVA, M. S. N, SENNA, S. G., RIBEIRO, M. O *et al.* Mutation in katG, inhA, and ahpC Genes of Brazilian Isoniazid-Resistant of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(9):4471-4, 2003.

SINGH, R.; WISEMAN, B.; DEEMAGARN, T. *et al.* Comparative Study of Catalase-Peroxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 471:201-14, 2008.

SIQUEIRA, H. R.; FREITAS, F. A. D.; OLIVEIRA, D. N. *et al.* Resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à Isoniazida por Mutações em Duas Regiões Diferentes do Gene katG. **J. Bras. Pneumol.** 35(08):773-779, 2009.

SKONIKOVA, O. I.; NOSOVA, E. Y.; MARKOVA, O. V. *et al.* Typing of *Mycobacterium tuberculosis* Strains Resistant to Rifampicin and Isoniazid by Molecular Biological Methods. **Immunology and Microbiology.** 3:273-5, 2003.

SLAYDEN, R. A.; BARRY, C. E. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazida resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, 82(4/5):149-160, 2002.

SLAYDEN, R. A.; LEE, R. E.; BARRY, C. E. Isoniazid Affects Multiple Components of the Type II Fatty Acid Synthase System of *Mycobacterium tuberculosis*. **Mol Microbiol**, 38:514-25, 2000.

SOLSONA J, CAYLA J A, VERDU E *et al.* Molecular and conventional epidemiology of tuberculosis in an inner city district. **Int J Tuberc Lung Dis**, 5: 724–731, 2001.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no Combate à Tuberculose: Passado, Presente e Futuro. **Química Nova**, 28(4):678-82, 2005.

- STEPHAN, J.; MAILAENDER, C.; ETIENNE, G. *et al.* Multidrug Resistance of a Porin Deletion Mutant of *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(11):4163-70, 2004.
- SUN, Y. J.; LEE, A. S. G.; WONG, S. Y.; PATON, N. I. Analysis of the Role of *Mycobacterium tuberculosis* kasA Gene Mutations in Isoniazid Resistance. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 13:816-42., 2007.
- SWANSON, S.; GOKULAN, K.; SACCHETTINI, J. C. KasA, Another Brick in the Mycobacterial Cell Wall. **Structure**, 17:914-5, 2009.
- TELENTE, A. Genetic of Drug Resistance in Tuberculosis. **Clinics in Chest Medicine**, 18(01): 55-64, 2007.
- TIRUVILUAMALA, P.; REICHMAN, L. B. Tuberculosis. **Annu. Rev. Public Health**, 23:403 a 426, 2002.
- TUDO G, GONZALEZ-MARTIN J, OBAMA R, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in the Bata and Malabo districts of Equatorial Guinea. **Int J Tuberc Lung Dis**, 8: 1458–1463, 2004.
- UNISSA, A. N.; SELVAKUMAR, N.; NARAYANAN, S.; NARAYANAN, P. R. Molecular Analysis of Isoniazid-Resistant Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 31:71-5, 2008.
- VACHEE A, VINCENT P, SAVAGE C, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in the Nord Department of France during 1995. **Tubercle Lung Dis**, 79:361–366, 1999.
- VAN SOOLINGEN D, BORGDORFF M W, DE HAAS P E, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. **J Infect Dis**, 180:726–736, 1999;
- VAN SOOLINGER, D.; HAAS, P. E. W.; VAN DOORN, H. R. *et al.* Mutations at Amino Acid Position 315 of the katG Gene Are Associated with High-Level Resistance to Isoniazid, Other Drug Resistance, and Successful Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in the Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**. 182:1788-90, 2000.
- VARELA, G.; GONZÁLEZ, S.; GADEA, P. *et al.* Prevalence and Dissemination of the Ser315Thr Substitution within the katG Enzyme in Isoniazid-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Uruguay. **Journal of Medical Microbiology**. 57:1518-1522, 2008.
- VARELA, G.; GONZÁLEZ, S.; GADEA, P. *et al.* Prevalence and Dissemination of the Ser315Thr Substitution Within the KatG Enzyme in Isoniazid-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Isolated in Uruguay. **Journal of Medical Microbiology**. 57:1518-22, 2008.
- VERVER S, WARREN R M, MUNCH Z, *et al.* Transmission of tuberculosis in a high incidence urban community in South Africa. **Int J Epidemiol**, 33:351–357, 2004.

- VILCHÈZE, C.; MORBIDONI, H. R.; WEISBROD, T. R. *et al.* **J. Bacteriol.**, 182:4059-67, 2000.
- VILCHÈZE, C.; JACOBS JR., W. R. The mechanism of Isoniazida killing: Clarity through the scope of genetics. **Annu. Rev. Microbiol.**, 61: 35-50, 2007.
- VINCENT, H. N.; COX, J. S.; SOUSA, A. O. *et al.* Role of KatG Catalase-Peroxidase in Mycobacterial Pathogenesis: Countering the Phagocyte Oxidative Burst. **Molecular Microbiology**, 52(5):1291-302, 2004.
- WEIS S E, POGODA J M, YANG Z, *et al.* Transmission dynamics of tuberculosis in Tarrant County, Texas. **Am J Respir Crit Care Med**, 166: 36–42, 2002.
- WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control** – surveillance, planning, financing. WHO Report 2008.
- WILKINSON D, PILLAY M, CRUMP J, *et al.* Molecular epidemiology and transmission dynamics of Mycobacterium tuberculosis in rural Africa. **Trop Med Int Health**, 2: 747–753, 1997.
- WILMING, M.; JOHNSON, K. Inter- and Intramolecular Domain Interactions of the Catalase-Peroxidase KatG from *M. tuberculosis*. **Elsevier Science B. V.**, 509:272-6, 2001.
- WINDER, F. G.; COLLINS, P. B. Inhibition by Isoniazid of Synthesis of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.** 63:41-8, 1970.
- WOLINSKY, E. Nontuberculous Mycobacteria and Associated Diseases. **Am Rev Resp Dis** 119:107-59, 1979.
- YANG Z. Molecular epidemiology of tuberculosis. **Front Biosci**, 8: d440–d450, 2003.
- YOUATT, J.; TAHM, S. H. An Enzyme System of *Mycobacterium tuberculosis* that Reacts Specifically with Isoniazid I. **Am Rev Respir Dis** 19:483-91, 1969.
- ZAKERBOSTANABAD, S.; TITOV, L. P.; KARIMI, A. *et al.* Molecular Characterization and Tree Evolution of Rifampicine and Isoniazid-Resistance in Multi Drug Resistance strains isolated from Primary and Secondary Tuberculosis Diseases in southern endemic border of Iran. **Turkish Respiratory Journal**.
- ZÁMOCKÝ, M.; REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. The Molecular Peculiarities of Catalase-Peroxidases. **FEBS Letters**, 492:177-82, 2001.
- ZENTENO-CUEVAS, R; ZENTENO, J. C; CUELLAR, *et al.* Mutations in rpoB and katG genes in Mycobacterium isolates from the Southeast of Mexico. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 104(3):468-472, 2009.
- ZHANG, S.; QI, H.; QIU, D. *et al.* Genotypic Analysis of Multidrug-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates Recovered from Central China. **Biochemical Genetics**. 45:281-90, 2007.

ZHANG, Y. HEYM, B.; ALLEN, B. *et al.* The Catalase-Peroxidase Gene and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, 358:591-593, 1992.

ZOLNIR-DOVC M, POLJAK M, ERZEN D, *et al.* Molecular epidemiology of tuberculosis in Slovenia: results of a one-year (2001) nation-wide study. **Scand J Infect Dis**, 35:863–868, 2003.

APENDICE A

Técnica de extração do DNA do *Mycobacterium tuberculosis*.

As cepas foram transferidas com auxílio de alça de platina de 4 mm de diâmetro (realizando três alçadas, em média), transferindo-as diretamente para um microtubo contendo 400 µL de TE (1X) e aquecendo por 20 minutos, numa temperatura de aproximadamente 80°C. Tais amostras permaneceram em temperatura ambiente, até que estivessem resfriadas, onde se adicionou 50µL de lisozima (10mg/mL). Após o acréscimo da mesma, utilizou-se o vórtex para uma melhor agitação e homogeneização, com subsequente incubação em banho-maria a 37°C, por uma hora.

Em seguida, acrescentou-se 70µL de SDS (10%) e 5µL de proteinase K (10mg/ml), vortezando rapidamente e incubando a 65°C, por 10 minutos. Adicionou-se 100µL de NaCl (5M) e 100µL da solução CTAB/NaCl, levando tais amostras ao vórtex, homogeneizando-as até que o conteúdo do líquido se tornasse esbranquiçado, e posteriormente incubando a 65°C, por 10 minutos, em banho-maria. Depois de passado esse tempo, adicionou-se 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), que são solventes naturais, levando novamente ao vórtex por 10 segundos, e encaminhando para uma centrifuga, com rotação de 10 G, em temperatura ambiente, por cinco minutos.

Transferiu-se o sobrenadante para um tubo de microcentrífuga limpo e seco, adicionando 450µL de isopropanol. Incubou-se a -20°C por no mínimo 10 minutos, centrifugando tais amostras com uma rotação de 10 G, por 15 minutos, em temperatura ambiente.

Por fim, descartou-se o sobrenadante, lavando o *pellet* com 1 mL de etanol a 70%, centrifugando a amostra na mesma rotação citada anteriormente por cinco minutos e em temperatura ambiente. Descartou-se por sua vez o sobrenadante e ressuspendeu o *pellet* em 20µL de TE (1X). O DNA, por sua vez, pôde ser estocado congelado, até que fossem realizados os passos posteriores.

APÊNDICE B - Publicações realizadas nos últimos 15 anos, relacionadas a mutações no códon 315 do gene *katG*.

Ano de Publicação	Autor	Cidades, Países e Continentes	Técnica Empregada	Número Amostral	Frequência de Mutação
1995	Yang, Z.	Dinamarca	RFLP	257	95,2%
1997	Barner <i>et al.</i>	Los Angeles (USA)	RFLP	162	84,8%
	Braden <i>et al.</i>	Arkansas (USA)	RFLP	235	66,8%
	Burman <i>et al.</i>	Denver (USA)	RFLP	189	63,2%
	Wilkinson <i>et al.</i>	Kwazulu-Natal (África do Sul)	RFLP	246	85,4%
1998	Bishai <i>et al.</i>	Baltimore (USA)	RFLP	182	91,5%
	Escarlate <i>et al.</i>	Peru	Spoligotyping	90	79%
	Gutierrez <i>et al.</i>	Paris (França)	RFLP	272	84,5%
	Samper <i>et al.</i>	Zaragoza (Espanha)	RFLP	226	83,1%
1999	Rinder <i>et al.</i>	Itália	RFLP	13	38,5%
	Vachee <i>et al.</i>	França	RFLP	154	97,5%
	van Soolingen <i>et al.</i>	Holanda	RFLP	4.266	75,2%
	Lee <i>et al.</i>	Cingapura	Seqüenciamento	160	26%
2000	Elia-Pasquet <i>et al.</i>	França	RFLP	102	100%
	Ferrazoli <i>et al.</i>	São Paulo (Brasil)	RFLP	293	88,8%
	Kiepiela <i>et al.</i>	África do Sul	SSCP	79	97,5%
	Rhee <i>et al.</i>	São Francisco (USA)	RFLP	1.307	83,3%
	van Soolinger <i>et al.</i>	Holanda	RFLP	295	94%
2001	Abate <i>et al.</i>	Etiópia, Guiné, Suécia	Fingerprinting	40	70%
	de Bruyn <i>et al.</i>	USA	RFLP Spoligotyping	1.139	90,5%
	Solsona <i>et al.</i>	Barcelona (Espanha)	RFLP	165	91,7%
2002	Ellis <i>et al.</i>	USA	RFLP e Spoligotyping	10.752	90,2%
	Geng <i>et al.</i>	USA	RFLP e Spoligotyping	546	77,3%
	Hernandez <i>et al.</i>	Vancouver (Canadá)	RFLP e Spoligotyping	793	98,4%
	Kulaga <i>et al.</i>	Montreal (Canadá)	RFLP	243	80,2%
	Maguire <i>et al.</i>	Londres (Inglaterra)	RFLP	2.042	62,9%
	Mokrousov <i>et al.</i>	Rússia	RFLP	204	93,6%
	Moro <i>et al.</i>	Milão (Itália)	Spoligotyping	581	71,4%
Weis <i>et al.</i>	Texas (USA)	RFLP	159	82,8%	
2003	Blackwood <i>et al.</i>	Canada	RFLP	629	100%
	Chan-Yeung <i>et al.</i>	Hong Kong (China)	RFLP	691	64,3%
	Durmaz <i>et al.</i>	Turquia	RFLP	88	100%
	Fitzgerald <i>et al.</i>	Canada	RFLP e Spoligotyping	944	98,7%
	Heldal <i>et al.</i>	Noruega	RFLP	765	81,5%
	Inigo <i>et al.</i>	Madri (Espanha)	RFLP e Spoligotyping	212	64,6%
	Kim <i>et al.</i>	Coréia do Sul	RFLP	71	80,3%
	Pena <i>et al.</i>	Espanha	RFLP	556	78,7%
	Silva <i>et al.</i>	Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (Brasil)	RFLP	69	87,1%, 60,9% e 60%
	Skotnikova <i>et al.</i>	Moscú (Rússia), Astrakhan (Rússia), República da Moldávia	SSCP	81, 18 e 11	72,2%, 54% e 91%
Zolnir-Dovc <i>et al.</i>	Eslovênia	RFLP	306	99,5%	
2004	Ahmad e Mokaddas	Kuwait, Dubai e Beirut	RFLP (MspI e MspAII)	37	60% e 65%
	Cardoso <i>et al.</i>	Brasil (SP e PR)	SSCP	97	85,6%

2004	Herrera <i>et al.</i>	Filipinas	RFLP e Seqüenciamento	81	54,3%
	Post <i>et al.</i>	África do Sul	RFLP	13	46%
	Tudo <i>et al.</i>	Nova Guiné	RFLP	185	89,8%
	Verver <i>et al.</i>	Cidade do Cabo (Sul da África)	RFLP	797	74,3%
2005	Cacho <i>et al.</i>	Madri (Espanha)	RFLP e Spoligotyping	448	73,2%
	Diel <i>et al.</i>	Alemanha	RFLP	848	85,7%
	Glynn <i>et al.</i>	Malawi (África)	RFLP	948	76%
	Herrera-Léon <i>et al.</i>	Espanha	PCR Multiplex	297	43,8%
	Kempf <i>et al.</i>	Alabama (USA)	RFLP e Spoligotyping	1.759	79,8%
2006	Parsons <i>et al.</i>	EUA	Spoligotyping	67	91%
	Höfling <i>et al.</i>	São Paulo (Brasil)	Spoligotyping SSCP	468	60,4%
2006	Aristimuño <i>et al.</i>	Venezuela	Spoligotyping	670	43%
	Hazbón <i>et al.</i>	Austrália, Colômbia, Índia, México, cidade de Nova York, Espanha e Texas	Seqüenciamento	403	46%
2007	Lipin <i>et al.</i>	Rússia	Spoligotipes	207	95%
	Unissa <i>et al.</i>	Índia	Seqüenciamento	70	64,3%
	Zhang <i>et al.</i>	China	Seqüenciamento	36	78%
2008	Abbadi <i>et al.</i>	Egito	SSCP	25	47,1%
	Isakova	República do Quirguistão	RFLP e Hibridização	940	94 %
	Zakerbostanabad <i>et al.</i>	Iran	Seqüenciamento	91	75%
	Varela <i>et al.</i>	Uruguai	RFLP	69	26%
2009	Cai <i>et al.</i>	Austrália	Multiplex PCR e Seqüenciamento	31	64,5%
	Zenteno-Cuevas <i>et al.</i>	México	Seqüenciamento	25	58%
	Cecon	Brasil	SSCP	125	68,4%
	Costa <i>et al.</i>	América do Sul	Seqüenciamento	224	80,8%
	Siqueira <i>et al.</i>	Brasil	Seqüenciamento	97	75%

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](#)