

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**Instituto Oswaldo Cruz**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular**

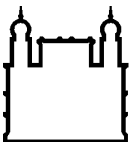
**AUTOR: Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcellos**

Estudo de associação entre o(s) polimorfismo(s) de base única no gene que codifica para a N-acetiltransferase de *M. tuberculosis* e a resistência a Isoniazida.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadores:** Dr. Adalberto Rezende Santos  
Dr. Philip Noel Suffys

**Rio de Janeiro**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

2007

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

## **Pós-Graduação em Biologia Celular Molecular**

*AUTOR: SIDRA EZIDIO GONCALVES VASCONCELLOS*

**Estudo de associação entre o (s) polimorfismo(s) de base única no gene que codifica para a N-acetiltransferase de *M. tuberculosis* e a resistência a Isoniazida.**

**Orientadores:** Dr. Adalberto Rezende Santos  
Dr. Philip Noel Suffys

Aprovada em: 05/03/2007

Banca examinadora: Dr. Wim Mauritis Degrave

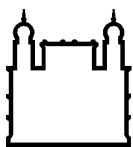
Dr. Neio Lucio Fernandes Boechat

Dr. Ana Carolina Paulo Vicente

Suplentes: Dr. Antônio Basílio de Miranda (revisor)

Dr. Marcelo Alves Ferreira

Rio de Janeiro, 05 de Março de 2007.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O(S) POLIMORFISMO(S) DE BASE ÚNICA NO GENE QUE CODIFICA PARA A N-ACETILTRANSFERASE DE *M. tuberculosis* E A RESISTÊNCIA A ISONIAZIDA

RESUMO

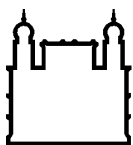
DISERTAÇÃO DE MESTRADO

Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcellos

A isoniazida é uma das principais drogas usadas no tratamento e quimioprofilaxia da tuberculose. Os mecanismos moleculares de resistência à mesma, são complexos e freqüentemente estão associados à presença de mutações nos genes *katG*, *inhA*, *ahpC* e *kasA*; porém, 25-50% dos isolados clínicos resistentes à isoniazida (INH) não apresentam mutações nestes genes indicando o envolvimento de outros genes e ou fatores. Recentemente, foi identificado em *Mycobacterium tuberculosis* um gene denominado *nat*, o qual apresenta um polimorfismo de base única (SNP) na posição 619 (619 G>A) e cujo produto, a N-acetiltransferase (NAT), aparentemente está envolvido na acetilação da isoniazida *in vitro*. Dados da literatura sugerem a associação da variante mutante 619A com resistência à isoniazida; assim, o objetivo inicial do nosso trabalho foi validar esta associação, em isolados de *M. tuberculosis* de pacientes do Brasil, através de genotipagem por PCR-RFLP e seqüenciamento. Adicionalmente, a utilização do seqüenciamento como estratégia de genotipagem permitiu a identificação de tres novos SNPs no gene *nat* dos isolados estudados, sendo duas não sinônimas (C20T e A233G), identificadas em isolados resistentes a INH e uma sinônima (T312C) em um isolado sensível a INH. Para a genotipagem do SNP 619, 380 isolados clínicos de pacientes tratados para tuberculose pulmonar de diferentes regiões do Brasil foram utilizados, sendo 198 resistentes e 183 sensíveis a INH. Entre eles, 20 (5,2%) apresentaram a variante mutante 619A, porém, a freqüência desta mutação foi significativamente maior nos isolados resistentes que nos sensíveis (8,6% e 16% respectivamente;  $p = 0,002$ , OR = 5,73, IC 1.55 - 25,02). A análise isolada das amostras resistentes e monoresistente a isoniazida não mostrou diferença significativa com relação à freqüência da variante 619A ( $p= 0,06$ ). Sessenta e seis por cento dos isolados que apresentaram a variante mutante 619A apresentaram também mutações em outros genes associados com a resistência a INH.

A análise adicional dos isolados de *M. tuberculosis* por "Spoligotyping", demonstrou que a variante mutante 619A não é característica de uma família específica, pois a mesma foi detectada em seis diferentes famílias (família S, LAM, Haarlem, X, T e LAM3/S convergente), além de dois isolados com perfis não definidos.

O seqüenciamento do gene *nat* em todas as micobactérias pertencentes ao Complexo *M. tuberculosis* mostrou que este gene é conservado entre as cepas do complexo. Adicionalmente, uma outra mutação anteriormente não descrita, G751A, foi observada exclusivamente nos isolados de *M. africanum* subtipo Ia provenientes de uma coleção de isolados clínicos e cepas de referência. Com objetivo de melhor classificar isolados provenientes de pacientes com TB de Gana, submetemos os mesmos a caracterização genética utilizando um conjunto de marcadores recém descritos ou descritos pela primeira vez neste trabalho, inclusive *nat*<sup>751</sup> e RD711<sup>390</sup>, o ultimo supostamente específico para *M. africanum* subtipo I b. Numa análise combinada de isolados de referência e isolados clínicos, confirmamos tanto a especificidade destes novos marcadores quanto a eficiência deste na classificação atual do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE O(S) POLIMORFISMO(S) DE BASE ÚNICA NO GENE QUE CODIFICA PARA A N-ACETILTRANSFERASE DE *M. tuberculosis* E A RESISTÊNCIA A ISONIAZIDA

### ABSTRACT

DISERTAÇÃO DE MESTRADO

Sidra Ezidio Gonçalves Vasconcellos

The isoniazid is one of the main drugs used in tuberculosis treatment and chemoprophylaxis. The molecular mechanisms of resistance to this drug are complex and frequently are associated to the presence of mutations in the genes *katG*, *inhA*, *ahpC* e *kasA*, however, 25-50% of the isoniazid clinical isolates do not present mutation in these genes indicating the involvement of other genes or factors. Recently, a gene denominated *nat* was identified in *M. tuberculosis*. This gene presents a single nucleotide polymorphism at position 619 (619 G>A) and it's product, the *N*-acetyltransferase (NAT), seems to be involved in the isoniazid acetylation *in vitro*. Literature data suggest the association of the mutant variant 619A with isoniazid resistance. Thus, the main goal of this work was to evaluate through PCR-RFLP and sequencing this association. Additionally, the use of the sequencing approach for genotyping allowed the identification of 3 new SNPs in the *nat* gene of the studied isolates, being 2 non-synonymous (C20T, A233G), identified in resistant isolates and 1 synonymous (T312C) from a sensitive isolate. For genotyping of the SNP 619, 381 clinical isolates from treated pulmonary tuberculosis patients from different regions of Brazil were used being (198 resistant and 183 sensitive to isoniazida). Twenty isolates (5,2%) of the total sample presented the mutant variant 619A, however the frequency of this mutation was significantly higher among the resistant than among the sensitive ones (8,6% and 16% respectively;  $p= 0,002$ , OR=5,73, IC 1.55 - 25,02). The isolate analysis of the resistant samples stratified according to the type of resistance (multidrug resistant and resistant only to isoniazid) do not show significant difference regarding the frequency of the 619A variant ( $p= 0,06$ ).

Sixty and six percent of the isolated that presented the mutant variant 619A also presented mutations in other genes associated with isoniazid resistance. The additional analysis of the *M. tuberculosis* isolates by "Spoligotyping", demonstrated that the mutant variant 619A is not characteristic of a specific family since it was detected in 6 different families (family S, LAM, Haarlem, X, T and LAM3/S convergent) and 2 isolated with profiles not defined.

The sequencing of the *nat* gene in all species of mycobacteria belonging to the *M. tuberculosis* Complex showed that this gene is conserved in these strains. Additionally, the mutation (G751A) was only observed in isolates of *M. africanum* subtype Ia. The molecular analysis of clinic isolates proceeding from patients from Ghana, using nat751 and RD711390 (specific of *M. africanum* subtype I b, described for the first time in this work), together with other molecular markers of species allowed to the confirmation of the specificity of these new markers and consequently the classification of these isolates as *M tuberculosis*. (n = 18), *M. africanum* subtype Ia (n = 9) and *M. africanum* subtype Ib (n=20).

Dedico a todos que fizeram ou fazem parte da minha vida.

## **Agradecimentos**

À Deus.

À minha amada família, minha mãe Nereá, ao meu pai Vascellos, aos meus irmãos Tâmara e Damasco e minha linda sobrinha Natália pelo apoio incondicional, torcida e amor que são fundamentais a minha existência.

Ao Alexandre S. de Almeida, pela ajuda generosa, pelo companheirismo, dedicação, pela força e a coragem de caminharmos juntos.

“Aos meus desorientadores” Dr. Adalberto Resende Santos (Adalba), o qual eu muito admiro e respeito, por sua orientação, generosidade, amizade, fé e ao Dr. Philip N. Suffys pela orientação, apoio e por suas colocações fundamentais.

Aos Drs. John L. Ho e Richard C. Huard pelo apoio e ensinamentos.

Às minhas amadas amigas Alejandra N. Martinez e Viviane C. Maniero, pela amizade, companheirismo, incentivo, por todas as lágrimas e sorrisos compartilhados.

Aos meus amigos da “Hanseníase” de longa data, pelos quais tenho enorme carinho e orgulho: Alexandre P. A, Amanda F. Brum, Diogo Coutinho, Diogo dos Santos Neto, Guilherme Inocêncio, Valcemir Filho, Patrícia Rosa, Milton Moraes.

A todos do Laboratório de Biologia Molecular aplicado á Micobactérias Adalgiza, Alexandre, Daniela, Diego, Emília, Edson, Jorge Luis, Lia Lima, Lizânia, Luciene, Mara, Milena, Rafael, Raquel, Vinícius e em especial a Atiná, Márcia Aparecida e Telma pela ajuda essencial na realização de alguns experimentos.

Não poderia deixar de agradecer a Márcia Quinhones e o Harrison Magdinier que sempre estiveram prontamente dispostos a me auxiliar, contribuindo muito com suas experiências.

Meus agradecimentos mais que especiais a Bené, Dona Maria, Seu Sales, Daniel, Pedro e ao Fidelton por toda ajuda, carinho e amizade.

À todos do departamento de Micobacterioses.

À Lia Possuelo, Alessandra Panunto, Christian e a todos que colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

*"Ele não sabia que era impossível, por isso foi lá e fez."*

Anônimo

**Lista de abreviaturas, símbolos e unidades.**

μL	Microlitro
A	Adenina
A	Alanina
ác	ácido
AMK	Amicacina



baar	Bacilo álcool ácido resistente
BCG	Bacilo de Calmette & Guérin
C	Citosina
CAP	capreomicina
CIP	ciprofloxacina
CMTB	Complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
CSA	Ciclosporina
CTAB	Brometo de cetil-trimetil-amônio
D	Ácido Aspártico
DMSO	dimethyl sulfoxide
dNTPs	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DR	Direct Repeat
DRE-PCR	Double-Repetitive Element-PCR
E	Ácido Glutâmico
EAI	East-African Indian
EBM	Etambutol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético sal sódico
ETH	Etionamida
EUA	Estados Unidos da América
FAP	Fundação Ataulpho de Paiva
FDA	"Food and Drug Administration"
G	Guanina
G	Glicina
H	Histidina
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IDT	Instituto de Doenças do Tórax
INH	Isoniazida
K	Lisina
Kb	Quilobase
LAM	Latin-American and Mediterranean family
LVX	Levofloxacina
MDR	Multi Droga Resistência
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de Magnésio
MIC	Concentração inibitória mínima
mM	milimolar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato de Sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NAT2	N-acetiltransferase 2
PAS	paramino-salicílico
pb	Pares de base
PCR	Polymerase Chain Reaction
PCR-RFLP	Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism
PGG	Principal Genetic Groups
PGRS	Polymorphic GC-rich Repetitive sequence
PPD	Protein Purified Derived"
PZA	Pirazinamida
R	Rifampicina
R	Arginina
RD	Região de diferença
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido Ribonucléico
RPM	Rifampicina
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil Sufato de Sódio
SM	Estreptomicina

SNP(s)	Single nucleotide polymorphisms
T	Timina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Tuberculose
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris (Hidroxi-metil) aminometano
UV	Ultra-Violeta
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WHO	World Health Organization
X	vezes
XDR-TB	Tuberculose Extensive ou Extreme Drug resistant
Y	Tirosina
Z	Pirazinamida

## Índice

Resumo	iv
Abstract	vi
Dedicatória	vii
Agradecimentos	viii
Epígrafe	x
Lista de abreviaturas, símbolos e unidades	xi
Índice	xiii
<b>1.0</b> Introdução	<b>1</b>
1.1 Tuberculose - “um breve histórico”	3
1.2 O Complexo <i>M. tuberculosis</i>	5
1.3 Epidemiologia da tuberculose	8
1.4 Transmissão e patogênese da tuberculose	10
1.5 Diagnóstico da tuberculose	12
1.6 Tratamento da doença	15
1.7 Importância da isoniazida no tratamento da tuberculose	19
1.8 Aspectos da resistência às drogas	22
1.8.1 Tuberculose multidroga resistente	23
1.8.2 Tuberculose “Extensive” ou “Extreme Drug resistant”	24
1.8.3 Bases moleculares dos mecanismos de resistência contra drogas	24
1.9 A importância do gene <i>nat</i> e da enzima <i>N</i> -acetiltransferase na resistência	28
<b>2.0</b> Objetivos	<b>30</b>
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
<b>3.0</b> Metodologia e desenho experimental	<b>31</b>
3.1 Relacionado ao estudo da variabilidade do gene <i>nat</i> de isolados de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> com intuito de verificar a presença de mutações associadas a resistência a isoniazida	31
3.1.1 Desenho do Estudo	31
3.1.2 Período de estudo	31
3.1.3 Local de estudo e instituições participantes	31
3.1.4 Seleção das amostras	34
3.1.5 Amostras	34
3.1.6 Extração de DNA	35
3.1.7 Desenho de iniciadores, condições de PCR, Seqüenciamento e PCR-RFLP	35

3.1.8	Detecção dos fragmentos de PCR e PCR-RFLP _____	40
3.1.9	Purificação dos fragmentos amplificados _____	41
3.1.10	Reação de seqüenciamento _____	41
3.1.11	Precipitação dos produtos para seqüenciamento _____	42
3.1.12	Seqüenciamento _____	42
3.1.13	Análise das seqüências _____	42
3.1.14	“Spoligotyping” _____	43
3.1.15	Análise estatística _____	44
3.2	Abordagem com o objetivo de analisar a variabilidade genética para definir marcadores que diferenciam espécies do CMTB _____	45
3.2.1	Período de estudo _____	45
3.2.2	Local de estudo e instituições participantes _____	45
3.2.3	Seleção das amostras _____	46
3.2.4	Amostras _____	47
3.2.5	Desenho de iniciadores, condições de PCR e seqüenciamento para a análise da composição genética de isolados de CMTB _____	47
3.2.6	Confirmação dos protocolos de PCR-RFLP usados neste estudo _____	53
3.2.7	Purificação dos fragmentos amplificados _____	53
3.2.8	Seqüenciamento _____	53
3.2.9	Análise das seqüências _____	53
4	Resultados _____	54
4.1	Avaliação da possível associação da variante mutante 619-A presente no gene <i>nat</i> de <i>M. tuberculosis</i> com a resistência a INH _____	54
4.1.1	Distribuição da variante mutante 619A nos isolados resistentes (R-INH + MDR) de acordo com a procedência _____	58
4.1.2	Seqüenciamento de outros genes de <i>M. tuberculosis</i> associados a resistência a INH _____	60
4.1.3	Genotipagem dos isolados de <i>M. tuberculosis</i> por “Spoligotyping” _____	63
4.1.4	Identificação de novos SNPs no gene <i>nat</i> de <i>M. tuberculosis</i> _____	64
4.2	Investigação e análise comparativa do gene <i>nat</i> em espécies do CMTB _____	68
4.2.1	Desenvolvimento de protocolo de PCR-RFLP para a genotipagem do SNP G751A _____	72
4.2.2	Especificidade do SNP G-751-A (variante mutante 751-A) para adetecção de <i>M. africanum</i> subtipo Ia _____	72
4.2.3	Melhor caracterização de isolados do CMTB _____	75
5.0	Discussão _____	87

6.0 Conclusões	103
7.0 Referências	104
8.0 Anexos	126

## 1. INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é, dentre as doenças infecciosas, a responsável pelo maior número de óbitos. A despeito da existência há mais de 50 anos de uma quimioterapia efetiva para o tratamento da doença ativa e da infecção latente com *Mycobacterium tuberculosis*, a doença ainda é considerada um problema de saúde pública em muitos países, apresentando uma taxa global de aproximadamente 2 milhões de óbitos por ano (WHO, 2006a).

Um dos maiores problemas atuais em relação ao aumento da incidência a nível mundial e conseqüentemente ao aumento da morbidade e mortalidade pela TB é o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a antibióticos. Apesar de existir um tratamento específico para a maioria dos casos de infecção com cepas resistentes, o índice de mortalidade é alto, o custo do tratamento é maior que o do tratamento convencional e a maior disseminação destas cepas pode afetar drasticamente o controle desta doença.

Dentre as drogas adotadas nos esquemas de tratamento para TB, a isoniazida (INH) pode ser apontada como sendo a mais importante por apresentar uma concentração inibitória mínima muito baixa e pelo seu efeito altamente bactericida na fase exponencial do crescimento bacteriano (Gumbo *et al.*, 2007). Sabe-se hoje que variações genéticas em genes humanos que codificam para enzimas envolvidas na biotransformação de diferentes fármacos podem contribuir para diferenças interindividuais na resposta farmacológica ou toxicológica a várias drogas, podendo resultar tanto em falência terapêutica como no desenvolvimento de reações adversas e resistência. Contudo, a seleção de bacilos que adquiriram mutações, tornando-se menos suscetíveis às drogas, ainda é o principal fator determinante para o desenvolvimento de resistência.

A partir da década de noventa, gradativamente, os mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de resistência as drogas utilizadas durante o tratamento da TB foram sendo identificados, e várias mutações em diferentes genes estão comprovadamente envolvidas na modificação da suscetibilidade para antibióticos. E no

caso específico da resistência a isoniazida (INH), foi comprovada a presença de mutações nos genes *katG*, *ahpC*, *InhA* e *kasA*. Entretanto, cerca de 25 a 50% dos isolados clínicos resistentes a INH não apresentam as mutações relatadas nestes genes, o que indica o envolvimento de outros genes, fatores e ou mecanismos neste processo. Recentemente, foi identificado em *M. tuberculosis* o *nat*<sup>1</sup> micobacteriano, um gene homólogo ao gene que codifica para a N-acetiltransferase 2 humana (NAT2) (Upton *et al.*, 2001a e b). Na bactéria, este gene também codifica para uma N-acetiltransferase, proteína que é responsável pela acetilação da INH, o que pode prejudicar a ativação da mesma pela enzima catalase-peroxidase, que é codificada por *katG*. Estudos genéticos demonstraram que este gene é polimórfico em *M. tuberculosis*, apresentando polomorfismos nas posições 619 (G→A) e 529 (C→T) e que as variantes alélicas mutantes (619A e 529T) estariam relacionadas com a resistência de *M. tuberculosis* à INH *in vitro*. (Upton *et al.*, 2001a e Sholto-Douglas-Vernon *et al.*, 2005)

Em *M. bovis* BCG, *nat* possui um papel importante na síntese de ácidos micólicos e, portanto, na geração de derivados dos componentes da parede celular, sugerindo a possibilidade de utilização deste gene como um novo alvo para drogas (Bhakta *et al.*, 2004).

Com base no exposto, o presente estudo teve como objetivos, (i) determinar a prevalência de mutação no gene *nat* (619A)<sup>2</sup>, nas cepas de *M. tuberculosis* circulantes em diferentes regiões do Brasil (ii) investigar a possível presença de outras mutações no gene *nat* de *M. tuberculosis*, (iii) avaliar a possível associação dos mesmos com a resistência à INH e (iv) avaliar a presença do gene em outras micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* (CMTB) e, quando presente, realizar uma análise comparativa das seqüências.

---

<sup>1</sup> *nat* (minúsculo e em itálico) refere-se ao gene micobacteriano, enquanto que *Nat* (maiúsculo e normal) refere-se a proteína.

<sup>2</sup> A variante 529T foi descrita durante o desenvolvimento deste trabalho e não foi incluída como objetivo principal.

### **1.1. Tuberculose - “um breve histórico”.**

A TB é uma doença milenar. Acredita-se que o gênero *Mycobacterium* se originou há mais de 150 milhões de anos atrás (Hayman, 1984). Modernas técnicas moleculares, juntamente com o seqüenciamento de partes do genoma dos isolados de *M. tuberculosis* sugerem que o ancestral do *M. tuberculosis* surgiu no leste da África há 3 milhões de anos e que possivelmente infectavam homínídeos (Gutierrez *et al.*, 2005). Entretanto, atualmente é aceito que os membros do CMTB se originaram de um ancestral comum em torno de 35.000 a 15.000 anos atrás (Brosch *et al.*, 2002 e Gutierrez *et al.*, 2005). Na década de 90, o DNA de *M. tuberculosis* foi amplificado de tecidos de múmias egípcias datadas de cerca de 5.000 a. C. (Nerlich *et al.*, 1997 e Crubezy *et al.*, 1998). Como outras doenças, a TB se difundiu com a migração, existindo relatos de 3.300 antes de Cristo (a.C.) na Índia e 2.300 a.C. na China (Daniel 2006). No Brasil a TB foi introduzida pelos portugueses e missionários jesuítas, em 1500 (Rosemberg, 1999). Na Grécia antiga, a TB era entendida como sendo um castigo divino e foi denominada por Hipócrates como tísica - do grego phthisikos - (Kritski *et al.*, 2000); este termo só foi substituído por TB em 1839, por Schoenlein, que fez referência a “tubérculo”, nome dado por Delebone em 1680, ao nódulo lesional (Rosemberg; 1999).

Somente no Século XVIII a patologia e a patogênese da TB começaram a ser entendidas. Em 1821, Laennec's descreve em detalhes esta patologia no “A Treatise on Disease of Chest”; em seguida, Villimin (1882), estabeleceu a TB como sendo uma doença transmissível, entretanto não conseguiram identificar o agente causador. Em 24 de março de 1882, Hermann Heinrich Robert Koch divulgou que havia identificado o bacilo da TB (bacilo de Koch). Foram inúmeras as contribuições de Koch para o entendimento da TB: ele desenvolveu o meio de cultura para o crescimento do organismo, demonstrou o modo de transmissão e recomendou o isolamento de pacientes com TB (Daniel, 2006). Em 1890, Koch anunciou que havia descoberto a cura: ele isolou uma substância (tuberculina), a qual supostamente protegia animais de laboratório e era capaz de deter o processo infeccioso nos já infectados, sendo logo



considerada um medicamento milagroso. Infelizmente esta substância não promovia a cura e foram muitos os casos de pacientes nos quais se desencadearam reações intensas e graves progressões lesionais o que levando rapidamente a morte. O uso da tuberculina como tratamento foi abandonado em 1908 (Rosemberg, 1999). Neste mesmo ano os cientistas Albert Calmette e Camille Guérin isolaram uma cepa atenuada que posteriormente passou a ser usada como vacina, mas somente em 1921 foi feita a primeira aplicação em crianças. Esta cepa recebeu o nome destes cientistas, sendo conhecida como bacilo Calmette-Guérin que deu origem ao nome BCG, atualmente chamado por *M. bovis* BCG (<http://portal.saude.gov.br>).

Apesar desta enfermidade atualmente ser bastante estudada e possuir um esquema terapêutico de tratamento adequado e eficiente, ainda é considerada como grave problema de saúde pública, não somente no Brasil, mas em todo mundo (WHO, 2006a). Aproximadamente um terço da população mundial está infectada com o *M. tuberculosis* e sob risco de desenvolver a doença. Anualmente, mais de 8 milhões de pessoas desenvolve TB ativa e destes, aproximadamente 1,9 milhões vem a óbito. Infelizmente a TB apresenta um caráter sócio-econômico com 90% dos casos e dos óbitos por TB ocorrendo em países em desenvolvimento, preferencialmente no grupo economicamente ativo (entre 15 - 54 anos) (WHO, 2006e).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os principais fatores que dificultam o controle da TB no mundo são: a pobreza, o crescimento populacional, os movimentos migratórios, a co-infecção TB/HIV e o aumento dos números de casos de resistência com o aparecimento das cepas resistentes a múltiplas drogas (MDR) (WHO, 2006b). Segundo Léopold Blanc e Lindsay Martinez (2006), estas condições também contribuem para o aumento da incidência a nível mundial e conseqüentemente para um aumento da morbidade e mortalidade da doença.

## **1.2. O Complexo *M. tuberculosis***

A TB é uma doença infecto-contagiosa que tem como agentes etiológicos microorganismos pertencentes ao gênero *Mycobacterium*. As micobactérias que causam TB no homem e/ou no animal são agrupadas dentro de um complexo denominado: Complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que abriga espécies próximas, com em torno de 90% de similaridade a nível nucleotídico. Entretanto, os mesmos diferem em termos de hospedeiro e patogenicidade (van Soolingen *et al.*, 1994, Mostowy *et al.*, 2002 e Huard *et al.*, 2003 e 2006). Este complexo é composto por: *M. tuberculosis*, principal agente etiológico da TB; *M. africanum*, referido como sendo a causa mais freqüente de TB pulmonar em certas regiões da África (Niemann *et al.*, 2004 e Huard *et al.*, 2006); *M. canetti* uma rara variante que foi isolada em 1960 (cepa 96-46)<sup>3</sup>, e que também infecta humanos (van Soolingen *et al.*, 1997, Goh *et al.*, 2001 e Brosch *et al.*, 2002), *M. bovis*, principal causa da TB bovina, mas também pode infectar o homem através da ingestão de leite e produtos derivados ou pelo contato prolongado com a fonte de infecção (Collins e Grange, 1987 e Wedlock *et al.*, 2002); *M. bovis* bacilo Calmette Guérin (BCG), cepa vacinal (Centers for Disease Control-CD, 1985 e Hesselning *et al.*, 2007), relacionada com infecção humana em imunodeprimidos; *M. pinnipedii* (Cousins *et al.*, 2003 e Bigi *et al.*, 2005); *M. microti*, (Huitema *et al.*, 1967, van Soolingen *et al.*, 1998 e Kremer *et al.*, 1999., van Soolingen 1999 ); *M. caprae* (Goh *et al.*, 2001 e Aranaz *et al.*, 2003) e raras variantes chamadas por dassie e orixy bacilli (não definidas oficialmente), observadas infectando animais selvagens e domésticos (Mostowy *et al.*, 2004a e 2004b, Goh *et al.*, 2006 e Huard *et al.*, 2006).

A espécie *M. tuberculosis* é a mais frequentemente associada à TB humana. Trata-se de um bacilo álcool-ácido resistente e de crescimento lento, medindo em torno de 1-5 µm, possuindo um longo tempo de geração duplicando-se em 18 a 48 horas, dependendo do meio de cultura empregado. Esta espécie também é aeróbico estrito e imóvel, capaz de sobreviver e de se multiplicar no interior de células fagocitárias. Apresenta dormência metabólica (latência), o que permite permanecer no interior da

---

<sup>3</sup> Cepa analisada neste estudo, juntamente com outras espécies representativas do CMTB.

célula infectada por um longo período; esta propriedade apresenta um importante significado clínico, já que o adoecimento é comumente associado à reativação de uma infecção antiga.

Em 1998, o genoma da cepa laboratorial H37Rv foi decifrado, o que constituiu um dos maiores marcos no estudo da TB depois das contribuições de Koch, da descoberta do BCG e dos antibióticos; permitindo um grande avanço no entendimento da patogênese da doença. A cepa laboratorial *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294) contém 4.411.529 pares de base e codifica mais de 4.000 genes. Apresenta um alto conteúdo de GC e numerosos genes que codificam proteínas de parede celular; grande parte da região codificante é direcionada à produção de enzimas envolvidas no metabolismo de lipídios e de precursores de constituintes da parede micobacteriana (Cole *et al.*, 1998). Devido ao fato da cepa *M. tuberculosis* H37Rv ter sido isolado em 1905 (Camus *et al.*, 2002), e não se tratar de um isolado recente de pacientes com TB é possível que o mesmo tenha perdido características e marcadores genéticos inerentes a infecção e a transmissão, importantes para desenvolvimento da doença. Sendo assim, o genoma de uma segunda cepa de *M. tuberculosis* isolada em 1995 de pacientes diagnosticados nos Estados Unidos (CDC1551) também foi seqüenciado (Valway *et al.*, 1998 e Fleischmann *et al.*, 2002). Atualmente, está sendo realizados o seqüenciamento do genoma de outras cinco cepas: *M. tuberculosis* cepa C (sensível a drogas e freqüentemente isolada de casos de TB em New York), uma cepa de *M. tuberculosis* pertencente à Família Haarlem (resistente a drogas e altamente transmissível), *M. tuberculosis* cepa 210 (isolada de um paciente de Texas, EUA e considerada naquele contexto temporário/regional uma das mais prevalentes e virulentas), *M. tuberculosis* cepa F11 (freqüentemente isoladas de pacientes durante uma epidemia em Western Cape na África do Sul) e o *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (derivada do isolado pulmonar humano H37, isolado em 1934, sendo extensivamente usada por diversas instituições de pesquisa em estudos de virulência micobacteriana (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)).

Além de *M. tuberculosis*, cepas de outras espécies do CMTB foram ou estão sendo seqüenciadas. Em 2003, foi anunciado o genoma completo do *Mycobacterium bovis* cepa AF2122/97 (Garnier *et al.*, 2003) e recentemente (novembro de 2006), o

genoma da cepa vacinal BCG Moreau-Rio de Janeiro foi anunciado, estando atualmente em fase de anotação, sendo um genoma seqüenciado totalmente no Brasil, no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, em parceria com a Fundação Ataufo de Paiva - FAP.

A comparação destas cepas fornece informações importantes para uma maior compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na TB humana e animal, tais como a identificação de fatores de virulência, determinantes imunogênicos, diagnóstico diferencial e estudos filogenéticos.

O avanço tecnológico e as publicações dos genomas possibilitaram uma maior compreensão da variabilidade genética dentro do CMTB. Dados atuais indicam que os organismos do CMTB e suas sublinhagens, apesar de apresentarem grande homologia, possuem pequenas diferenças adquiridas através da combinação de polimorfismos de base única (Gutacker *et al.*, 2002), como também grandes alterações em determinados loci tais como: inserções, deleções, inversões e duplicações, conhecidas como regiões de diferença (RD) (Brosch *et al.*, 2000 e Cole; 2002). Ultimamente, estas diferenças estão sendo amplamente usadas para identificação de espécie do CMTB. Polimorfismos de base única em cepas do complexo frequentemente são associados com a resistência aos fármacos utilizados no tratamento da tuberculose. Os mesmos identificados em determinados genes também estão sendo usados, sozinhos ou em combinação, como marcadores específicos para espécies CMTB ou para definir filogenia de isolados do complexo (Brosch *et al.*, 2002, Huard *et al.*, 2003 e Mostowy *et al.*, 2004a e 2004b). Como exemplo, polimorfismos de base única localizados nos genes *katG* e *gyrA* permitem agrupar os componentes do CMTB em três grupos genéticos "Principal Genetic Groups" (PGG). A combinação destes polimorfismos nestes genes indica a ancestralidade dos isolados.

A análise de RDs em conjunto com a tipagem molecular e a análise de variantes específicas representa uma potente estratégia para o estudo da evolução do bacilo da tuberculose, bem como para o desenvolvimento de protocolos para o diagnóstico e identificação dos membros do CMTB.

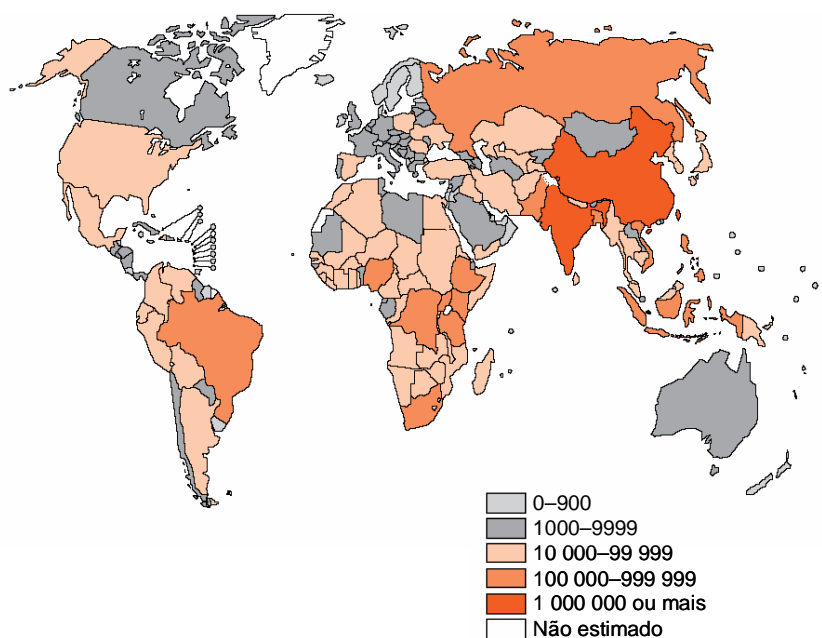
### **1.3. Epidemiologia da tuberculose**

Diariamente, cinco mil pessoas morrem por TB, o que significa aproximadamente dois milhões de mortes ao ano. Segundo estimativas da WHO, em 2004 ocorreram 8,9 milhões de novos casos de TB (Figura 1.1), o que corresponde a uma incidência de (140/100.000 habitantes); destes, 3.9 milhões apresentaram baciloscopia positiva (62/100.000), forma mais infecciosa da doença. Contudo, apenas 4,9 milhões de casos novos e 2,2 milhões dos casos com baciloscopia positiva foram notificados (WHO, 2006a). Mais de 80% dos casos ocorrem na África, no sudeste da Ásia e na região oeste do Pacífico (Figura 1.1). O Brasil ocupa a 16ª posição na lista dos 22 países que apresentam o maior número de casos de TB no mundo e, juntamente com o Peru, representa 50% de todos os casos de TB da América Latina.

No Brasil, as estatísticas apontam uma incidência de TB de 60/100.000 habitantes e uma prevalência de 77/100.000 habitantes com um índice de mortalidade de 7.8/100.000 habitantes (WHO 2004). Dados do Ministério da Saúde do mesmo ano registraram um número total de 80.515 casos de TB (todas as formas clínicas) em todo o território nacional com a seguinte distribuição: Região Norte, 7.319; Nordeste, 23.315; Sul, 9.106; Sudeste, 36.054 e Centro-Oeste: 3.585. Observa-se que, de todas as macro-regiões do País, a região Sudeste é a que concentra o maior número de casos, sendo os estados de São Paulo e do Rio de Janeiro responsáveis por 36,4 % de todos os casos. Como em outras partes do mundo, a TB no Brasil é a segunda causa de morte por doenças infecciosas, perdendo somente para a AIDS (<http://portal.saude.gov.br/portal/svs>).

Atualmente, técnicas de tipificação molecular têm sido amplamente utilizadas como ferramentas epidemiológicas (epidemiologia molecular), possibilitando um melhor entendimento do dinamismo da transmissão. Estas técnicas são efetivas quando associadas com os dados de epidemiologia convencionais e permitem definir fatores de risco que contribuem para a transmissão da TB. Elementos repetitivos e seqüências de inserção são freqüentemente usados como alvos para a diferenciação entre cepas micobacterianas. As principais seqüências são as seqüências de inserção *IS6110* e *IS1081*, as regiões DR “Direct Repeat”, VNTR “Variable Number of Tandem Repeats” e

os PGRS “Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence”. Atualmente, diversas técnicas moleculares estão sendo usadas na genotipagem, tais como o Polimorfismo do Comprimento dos Fragmentos de Restrição (IS6110-RFLP - “Restriction Fragment Length Polymorphism” (van Embden *et al.* 1993), Spoligotyping “spacer oligonucleotide typing” (Moström *et al.*, 2002), VNTR-PCR (Kremer *et al.*, 1999), MIRU-VNTR (Lee *et al.*, 2002) e DRE-PCR “Double-Repetitive Element-PCR” (Friedman *et al.*, 1995). Porém, cada técnica apresenta características próprias, com vantagens e desvantagens, sendo necessário selecionar a(s) técnica(s) adequada(s) para a questão epidemiológica a ser abordada (Moström *et al.*, 2002).



\* Adaptado do WHO REPORT 2006 Global Tuberculosis Control Surveillance, Planning, Financing/WHO 2006

Figura 1.1: Estimativa de casos novos de TB ( todas as formas) 2004<sup>4</sup>

<sup>4</sup> Dados referentes a 2004, publicados em 2006.

#### **1.4. Transmissão e patogênese da tuberculose**

A tuberculose é transmitida pelo ar, por pessoas com TB pulmonar (bacilíferos) ou de laringe não tratados, ao tossir, espirrar, conversar ou cantar (Riely 1961). Os bacilos são inalados atingindo a parte distal dos alvéolos, onde são fagocitados pelos macrófagos desencadeando uma cascata de eventos que resultam na contenção da infecção ou a progressão para a doença ativa, podendo atingir todos os órgãos via disseminação hematogênica. Contudo, a manifestação clínica mais comum da TB é a forma pulmonar em indivíduos soro negativos para o HIV, enquanto em soropositivos, a TB extra-pulmonar corresponde a 20% dos casos de TB (Shafer *et al.*, 1996). Curiosamente, 90% das pessoas com TB latente nunca desenvolvem a doença ativa (Flynn, 2001)

A patogênese da TB envolve três fases: (i) transmissão e aquisição da infecção, (ii) latência e (iii) progressão da infecção latente para doença ativa. O risco de desenvolvimento da TB ativa varia de acordo com o tempo de infecção, idade e imunidade do hospedeiro. Inúmeros estudos sugerem a existência de fatores genéticos humanos relacionados à predisposição para o desenvolvimento da TB, dentre os quais podemos citar alguns alelos de HLA (Selvaraj *et al.*, 1998a e 1998b e Lombard *et al.*, 2006) e polimorfismos nos genes que codificam SLC11A1, antigo NRAMP1 (Soborg *et al.*, 2002 e Taype *et al.*, 2006), receptor de Vitamina D3 (VDR) (Selvaraj *et al.*, 2000 e Lombard *et al.*, 2006) e interleucina 1(IL-1) (Frieden *et al.*, 2003 e Gómez *et al.*, 2006).

Os sintomas da TB caracterizam-se por tosse com expectoração por mais de três semanas e hemoptise, dor no peito, falta de ar, suor noturno e febre. Na doença avançada, pode ocorrer uma perda de peso excessiva. Estes sintomas são facilmente confundidos com pneumonia. Nas formas extra-pulmonares, o quadro clínico da TB varia de acordo com a localização e a gravidade do caso (Brasil, 2002a) afetando na maioria das vezes jovens e adultos (faixa etária de 15–50), porém, com o aumento da expectativa de vida, este perfil vem mudando e a tuberculose começa a ser detectada também em idosos.

A infecção pelo HIV é considerada hoje um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento da TB ativa, devido ao comprometimento da resposta imunológica do paciente, afetando significativamente a progressão da infecção por *M. tuberculosis*. A infecção em pessoas imuno competentes normalmente resulta em uma infecção latente e não transmissível; entretanto, indivíduos co-infectados com HIV apresentam um alto risco de progressão para a TB ativa. Nos pacientes HIV positivos ocorre uma redução dos linfócitos Th1 e, conseqüentemente, uma maior suscetibilidade à TB quando comparada à dos pacientes com sorologia negativa para o HIV. Na fase inicial da doença, os pacientes com HIV apresentam TB com características clínicas semelhantes às dos demais pacientes não infectados pelo HIV. Já nos pacientes em fase avançada da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), os sintomas são clinicamente diferentes e inespecíficos, compostos por manifestações que ocorrem no decorrer da própria infecção pelo HIV e que são características das infecções oportunistas. Apresentam teste tuberculínico negativo, exame de escarro também negativo, presença de TB em locais extra-pulmonares (gânglios, pleura, pericárdio) e, nas formas pulmonares, ocorre apresentação radiológica atípica, com presença de infiltrados que também estão presentes em outras patologias pulmonares. Com isso, o diagnóstico torna-se mais difícil, aumentando o risco de transmissão da TB e conseqüentemente agravando o quadro de morbidade e mortalidade a ela associadas. Estudos brasileiros e internacionais mostram que houve um aumento significativo no número de casos de TB devido à ocorrência de infecção pelo HIV (Reid *et al.*, 2006 e Carvalho *et al.*, 2006). Em São Paulo, 42,4% dos pacientes com TB testados para HIV apresentaram co-infecção (Carvalho, 2006), mostrando claramente a influência do HIV na epidemiologia da TB.



### **1.5. Diagnóstico da tuberculose**

Uma das primeiras abordagens para o diagnóstico (Tabela 1.1) da TB pulmonar é a pesquisa bacteriológica, na qual se procede o exame direto de um esfregaço utilizando a técnica de coloração de Ziehl-Neelsen (especial para micobactérias). Na pesquisa bacteriológica, avalia-se a eventual presença de bacilos álcool-ácido resistentes (baar). É uma metodologia rápida que apresenta uma baixa sensibilidade e especificidade; somente 50%-70% dos pacientes com tuberculose apresentam resultados positivos de baciloscopia (Nolte, 2006).

Dentre as metodologias empregadas no diagnóstico da TB, a cultura é uma das mais sensíveis, porém a mais demorada, pelo fato do *M. tuberculosis* apresentar um tempo de geração longo. A cultura é feita do material da lesão (escarro, fluidos ou tecidos) para o isolamento e a identificação do bacilo. O meio de cultura utilizado para cultura padrão é o Löwenstein-Jensen a uma temperatura de 37°C, condições que proporcionam o crescimento da maioria das micobactérias. Outros meios de cultura à base de ágar estão disponíveis comercialmente, sendo mais usados o Middlebrook 7H10 e o 7H11. Meios líquidos para o isolamento primário também são usados, como Middlebrook 7H9 e 7H12. Após o crescimento, dependendo do meio de cultura utilizado, é feita a análise morfológica e testes bioquímicos complementares para a identificação da espécie micobacteriana. Para a identificação do *M. tuberculosis*, são utilizados o teste de produção de niacina, de redução de nitrato, a termo inativação da catalase a 68°C, e provas de crescimento na presença de agentes inibidores (teste de sensibilidade). Métodos radiométricos (semi-automatizados) são também utilizados, consistindo basicamente na detecção de CO<sub>2</sub> radioativo liberado pela utilização do ácido palmítico, presente no meio de cultura. É um teste rápido e sensível, levando aproximadamente 14 dias para a detecção do bacilo. No Brasil, a cultura e os testes de sensibilidade são indicados apenas nos casos de suspeita de TB com baciloscopia negativa para o diagnóstico das formas extra-pulmonares em pacientes soropositivos para o HIV, nos casos de falha terapêutica ou recidiva, e quando houver suspeita de micobacteriose não tuberculosa (II Consenso Brasileiro de Tuberculose, 2004).

A radiografia do tórax é uma metodologia auxiliar no diagnóstico da TB pulmonar, uma vez que esta forma da doença causa anormalidades radiológicas na maioria dos pacientes. Outros métodos podem ser utilizados no diagnóstico da TB, dependendo da complexidade do caso e do custo efetivo, tais como: ressonância magnética e/ou tomografia computadorizada, escarro induzido, broncoscopia ou biópsia e técnicas de biologia molecular como a Reação de Polimerase em Cadeia (PCR).

A prova tuberculínica ou PPD “Protein Purified Derived” é um exame complementar, que consiste na aplicação intradérmica do PPD e na resposta imune celular desenvolvida após a aplicação. A positividade do teste indica infecção prévia por *M. tuberculosis*, porém não permite a distinção da infecção latente da doença, sendo que o teste negativo não afasta a possibilidade de infecção (tabela 1.1).

As técnicas de biologia molecular são altamente sensíveis e baseadas na amplificação dos ácidos nucleicos pela PCR; são, porém, técnicas complexas e caras devendo ser utilizadas apenas de forma complementar aos métodos de diagnóstico tradicional. Atualmente, somente dois kits comerciais estão aprovados pela FDA “Food and Drug Administration-USA” para uso em amostras paucibacilares: o AMTD2 (GenProbe) e o Amplicor (Roche). Outras técnicas moleculares são amplamente empregadas em laboratórios de pesquisa, tanto para auxiliar o diagnóstico, quanto para a identificação no nível de espécie de organismos pertencentes ao CMTB em isolados clínicos, para a identificação de micobactérias em geral, para a detecção de resistência a drogas e para a tipagem com objetivo de diferenciação entre a reativação e a reinfecção exógena, assim como da transmissão e contaminação interna em laboratórios. Muitos marcadores moleculares estão sendo identificados e introduzidos no diagnóstico complementar da tuberculose.

**Tabela 1.1:** TB infecção X TB doença

Infecção por TB	TB Doença (pulmonar)
<b><i>M. tuberculosis</i></b>	
<b>PPD Positivo</b>	
Sem sintomas	Tosse, febre, diminuição do peso.
Radiografia do tórax normal	Radiografia do tórax anormal
Baciloscopia e cultura negativa	Baciloscopia e cultura normalmente positiva*
Não transmissível	Transmissível antes do tratamento
Não é considerado como um caso de TB	Caso de TB confirmado

\*

Em pacientes de TB infectados com HIV, freqüentemente a baciloscopia é negativa.

## **1.6. Tratamento da doença**

O cenário mundial da TB mudou completamente com a introdução da quimioterapia e a quimioprofilaxia. O primeiro antibiótico e agente bactericida efetivo contra a TB, a Estreptomicina (SM) foi descoberto em 1944 por Albert Schatz e seus colaboradores, seguida do ácido paramino-salicílico (PAS) em 1949 e poucos anos depois da isoniazida (INH) em 1952 e da rifampicina (RPM) em 1957 (Daniel, 2006). Outro fator que contribuiu para a diminuição da incidência de TB foi à implementação da vacinação intradérmica com BCG em 1973, a qual se tornou obrigatória para menores de um ano de idade em 1976. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cura do paciente com baciloscopia positiva é a melhor medida preventiva contra a TB.

O tratamento da TB preconizado pela OMS requer a associação de drogas (multidrogaterapia), que visa reduzir a probabilidade de seleção de mutantes resistentes a uma ou mais drogas. Os fármacos utilizados no tratamento da TB são divididos em: i) fármacos de primeira linha ou primeira escolha que incluem a isoniazida (INH), rifampicina (RPM), pirazinamida (PZA) e o etambutol (EMB) (Figura 1.2) e ii) fármacos de segunda linha ou segunda opção, que são normalmente utilizados em caso de falência do tratamento, resistência micobacteriana, ou intolerância aos fármacos de primeira linha. Os fármacos de segunda linha incluem a amicacina (AMK), levofloxacina (LVX), ciprofloxacina (CIP), capreomicina (CAP), cicloserina (CS), etionamida (ETH), ciclosporina (CSA) e o ácido p-aminosalicílico (PAS), que são menos efetivos e mais tóxicos dos que os de primeira linha (WHO, 2006b e Zhang *et al.*, 2006).

O tratamento adequado da TB visa à cura sem recidiva, a prevenção do óbito associado à TB ou as suas complicações tardias e ao bloqueio da transmissão para outros indivíduos prevenindo o surgimento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a drogas (Brasil; 2001). O tratamento da TB latente ou quimioprofilaxia é apontado como um dos fatores para a prevenção e o combate da TB, sendo adotado quando há um alto risco de desenvolvimento da doença. Isto inclui contatos de casos com TB ativa, pessoas infectadas com HIV ou em imunossuprimidos e casos de viragem do PPD

(infecção recente). A isoniazida é a droga de escolha na quimioprevenção da TB, e vários são os estudos que comprovam a eficiência desta droga com a diminuição do risco de desenvolvimento da TB ativa. Em casos de intolerância a INH e/ou a infecção com cepa resistente a INH, é recomendado o uso de RPM (Laserson *et al.*, 2005).

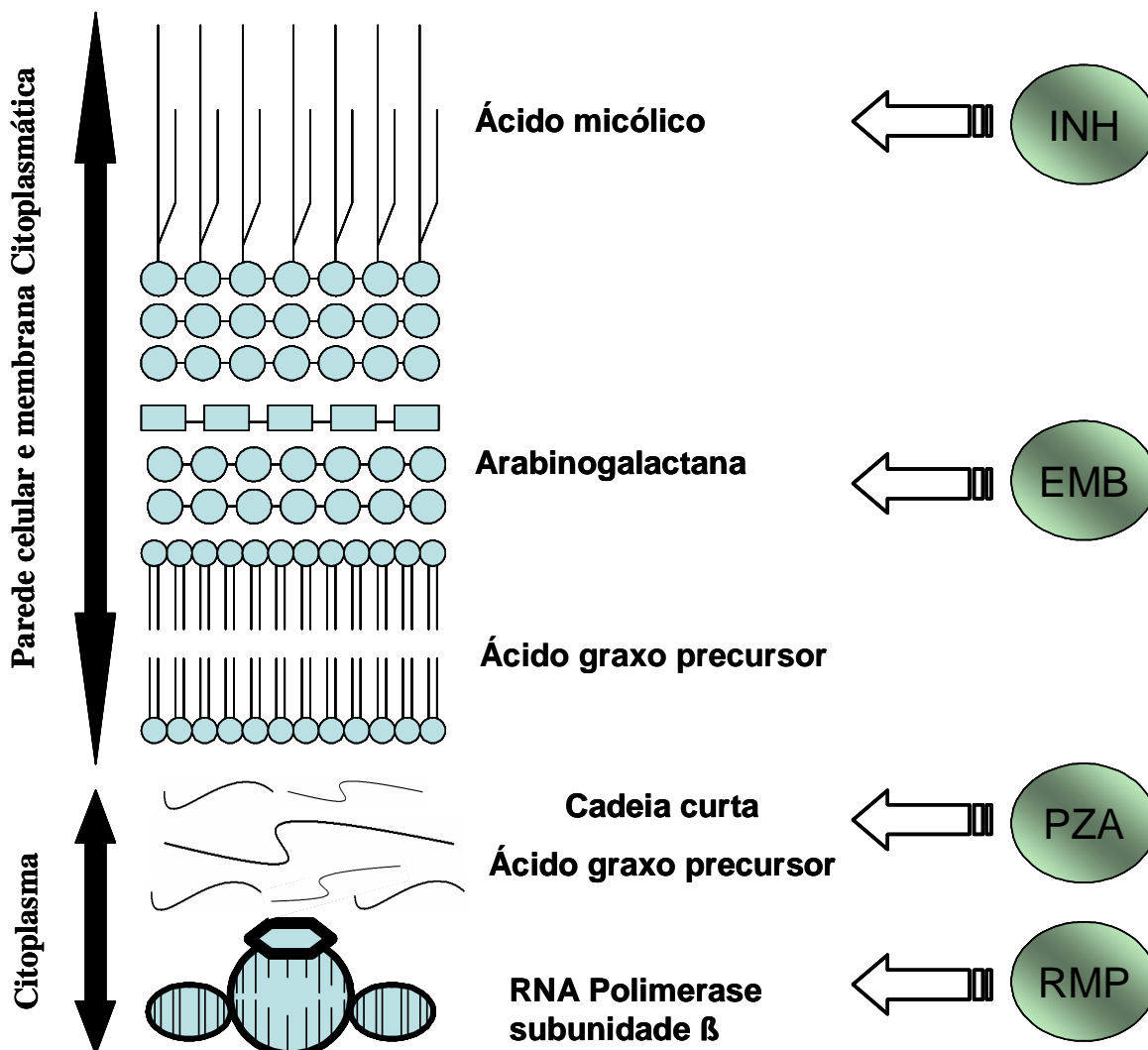


Figura 1.2: Locais de ação das principais drogas anti-TB. Adaptado de du Toit, 2006.

O esquema atual de tratamento para TB pulmonar ativa no Brasil, preconizado pelo Ministério da Saúde, considerado esquema de 1ª linha (esquema I), é composto por três drogas (Figura 1.2). O tratamento inclui uma fase inicial (ataque) que consiste na associação de isoniazida, rifampicina e pirazinamida (diariamente por 2 meses) e uma de continuação (manutenção) com isoniazida e rifampicina por mais 4 meses (diariamente ou 3 vezes na semana), sendo indicado para os casos de TB sem uso prévio de medicação e nos casos de recidiva depois de curados, desde que este tenha tido alta por cura há mais de cinco anos (Brasil, 2002b). Outros esquemas alternativos podem ser adotados (Tabela 1.2), utilizando fármacos de segunda linha em caso de falha terapêutica ou resistência, porém o custo é elevado e os efeitos colaterais são maiores.

Um dos maiores problemas no tratamento e controle da TB é o tempo extremamente longo, muitos pacientes interrompem o tratamento quando há melhora dos sintomas, mesmo não estando curados. A interrupção do tratamento pode causar recidiva, voltando assim o paciente a transmitir a doença favorecendo o surgimento da resistência. A resistência às drogas utilizada no combate a TB é considerada um risco ao controle da doença, e dentre os maiores problemas ligados à resistência predominam (i) a disseminação das cepas resistentes e o aumento da resistência primária e (ii) o reduzido número de fármacos efetivos disponíveis para o tratamento.

O fato das drogas usadas no tratamento da TB terem sido desenvolvidas há cerca de 40 anos, associado ao aumento da incidência de casos de TB MDR e a pandemia de HIV, aumentou a necessidade do desenvolvimento de novas drogas. A busca de novos medicamentos tem como metas, a diminuição do tempo de tratamento, a redução da toxicidade associada com as drogas e a redução da frequência e da quantidade de droga necessária durante o tratamento. O enfoque destas pesquisas inclui modificações químicas das drogas existentes e a identificação de novos alvos. Atualmente, vinte e sete novos componentes estão em teste e a OMS espera que, em 2010, pelo menos duas drogas sejam registradas e indicadas para o tratamento da TB, encurtando o tratamento de seis para três a quatro meses (WHO, 2006d). Dentre estas drogas, a “diarylquinoline” e a PA842 mostraram ter uma alta atividade contra *M.*

*tuberculosis*. A imunoterapia com vacinas de DNA e a associação de citocinas com a quimioterapia atual também estão sendo estudadas, sendo caminhos alternativos promissores para o tratamento da TB (Zhang *et al.*, 2006).

**Tabela 1.2:** Esquemas de tratamento preconizados pelo Ministério da Saúde.

Esquema Indicado:	Fase	Duração	Drogas
<b>Esquema I- 2RHZ/RH</b> Doentes virgens de tratamento com baciloscopia positiva; tuberculose miliar; tuberculose extra torácica, exceto os portadores de formas meningoencefálicas.	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida
	2 <sup>a</sup>	4 meses	Rifampicina Isoniazida
<b>Esquema II- 2RHZ/7RH</b> Forma meningoencefálica.	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida
	2 <sup>a</sup>	7 meses	Rifampicina Pirazinamida
<b>Esquema I reforçado – 2RHZE/4RHE</b> Recidiva após cura ou retorno após abandono do esquema I.	1 <sup>a</sup>	2 meses	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Estreptomicina
	2 <sup>a</sup>	4 meses	Rifampicina Isoniazida Estreptomicina
<b>Esquema III- 3SEtEZ / 9EtE</b> Falência do tratamento dos esquemas I e I reforçado.	1 <sup>a</sup>	3 meses	Estreptomicina Pirazinamida Etionamida Etambutol
	2 <sup>a</sup>	9 meses	Etambutol Etionamida

### **1.7. Importância da isoniazida no tratamento da tuberculose**

A INH (Figura 1.3) é uma das principais drogas usadas para o tratamento da TB e também para a quimioprevenção da doença. É um derivado sintético do ácido isonicotínico que, quando administrado, é rapidamente absorvido pelo aparelho digestivo, sofrendo significativa biotransformação (acetilação) no fígado. Distribui-se em diversos tecidos e fluidos corporais, incluindo o líquido cefalorraquidiano, onde alcança níveis equivalentes a 20% daqueles presentes no sangue; na presença de inflamação das meninges, estes níveis aumentam, igualando-se às concentrações séricas. Sua concentração inibitória mínima é de 0,01-0,20 µg/mL e sua meia vida é de uma hora nos acetiladores rápidos, e de 3 a 5 horas nos acetiladores lentos, elevando-se ainda mais na presença de hepatopatias.

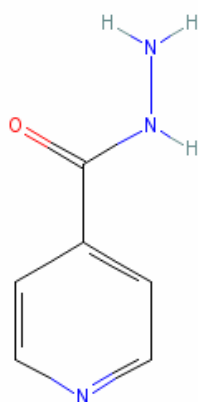


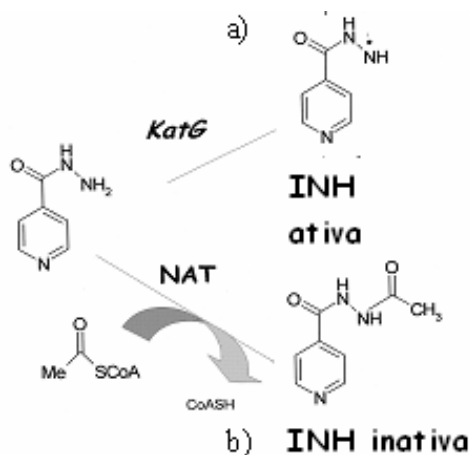
Figura 1.3: Estrutura química da INH



A inibição da síntese de ácidos micólicos, componente importante da parede bacteriana, foi um dos primeiros mecanismos de ação descritos para a isoniazida. A rapidez com que se evidencia seu efeito bactericida é fundamental na redução da população bacteriana; normalmente, esquemas terapêuticos que a contenham são mais rápidos e eficazes que esquemas com rifampicina sem isoniazida (Botha *et al.*,1996 e Donald *et al.*,1997). A isoniazida é usada tanto no esquema atual do tratamento da tuberculose ativa como na quimioprofilaxia. Ela erradica rapidamente a maioria dos bacilos em replicação nas duas primeiras semanas de tratamento; juntamente com a rifampicina mata mais de 99% dos bacilos após dois meses de tratamento (Mitchison,1985, Iseman *et al.*,1989 e du Toit *et al.*, 2006 ).

A isoniasida entra na célula micobacteriana por difusão passiva (Bardou *et al.*, 1998), não apresentando por si só atividade tóxica para micobactérias. Ela porém atua como uma pró-droga; como tal, necessita de uma série de biotransformações que se iniciam por sua ativação no citoplasma do *M. tuberculosis* através da enzima catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG* (Middlebrook 1952; 1954 e Zhang *et al.*, 1992). Esta enzima é multifuncional e apresenta outras atividades (Wengenack *et al.*,1999; Singh *et al.*, 2004). Somente após esta ativação, a droga começa a atuar, inibindo a síntese de ácidos micólicos e, conseqüentemente, a síntese da parede celular bacteriana (Davidson e Takayama *et al.*, 1979). Assim, a atividade da isoniazida é específica e eficaz contra *M. tuberculosis*, apresentando baixa atividade contra patógenos oportunistas do complexo *M. avium*. A quimioprofilaxia para a tuberculose é realizada através da administração a isoniazida, sendo empregada com a finalidade de evitar que um indivíduo recentemente infectado desenvolva a tuberculose ativa. A isoniazida é extremamente importante, tanto no esquema de tratamento convencional, como nos esquemas alternativos e na quimioprofilaxia pelo seu rápido mecanismo de ação. Apenas três horas após sua administração, a concentração inibitória mínima (MIC) no sangue atinge valores 50 a 90 vezes acima da necessária para a destruição do *M. tuberculosis*. Assim, a isoniazida possui um forte poder bactericida associado a uma ação esterilizante. Dentre as drogas administradas no tratamento da tuberculose, a isoniazida é a que menos apresenta efeitos colaterais indesejáveis e de menor custo.

Sabe-se que polimorfismos genéticos no hospedeiro podem contribuir para diferenças interindividuais na resposta farmacológica ou toxicológica às drogas. No caso específico da isoniazida, sua biotransformação no hospedeiro ocorre através da acetilação da mesma pela ação da enzima N-acetiltransferase 2, codificada pelo gene *nat2*. A capacidade do hospedeiro de acetilar a isoniazida está diretamente relacionada à biodisponibilidade da mesma para posterior ação na bactéria (Figura 1.4). A acetilação reduz extremamente a atividade terapêutica da droga, podendo portanto, refletir na eficácia ou falha terapêutica (Hearn *et al.*, 2004). O metabolismo da isoniazida está sob o controle genético, e a população humana pode ser dividida em três grupos (acetiladores rápidos, intermediários e lentos), dependendo da taxa em que ocorre sua metabolização da isoniazida. No caso dos acetiladores rápidos, a droga é acetilada e excretada mais rapidamente e nestes casos, deve-se fazer uma correção da dose administrada a fim de se evitar uma provável falha ou diminuição da eficácia terapêutica.



**Figura 1.4:** Esquema mostrando a ativação e a inativação da isoniazida. a) Ativação pela proteína catalase peroxidase (produto do gene *katG*) e b) A enzima NAT que acetila isoniazida, gerando uma droga terapêuticamente inativa (modificado de Sandy *et al.*, 2005).

### **1.8 Aspectos da resistência às drogas anti TB.**

A resistência às drogas utilizadas no tratamento da TB representa um dos maiores problemas para o controle da doença. Especificamente, a disseminação das cepas resistentes com conseqüente aumento da resistência primária e o reduzido número de fármacos efetivos disponíveis para o tratamento são os pontos mais preocupantes. O *M. tuberculosis* apresenta uma resistência intrínseca para muitos antibióticos e quimioterápicos e esta resistência se dá em parte pela impermeabilidade relativa do envelope celular rico em ácidos micólicos (Warner e Mizrahi, 2006).

A resistência pode ser classificada como adquirida ou secundária, quando os bacilos adquirem resistência durante o tratamento, ou resistência primária, quando o paciente já se infecta com bacilos resistentes. Pessoas que apresentam resistência primária freqüentemente apresentam falhas no tratamento com drogas designadas para o tratamento das cepas sensíveis, tornando-se progressivamente mais resistentes.

O *M. tuberculosis* apresenta uma freqüência de mutantes naturalmente resistentes às drogas, sendo a razão entre bacilos resistentes e sensíveis de  $1 \times 10^{-6}$  para isoniazida,  $1 \times 10^{-8}$  para rifampicina e menos do que  $1 \times 10^{-14}$  para ambas simultaneamente. Essa resistência aos medicamentos deve-se a mutações genéticas nas populações bacilares, fato mostrado desde o aparecimento das drogas antituberculosas (Brasil, 2005); entretanto, nesta época, este fato não provocou grandes preocupações já que esquemas terapêuticos com mais de dois fármacos permitiam a cura. Atualmente com o surgimento de cepas MDR a TB se tornou um risco para o controle global da tuberculose, pois contribui para o aumento da proporção de morte por TB, estando freqüentemente associada à infecção pelo HIV (Rossetti; 2002). Em países com altos números de TB e HIV, grande parte destes são resistentes às drogas de primeira linha (Cohen *et al.*, 2006).

Na maioria das vezes, a resistência (mono ou multi) é o resultado do acúmulo de mutações em diferentes genes presentes no *M. tuberculosis*. Contudo, outros fatores, como mutações em genes humanos associadas a diferenças na biotransformação de diferentes drogas, possam também estar envolvidas. No caso do patógeno, diferentes

estratégias são utilizadas para o desenvolvimento de resistência aos antibióticos. Estas estratégias se dividem basicamente em três grupos: i) mecanismo de barreira (redução da permeabilidade e bombas de fluxos); ii) degradação ou inativação de enzimas envolvidas na biotransformação dos fármacos e iii) modificação do alvo do fármaco por mutações em um gene chave. No caso das micobactérias, principal mecanismo de resistência às drogas é consequência de mutações espontâneas que ocorrem em genes que codificam para um determinado alvo das drogas ou de enzimas envolvidas na ativação destas drogas. Acredita-se que, quando a resistência surge durante a quimioterapia, a mesma seja consequência da seleção de mutantes resistentes, pré-existentes na população infectante. Para o desenvolvimento de uma população resistente aos antibióticos, é necessária, a combinação de dois elementos chaves: (i) a presença de um antibiótico capaz de eliminar a maioria das bactérias presentes sensíveis ao antibiótico e (ii) condições necessárias para permitir a sobrevivência dos organismos resistentes ao antibiótico. Estas bactérias resistentes apresentam determinantes genéticos que codifica o tipo e a intensidade da resistência que serão expressas pela bactéria (Alanis, 2005).

### **1.8.1 Tuberculose multidroga resistente**

A tuberculose multidroga resistente (TB-MDR) é definida como os casos em que a doença é causada por cepas resistentes pelo menos a isoniazida e rifampicina, duas das principais drogas no tratamento da doença. A TB-MDR, na maioria das vezes é na decorrente do tratamento inapropriado que pode ser dividido em duas categorias: (i) prescrição do tratamento errado (droga, intervalo das doses e duração) ou (ii) não aderência ao tratamento por parte dos pacientes (Fraser *et al.*, 2006 e Di Perri e Bonora, 2004).

A presença de cepas resistentes a multiplas drogas, reflete deficiências no controle da tuberculose, o que dificulta o tratamento e a prevenção da doença, causando sua difusão. É necessário conhecer a suscetibilidade aos diferentes fármacos de uma linhagem individual a fim de se iniciar um tratamento com uma

combinação de fármacos mais adequada. Aproximadamente 450.000 casos novos de TB-MDR emergem a cada ano no mundo (WHO, 2006f) e a via mais comum para o desenvolvimento da mesma, inicia-se com a monoresistência a isoniazida. O advento da TB-MDR resulta em um considerável aumento no custo do tratamento, bem como na possibilidade de se tornar incurável. Recentemente foi reportado que “super-cepas” resistentes a pelo menos três ou quatro drogas usadas no tratamento da tuberculose correspondem a mais de 79% de todos os casos de tuberculose resistente à múltiplas drogas (Warner e Mizrahi, 2006).

No Brasil, o número de casos de resistência múltipla notificados no período de 2000 a 2005 foi de 1.907; destes, 1.246 foram provenientes da Região Sudeste (Brasil, 2005). Segundo Souza *et al.*, (2006), pacientes com história de tratamento prévio para TB apresentam catorze vezes mais chances de desenvolver resistência múltiplas.

### **1.8.2 Tuberculose “Extensive” ou “Extreme Drug resistant”**

Em Outubro de 2006, a OMS apontou uma grande preocupação com relação a cepas de *M. tuberculosis* denominadas como “Extensive ou Extreme Drug resistant” (XDR-TB), sendo cepas, além de MDR, que apresentam resistência contra fluoroquinolonas e pelo menos a uma das três drogas de segunda linha injetáveis (capreomicina, canamicina e amicacina). A XDR-TB foi relatada em 10% dos casos de MDR detectados (WHO, 2006c). No sul da África, 54 de 544 casos de tuberculose, foram definidos como sendo “Extreme Drug Resistant” e 52 dos mesmos vieram a óbito (WHO, 2006c)

### **1.8.3 Bases moleculares dos mecanismos de resistência contra drogas**

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é usualmente adquirida por alterações no alvo dos fármacos como conseqüência de mutações nos genes que codificam esses alvos (Tabela 1.3), tanto para as drogas de primeira, quanto para as de segunda linha. O entendimento das

bases moleculares da resistência é de grande importância para o desenvolvimento de novas estratégias para o controle e tratamento da TB. O mecanismo de resistência a isoniazida é complexo, porém o bloqueio de sua ativação por mutações no gene *katG* que alteram ou eliminam a atividade catalase-peroxidase estão associados a altos níveis de resistência. A mutação S315T é mais comumente encontrada em cepas resistentes a INH; o produto deste gene mutado reduz a capacidade de ativação da mesma pela enzima catalase-peroxidase. Análise molecular de isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida tem demonstrado uma associação direta entre a ocorrência de mutações e a resistência. Mutações relacionadas com a resistência à isoniazida já foram descritas em regiões específicas de 4 diferentes genes: (i) gene *katG* que codifica para a enzima catalase-peroxidase; (ii) *inhA*, que codifica para uma proteína com potencial enzimático envolvida na síntese de ácidos micólicos e conseqüentemente com a síntese da parede celular (Banerjee *et al.*, 1994), (iii) o gene *ahpC*, que codifica para a enzima hidroperoxidase, que funciona como um componente antioxidante (Sherman *et al.*, 1995) e (iv) *kasA*, que codifica para a enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP sintetase, que juntamente com o produto da *inhA* formam um complexo enzimático envolvido na síntese dos ácidos graxos e micólicos. Segundo Soini e Musser *et al.* (2001), 75% a 85% dos isolados de *M. tuberculosis* resistentes à isoniazida apresentam mutações nos genes *katG* e *inhA* associadas a perda da atividade de catalase-peroxidase (Dobner *et al.*, 1997, Musser *et al.*, 1996 e Wengenak *et al.*, 1999), a qual também é responsável pela ativação endógena da isoniazida. Contudo, segundo Rossetti *et al.*, (2002), nem todas as cepas MDR brasileiras apresentam estas mutações indicando que outros genes estão possivelmente envolvidos com a resistência à isoniazida.

Resistência a rifampicina tem aumentado ultimamente e promovido o aparecimento de cepas MRD. A rifampicina interage diretamente com a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase, e algumas mutações neste locus conferem trocas conformacionais, impedindo a ligação do fármaco, resultando na resistência. Diferentes mutações no gene *rpoB*, localizadas em uma região central de 81 pares de bases (pb), são associadas à cepas de *M. tuberculosis* resistentes a rifampicina. Nos isolados resistentes a pirazinamida, acima de 70 % apresentam mutações no gene *pncA*, que

codifica a enzima pirazinamidase, a qual converte o fármaco em sua forma ativa (Morlock *et al.*, 2000). Dificilmente, a resistência à rifampicina ocorre isolada, estando na maioria das vezes associadas a outros fármacos, principalmente a isoniazida, sendo a resistência a rifampicina apontado com um marcador para tuberculose resistente a múltiplas drogas, (Rossetti *et al.*, 2002). A resistência ao etambutol está associada a mutações em múltiplos códons no gene *embB* que resulta em proteínas diferentes (Ramaswamy e Musser, 1998). A resistência a estreptomicina é associada a dois genes, o *rpsL* que codifica a proteína ribossomal S12, sendo este o principal, e o gene *rrs* que codifica o RNA 16S. Outras drogas usadas no tratamento da tuberculose, seus alvos, mecanismo de ação e gene envolvidos na resistência são também mostrados na Tabela 1.3.

**Tabela 1.3:** Drogas usadas no tratamento da tuberculose, seus alvos, mecanismos de ação e genes envolvidos na resistência.

Droga	MIC (µg/ML)	Mecanismo de ação	Alvos	Genes envolvidos na resistência
Isoniazida	0,01-0,20	Inibição da parede celular e síntese de ác. micólicos	<i>inhA</i>	<i>katG, inhA, oxy-R-ahpC, kasA, ndh?, nat?</i> .
Rifampicina	0,05-0,50	Inibição da síntese de RNA	RNA polimerase subunidade β	<i>rpoB</i>
Pirazinamida	20-100 (pH 5 ou 6)	Depleção da energia de membrana	Metabolismo da energia de membrana	<i>pncA</i>
Etambutol	1-5	Inibição da parede celular e a síntese de arabinogalactan	Arabinosil transferase	<i>embCAB</i>
Estreptomicina	2-8	Inibição da síntese de proteínas	Proteína ribossomal 12 e 16S rRNA	<i>rpsL, rrs</i>
Kanamicina	1-8	Inibição da síntese de proteínas	16S rRNA	<i>rrs</i>
Capreomicina	4	Inibição da síntese de proteínas	16S rRNA, 50S ribossomo, rRNA metiltransferase ( <i>tlyA</i> ).	<i>rrs, tlyA</i>
Fluoroquinolonas	0,2-4,0	Inibição da síntese de DNA	DNA girase	<i>gyrA, gyrB</i>
Etionamida	0,6-2,5	Inibição da síntese de ác. micólico	<i>inhA</i>	<i>inhA, etaA/ethA</i>
Ácido p-aminosalicílico	1-8	Inibição da via do folato e síntese de micobactina?	Timidilato sintetase ( <i>thyA</i> )?	<i>thyA</i>



### **1.9. A importância do gene *nat* e da enzima N-acetiltransferase na resistência.**

As N-acetiltransferases são encontradas em vários eucariotos e procariotos. Em humanos foi primeiramente identificada como uma enzima chave para a biotransformação da isoniazida no que se refere à excreção da mesma do organismo (Peters *et al.*, 1965). Em humanos esta enzima é codificada pelo gene *nat2*, que, juntamente com dois outros genes (*pnat*, *nat1*), está localizada no cromossomo 8p22. A atividade deste gene é predominantemente observada no fígado e no epitélio intestinal (Williams *et al.*, 2001) e caracteriza-se pela catálise da acetilação de arilaminas, arilhidroxilaminas e xenobióticos a partir da acetil coenzima A. (Sinclair *et al.*, 2000 e Sim *et al.*, 2000).

A relação entre os fenótipos de acetilação para a isoniazida e os genótipos polimórficos do gene *nat2* foi descrita em 1990 por Deguchi *et al.*. O polimorfismo do gene *nat2* foi descoberto através da observação da toxicidade induzida pela isoniazida em pacientes com TB (Hungles, 1954). Diferenças na citotoxicidade da isoniazida foram atribuídas à variabilidade no gene *nat2* e a conjugação de enzimas de fase II responsáveis pela desativação da isoniazida (Evans e White, 1964; Weber e Brenner; 1974). Com base nas diferenças observadas com relação à acetilação da isoniazida e outras drogas, a população humana foi então dividida de acordo com o fenótipo em diferentes grupos denominados, acetiladores rápidos, intermediários e lentos (Weber 1986, 1999). O fenótipo de acetiladores lentos deve-se pelo menos em parte, a redução da quantidade da proteína NAT2 (Jenne, 1965) ao nível sérico. Apresenta uma frequência de 50-60% em caucasianos, a qual, varia amplamente em diferentes grupos étnicos (Weber; 1984 e 1986). Recentemente, um homólogo ao gene *nat2* humano foi descrito em *M. smegmatis*, *M. bovis*-BCG e *M. tuberculosis* (Payton *et al.*, 1999; Payton *et al.*, 2001a), e também na seqüência parcial do genoma do *M. avium*. Em *M. bovis*-BCG e *M. tuberculosis*, este gene está associado ao metabolismo da INH, podendo contribuir com a resistência tendo sido designado NAT (Payton *et al.*, 2001a, b; Upton *et al.*, 2001) O gene *nat* em *M. tuberculosis*, composto por 852 pb e codifica para uma proteína de 283 aminoácido. No gênero *Mycobacterium*, o gene *nat* foi inicialmente

estudado na espécie não patogênica *M. smegmatis*; neste estudo, o gene foi super expresso, demonstrando uma associação com o aumento da resistência á isoniazida (Payton *et al.*, 1999). Tal observação foi confirmada em *M. tuberculosis* e *M. bovis*, nos quais foi demonstrado que tanto o RNAm de *nat*, quanto a proteína NAT eram produzidos por estas bactérias (Upton *et al.*, 2001).

Recentemente, um SNP na posição 619 (G619A) foi relatado no gene *nat* do *M. tuberculosis*; este resulta na substituição de uma glicina por uma arginina na posição 217 na proteína (Upton *et al.*, 2001). A freqüência deste polimorfismo foi de 18% nos isolados clínicos avaliados e a mutação aparentemente resulta em uma proteína menos estável e com menor afinidade pela isoniazida. Um estudo recente demonstra claramente uma modificação na concentração inibitória mínima da isoniazida em culturas de *M. tuberculosis* com esta variante *nat* mutada, sugerindo fortemente o envolvimento desta proteína numa resistência parcial do *M. tuberculosis* à droga. O mecanismo pelo qual este fenômeno acontece ainda não está bem elucidado, mas os autores cogitam a possibilidade da proteína (secretada) também estar envolvida com a acetilação da droga (Upton *et al.*, 2001a). Em 2003, pesquisadores demonstraram a estrutura do NAT recombinante em *M. smegmatis* e através da comparação com o NAT selvagem da mesma espécie, mostraram que polimorfismos neste locus em diferentes isolados clínicos podem exibir diferentes níveis de sensibilidade à isoniazida (Kawamura *et al.*, 2003).

Em *M. bovis* BCG e em *M. tuberculosis* foi demonstrado que *nat* também possui um papel importante na síntese de ácidos micólicos e, portanto, nos derivados dos componentes da parede celular, sugerindo que *nat* micobacteriano pode ser um novo alvo para droga (Bhakta *et al.*, 2004). Este estudo sugere que *nat* apresenta um papel muito mais importante do que inicialmente especulado.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo inicial

Determinar a prevalência da mutação 619A no gene *nat* em isolados de *M. tuberculosis* provenientes de pacientes brasileiros portadores de TB e de diferentes regiões do país e investigar a associação da presença da mutação com a resistência à isoniazida.

### 2.2. Objetivos específicos

- Investigar a eventual presença e a frequência de novos polimorfismos no gene *nat* destes isolados;
- Verificar os genótipos dos isolados de *M. tuberculosis* que eventualmente apresentarem variabilidade genética no gene *nat* por “Spoligotyping” para determinar a razão da frequência;
- Verificar a associação da variante mutante 619A e outras eventuais mutações no gene *nat* com a resistência à isoniazida;
- Nos isolados com polimorfismo no gene *nat*, verificar a presença de mutações em genes sabidamente envolvidos com resistência a INH para avaliar a importância desta associação;
- Investigar a presença e comparar a variabilidade do gene em espécies do Complexo *M. tuberculosis*.

### **3. METODOLOGIA E DESENHO EXPERIMENTAL**

**3.1. Relacionado ao estudo da variabilidade do gene *nat* de isolados de *M. tuberculosis* com intuito de verificar a presença de mutações associados à resistência a isoniazida.**

#### **3.1.1. Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo do tipo transversal analítico com uma fase retrospectiva, a qual envolveu a utilização de cepas previamente coletadas e com alguns genes de resistência já seqüenciados (*katG*, *ahpC*, *inhA*, *kasA*) em outra instituição e uma fase prospectiva com cepas isoladas durante o primeiro ano em diferentes regiões do país.

#### **3.1.2. Período de estudo**

O presente estudo teve a duração de dois anos com início em Janeiro de 2005 e término em janeiro de 2007. O recebimento dos isolados de *M. tuberculosis* de pacientes tuberculosos brasileiros e a parte do estudo compreendendo a análise de SNPs no gene *nat* e sua eventual associação com a resistência à isoniazida iniciou-se em janeiro de 2005. Durante o segundo semestre de 2006, obtivemos resultados indicando que a variabilidade genética no gene *nat* poderia servir como marcador para a diferenciação de organismos do CMTB a nível de espécie ou sub-espécie.

#### **3.1.3. Local de estudo e instituições participantes**

**Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Instituto Oswaldo Cruz (IOC)** - Rio de Janeiro - Departamento de Micobacterioses - Laboratório de Biologia Molecular aplicada à Micobactérias.

No caso das amostras coletadas prospectivamente, após o isolamento das cepas de *M. tuberculosis*, realizado nas unidades abaixo relacionadas, os mesmos foram encaminhados a este laboratório, no qual procedimentos como extração de DNA, amplificação das regiões de interesse por PCR, genotipagem por PCR-RFLP e seqüenciamento do DNA foram realizados. No caso dos isolados de origem retrospectiva, este laboratório já recebeu diretamente as amostras de DNA para a realização dos mesmos procedimentos.

**Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS)**, Porto Alegre, RS, Brasil.

Este laboratório foi responsável pela obtenção dos isolados clínicos da cidade de Porto Alegre (RS), arrolados neste estudo. Foi realizada também a extração do DNA dos mesmos, seqüenciamento de alguns isolados para genes *katG*, *inhA*, *ahpC* e *kasA* e teste de sensibilidade à drogas (método das proporções ou Concentração Mínima Inibitória para INH/MIC ).

**Centro Hospitalar Instituto de Doenças do Tórax (IDT) e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ) e Laboratório de Micobacteriologia** – Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Este laboratório foi o responsável pelo isolamento e obtenção de todos os isolados clínicos provenientes dos pacientes de tuberculose atendidos no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho. Realizou também o teste de sensibilidade à drogas (método das proporções) em todos os isolados disponibilizados para o estudo.

**Laboratório de Tuberculose, Centro de Referência Professor Hélio Fraga**, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Este laboratório foi o responsável pelo isolamento e teste de sensibilidade dos isolados clínicos provenientes dos pacientes com tuberculose atendidos no Centro de Referência Professor Hélio Fraga e disponibilizou os isolados, bem como os resultados dos testes de sensibilidade para a utilização no presente estudo.

**Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, SP, Brasil.

Este instituto foi responsável pelo isolamento e a obtenção dos isolados clínicos provenientes dos pacientes com tuberculose da cidade de São Paulo e realização dos testes de sensibilidade às drogas (método das proporções); também disponibilizou o DNA dos isolados e os resultados dos testes de sensibilidade.

**Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas UNICAMP**, Campinas, SP, Brasil.

Esta Instituição foi responsável pelo isolamento das cepas dos pacientes com tuberculose da cidade de Campinas e a realização dos testes de sensibilidade às drogas (método das proporções); o Instituto disponibilizou os DNAs dos isolados, como também os resultados dos testes de sensibilidade.

**Instituto Evandro Chagas**, Belém, PA, Brasil.

Este Instituto foi o responsável pela obtenção dos isolados e dados clínicos de pacientes da cidade de Belém, PA. Realizou também os testes de sensibilidade à drogas (método das proporções) e disponibilizou os isolados como e resultado dos testes para a utilização no presente estudo.

**Hospital Estadual Missejana**, Fortaleza, Brasil.

Este hospital foi o responsável pela obtenção dos isolados clínicos obtidos do Ceará, realização dos testes de sensibilidade às drogas (método das proporções) e

disponibilizou os isolados e os resultados dos testes para a utilização no presente estudo.

#### **3.1.4. Seleção das amostras**

Os isolados utilizados neste estudo para investigar a associação de SNPs e resistência a INH foram selecionados de acordo com a disponibilidade do DNA, informações referentes aos testes de sensibilidade e regiões geográficas.

#### **3.1.5. Amostras**

Foi obtido um grupo composto do DNA 441 isolados clínicos provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar de diferentes regiões do Brasil, para o estudo de associação do SNP nat<sup>619</sup> e para busca de novos SNPs neste gene. A origem e quantidade de isolados ou DNAs recebidos foram respectivamente: Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde Porto Alegre - Rio Grande do Sul (n=62); Laboratório de Micobacteriologia - HUCFF-IDT-UFRJ (n=195); Centro de Referência Professor Hélio Fraga, Rio de Janeiro (n=44); Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP: n=53), Campinas - UNICAMP, São Paulo (n= 36); Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará (n=48), Universidade de e o Hospital Estadual Missejana, Fortaleza, Ceará (n= 5). Todos os isolados foram cultivados e submetidos a teste de sensibilidade para as drogas usadas no tratamento da tuberculose pelo Método das Proporções descrita por Canetti *et al.*,(1963) e o DNA genômico foi extraído dos isolados clínicos de acordo com o método descrito por Van Embden *et al.*,(1993), e em alguns casos os isolados foram apenas submetidos à lise térmica, em seus locais de origem, com exceção dos isolados provenientes do estado do Pará e do Laboratório de Micobacteriologia - HUCFF-IDT-UFRJ, dos quais as culturas foram enviadas para a Fiocruz.

### **3.1.6. Extração do DNA**

As cepas foram crescidas em meio apropriado (Löwenstein-Jensen) e enviadas ao nosso laboratório. Após o recebimento, algumas colônias foram ressuspensas em 500 µL de TE 1X (Tris 10mM, EDTA, 1 mM pH 8,0) e inativadas a 80°C por 20 min. O DNA cromossômico foi extraído de acordo com Van Embden *et al.*, 1993.

Resumidamente, as bactérias foram submetidas a uma lise química através da incubação com lisozima (10mg/mL) durante a noite a 37°C. Após a lise foi adicionada uma solução de proteinase K (10mg/ml) e SDS 10% final. O material foi incubado a 65°C por 10 min; posteriormente foram adicionados 100µL de NaCl<sub>2</sub> 5M. Após vigorosa agitação o DNA foi extraído com CTAB-NaCl<sub>2</sub>. A solução foi novamente incubada a 65°C por 10 min. e posteriormente o DNA foi purificado através da adição de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), e centrifugação a 12 rpm por 5 min sendo em seguida precipitado com 1,8 vol. de isopropanol a -20°C. Após a secagem, realizada a temperatura ambiente o DNA foi ressuspenso em um volume final de 30 µL de TE 1 X (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

No caso de lise térmica, uma pequena quantidade de massa micobacteriana foi colocada em tubos eppendorf, juntamente com 250 µL de TE 1X (Tris 10 mM, EDTA, 1 mM pH 8,0), agitados e submetidos a choque térmico por 10 min. a 100°C e 5 min a -70°C, repetindo por três vezes.

### **3.1.7. Desenho de iniciadores, condições de PCR, seqüenciamento e PCR-RFLP**

Para o seqüenciamento do gene *nat*, devido ao tamanho da região de interesse, dois pares de iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) /Whitehead Institute for Biomedical Research). Um par flanqueando toda a região codificante, 852pb sendo um direto, anelando no nucleotídeo 69 pb no gene Rv3566A abaixo do sítio de iniciação da tradução ATG e um reverso, 110 pb acima do códon de parada no gene *aspB* (fragmento de 1069pb) e um par interno sendo um direto, anelando nucleotídeo



401, e um reverso anelando no nucleotídeo 455 do gene *nat* de forma a criar uma sobreposição entre os dois fragmentos e cobrir toda a região codificante (Figura 3.1).

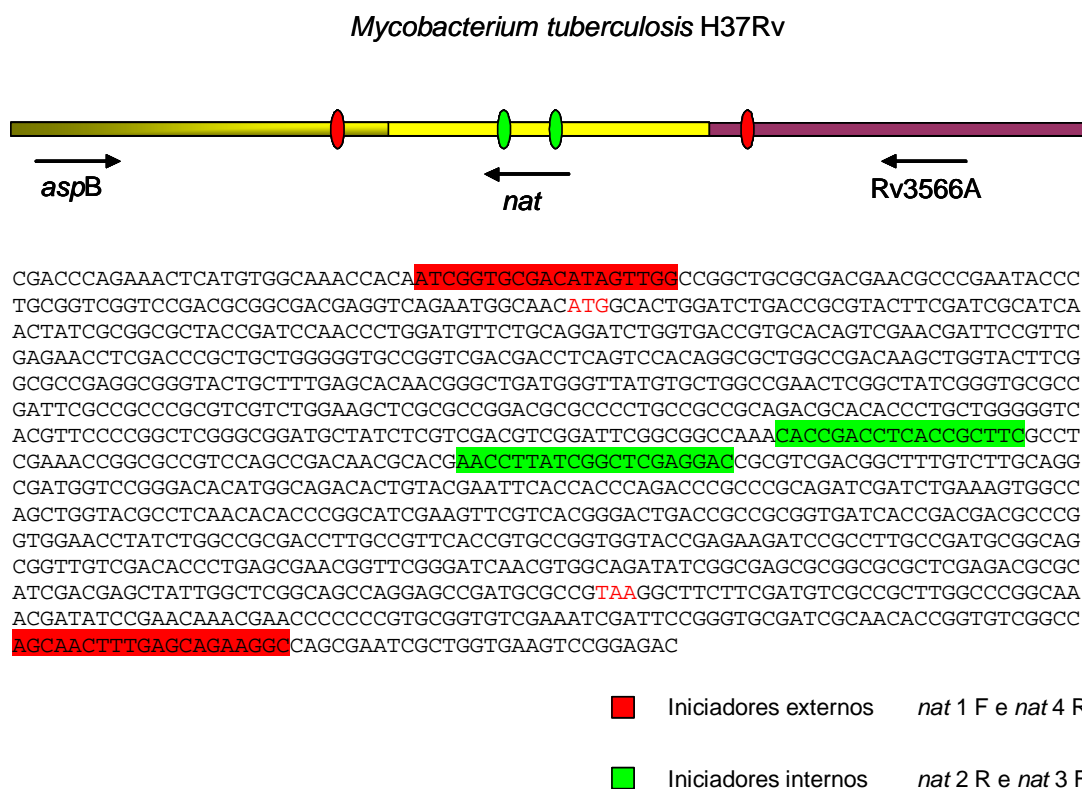


Figura 3.1: desenhos dos iniciadores para o seqüenciamento do gene *nat* de *M. tuberculosis*

Para a amplificação do gene *nat* foram utilizados 40 pmol de cada um dos iniciadores *nat*1F, 5' - ATC GGT GCG ACA TAG TTG G - 3' e *nat*4 R 5' - GCC TTC TGC TCA AAG TTG CT - 3' numa reação contendo: 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0, 2 mM dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen-Brasil), tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8, 3), 10 % glicerol e 10 ng de DNA alvo, em um volume final de 100 µL. As condições de amplificação foram respectivamente: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1min., 65°C por 1,30 min., 72°C por 1 min. e um ciclo de extensão final a 72°C por 4 min. gerando um produto de 1069 pb. Os iniciadores internos *nat* 2, 5' - GTC CTC GAG

CCG ATA AGG GTT `3 e *nat 3*, 5` - CAC CGA CCT CAC CGC TTC 3` , foram usados na reação de seqüenciamento, para garantir o seqüenciamento de todo o fragmento.

Para a genotipagem da SNP G-619-A por PCR-RFLP foram utilizados 200 ng dos iniciadores *nat3F*(RFLP) 5' - GAC GAG GTC AGA ATG GCA AC - 3' e *nat5R* (RFLP) 5' - GGG GTT CGT TTG TTC GGA TA - 3' descritos por Upton *et al.*, (2001) que flanqueiam toda (852pb) a região codificante do gene. Resumidamente, uma reação contendo: 2, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0, 2 Mm dNTPs, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, recombinante (Invitrogen-Brasil), 200 ng de cada iniciador e tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8, 3) e 10-25 ng de DNA alvo em um volume final de 50 µL. Após preparada, a mistura de reação foi submetida as seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguido de 35 ciclos de 95°C por 1 min., 61°C por 1 min., 72°C por 1 min. e um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min. O produto amplificado gerado foi de 928 pb. Um volume de 15 µL do produto amplificado foi submetido à digestão enzimática com 3 U da enzima de restrição *BsmAI* (New England BioLabs Inc. USA) seguindo as recomendações do fabricante. A variante mutada insere um segundo sítio de restrição para esta enzima gerando um perfil eletroforético com 3 bandas (637pb, 181pb e 110pb) respectivamente, já o alelo selvagem apresenta 2 bandas de 818bp e 110bp (Tabela 3.1).

### ***katG***

Para o seqüenciamento da região de interesse do gene *katG* foram utilizados os iniciadores *katG1* 5' - CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG - 3' e *katG2* 5' - CGA GGA AAC TGT TGT CCA T - 3' (Silva *et al.*, 2003), gerando um fragmento de 232 pb. A amplificação foi realizada em uma reação contendo: 40 pmol de cada iniciador, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0, 2 mM dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen-Brasil), tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8, 3), 10 % glicerol e 10ng de DNA alvo em um volume final de 100µL. As condições de amplificação foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1min.,

55°C por 1,30 min., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 5 min (Tabela 3.1).

### ***inhA***

Um fragmento de 206 pares de base correspondendo parte da região codificante do gene *inhA* (do códon 63 a 131) foi amplificado utilizando 40 pmol dos iniciadores *inhA*1, 5' - GAA CTC GAC GTG CAA AAC - 3' e *inhA* 2, 5' - CAT CGA AGC ATA CGA ATA - 3' (silva *et al.*, 2003), em uma reação contendo 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase, (Invitrogen-Brasil), tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3), 10 % glicerol e 10 ng de DNA alvo, em um volume final de 100µL. As condições de amplificação foram: uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1min., 53°C por 1 min e 30 sec., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 5 min (Tabela 3.1).

### **Região intergênica *oxyR-ahpC***

A região intergênica dos genes *oxyR* e *ahpC* (359pb), foi amplificada utilizando uma reação contendo: 40 pmol de cada iniciador, *ahpC*1, 5' - GCG TGG GTG TTC GTC ACT GGT - 3' e *ahpC*2, 5' - CGC AAC GTC GAC TGG CTC ATA - 3' (silva *et al.*, 2003), 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase, (Invitrogen-Brasil), tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3), 10 % glicerol, 40 pmol de cada iniciador e 10 ng de DNA alvo em um volume final de 100 µL. As condições de amplificação foram uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1min., 67°C por 1 min e 30 sec, 72°C por 5 min. Seguidos de uma extensão final a 72°C por 4 min (Tabela 3.1).

***kasA***

Para seqüenciamento de todo o gene *kasA*, os iniciadores foram desenhados seguindo o mesmo raciocínio dos desenhados para o seqüenciamento de *nat*, neste caso, porém foram utilizados 3 pares de iniciadores, por se tratar de um gene maior.

Para a amplificação da região de interesse deste gene foram utilizados 40 pmol de cada um dos iniciadores *kasA1*, 5' - TCC AGA AGC TCG AGG AAG AA - 3' e *kas 6* 5' - CTT CCA TAT CGG TCC GAC TC - 3' em uma reação contendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0, 2mM dNTPs, 1U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen-Brasil), tampão 1X (10 mM Tris-HCl, 1, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8.3), 10 % glicerol e 10 ng de DNA, em um volume final de 100 µL. As condições de amplificação foram respectivamente uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min., seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1min, 55°C por 1,30 min., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 4min., gerando um produto de 1443 pb. Neste caso também foram usados iniciadores internos, para a reação de seqüenciamento (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1:** Condições para amplificações.

Lócus	Iniciadores	Concentração de MgCl <sub>2</sub>	Temperatura de anelamento	Tamanho em pb
<i>nat</i>	nat1-eF 5' ATC GGT GCG ACA TAG TTG G-3'	2,5 mM	65 °C	1069
	nat2-iR 5' GTC CTC GAG CCG ATA AGG TT-3'			
	nat3-iF 5' CAC CGA CCT CAC CGC TTC-3'			
	nat4 eR 5' GCC TTC TGC TCA AAG TTG CT-3'			
<i>nat</i>	<i>nat</i> 3F(RFLP) 5' - GAC GAG GTC AGA ATG GCA AC - 3'	2,5 mM	55 °C	852
	nat5R (RFLP) 5' - GGG GTT CGT TTG TTC GGA TA- 3'			
<i>katG</i>	KatG-F 5'CAT GAA CGA CGT CGA AAC AG-3'	3 mM	55 °C	232
	KatG-R 5'-CGA GGA AAC TGT TGT CC AT-3'			
<i>inhA</i>	Inha-F 5' GAA CTC GAC GTG CAA AAC-3'	2,5 mM	53 °C	206
	Inha-R 5' CAT CGA AGC ATA CGA ATA-3'			
<i>oxyR-ahpC</i>	Ahpc-F 5'GCG TGG GTG TTC GTC ACT GGT-3'	2,5 mM	67 °C	359
	Ahpc-R 5'CGC AAC GTC GAC TGG CTC ATA-3'			
<i>kasA</i>	kasA1-R 5' TCC AGA AGC TCG AGG AAG AA-3'	3 mM	55 °C	1660
	kasA2-iF 5' GGG CAT GAT CAT ATG AAC G-3'			
	kasA3-iR 5' TGT CGA GAG CTA CGA CCT GA-3'			
	kasA4-iF 5' GAG CGA GTC ATC GCC CTA C-3'			
	kasA5-iR 5' CAT CGA GAC GGA GGA GCA C-3'			
	kasA-F 5' CTT CCA TAT CGG TCC GAC TC-3'			

### **3.1.8 Detecção dos fragmentos de PCR e PCR RFLP.**

Todos os produtos de PCR ou fragmentos gerados após digestão com enzimas de restrição (PCR-RFLP) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose e coloração do DNA com brometo de etídio (0,5 µg/mL). A concentração da agarose variou de acordo com o tamanho dos fragmentos analisados (1,5%-3%).

Todas as imagens geradas foram capturadas e armazenadas usando os programas de foto documentação Kodak 1 D V3. 6 Image Analysis Software/4 (Science Park, New Haven CT 06511, USA/Eastman Kodak Company).

### **3.1.9 Purificação dos fragmentos amplificados**

#### **Purificação com acetato de amônia**

Para a purificação dos produtos amplificados (retirada dos iniciadores e nucleotídeos não incorporados na reação de PCR), a cada produto amplificado (100  $\mu\text{L}$ ), foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de acetato de amônia (7,5M) e 150  $\mu\text{L}$  de isopropanol, em seguida a mistura foi agitada vigorosamente e incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e 400  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados e submetido a nova centrifugação. Procedido o descarte do sobrenadante, o DNA foi seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 10 $\mu\text{L}$  de TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0).

#### **Kit comercial de purificação QIAquick ®**

Em alguns casos a purificação dos produtos amplificados foi feita com o kit comercial de purificação QIAquick ® (QIAquick PCR Purification Kit/QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante.

### **3.1.10 Reação de seqüenciamento**

Para a reação de seqüenciamento foi usado o kit ABI Prism BigDye™ Terminator (Applied Biosystems). Após a purificação do produto amplificado, foram feitas reações contendo 1,5 do tampão (5X Sequencing Buffer), 0,5  $\mu\text{L}$  de BigDye, 3,2 pmol do iniciador, 5-20 ng de DNA purificado e H<sub>2</sub>O q.s.p 10  $\mu\text{L}$ . Em seguida as reações foram submetidas a termociclagem, obedecendo as seguintes temperaturas e tempos: 40 ciclos de 96°C por 10 seg., 50°C por 5 seg. e 60 °C por 4 min.

### **3.1.11 Precipitação dos produtos para sequenciamento**

Foram adicionados 30 µL de isopropanol a 75% ao produto gerado após a PCR e agitado vigorosamente por 10 seg. Esta mistura foi incubada por 15 min. a temperatura ambiente e em seguida centrifugada por 45 min. à 4.000 rpm a 20 °C. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento foram adicionados 50 µL de etanol 75%. Após uma segunda centrifugação por 15 min. à 4.000 rpm e 20°C, o sobrenadante foi retirado e a placa foi submetida à secagem em termociclador por 10 min a 60°C, em seguida mantidos a -20 °C até o momento do seqüenciamento. Antes do seqüenciamento, os DNAs referentes às diferentes amostras foram desnaturados através da adição de 10 µL de formamida (Hi-Di™, Applied Biosystems) e incubação a 95 °C por 3 min., sendo em seguida resfriado.

### **3.1.12 Seqüenciamento**

O seqüenciamento automático direto do produto de PCR foi realizado em seqüenciador ABI3730 (Applied Biosystems). Os iniciadores usados para o seqüenciamento de diferentes alvos foram os mesmos usados para a amplificação, exceto para os loci *nat* e *kasA*, nos quais iniciadores internos também foram utilizados exclusivamente para o seqüenciamento. Os seqüenciamentos foram realizados na Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - Plataforma de Seqüenciamento de DNA PDTIS/FIOCRUZ ([http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS\\_Genomica/](http://www.dbbm.fiocruz.br/PDTIS_Genomica/)).

### **3.1.13 Análise das seqüências**

As seqüências foram analisadas através do programa SeqScape versão 2.1 (Applied Biosystems). As seqüências foram alinhadas e comparadas com base na seqüência já publicada do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv depositada no GenBank ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis/](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis/)).

### **3.1.14 Spoligotyping**

Para tipagem por “Spoligotyping” dos isolados clínicos, nós utilizamos o protocolo modificado descrito anteriormente (Kamerbeek *et al.*, 1997). Dez nano gramas de DNA extraído ou 5 µL de lisado bacteriano foram amplificados usando os iniciadores DRa e DRb. Este método de tipagem é baseado em polimorfismos presentes nas regiões DR “Direct Repeat” que estão presentes no Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Após uma diluição os DNAs foram incubados a 80°C por 20 min., em seguida foram adicionados a mistura de reação contendo 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs e 1 U de *Taq* DNA polimerase recombinante (Invitrogen-Brasil) e 20 pmol dos iniciadores DRa 5'- CCG AGA GGG GAG GGA AAC-3' (biotinilados) e DRb (5'- GGT TTT GGG TCT GAC GAC-3') um volume final de 30 µL a qual foram submetidas as seguintes condições: Desnaturação inicial de 3 min. a 96 °C, seguidos por 35 ciclos de 1 min a 96 °C, 1 min a 55°C e 30 seg. a 72°C. Após a amplificação o DNA foi hibridado contra um conjunto de 43 oligonucleotídeos derivados do *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* - BCG P3. Para hibridação reversa, os produtos da PCR foram diluídos em 30 µL de tampão [SDS 0,1%/SSPE 2X (0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3,6 M NaCl, 20 mM EDTA, pH 7,4)] desnaturado a 99 °C por 10 min. e colocado em gelo até a aplicação no minibloter MN45 (Isogen, Holanda). A membrana do Spoligotyping (Isogen) foi submetida a uma pré lavagem a 60 °C em SDS 1%/SSPE 2X durante 5 min. A membrana foi posta no minibloter e o DNA foi aplicado e incubado 60°C, por 1 h, após isto a membrana foi lavada duas vezes em 200 mL de SSPE 2X/SDS 0,5% por 10 min. a 60°C e incubada em 10 mL SSPE 2X /SDS 0,5% contendo 10 µL de streptavidina-peroxidase (Amersham Bioscience) por 1 h. a 42°C, seguido por duas lavagens com SSPE 2X/SDS 0,5% a 42°C durante 10 min. Para a remoção do SDS da membrana, a mesma foi lavada com SSPE 2X à temperatura ambiente. Para a visualização do resultado a membrana foi incubada por 1 min em 15 mL do kit de luminescência ECL (Amersham Bioscience) e exposta a um hiperfilme por duas horas.



Após a revelação, a auto-radiografia foi analisada e os resultados transformados em códigos binários (Excel) sendo os perfis encontrados comparados com os perfis depositados no banco de dados internacional de Spoligotyping SpolDB4.0 (<http://www.pasteur-guadeloupe.fr/tb/spoldb4>).

### **3.1.15. Análise estatística**

A significância estatística entre a presença da variável mutante e os parâmetros de sensibilidade, resistência (MDR+R-INH) e resistência individual a INH ou MDR foi verificada usando o teste qui-quadrado, quando apropriado, ou o Teste Exato de Fisher (Epi Info, versão 6.04, Centers for Disease Control and Prevention - CDC). A magnitude das associações foi estimada como razão de chances (*odds ratio*, OR) com seus respectivos intervalos de confiança (IC). O nível de significância estatística adotado foi de 5% .

### **3.2. Abordagem com o objetivo de analisar a variabilidade genética para definir marcadores que diferenciam espécies do CMTB**

#### **3.2.1. Período de estudo**

Esta parte do estudo foi iniciada no segundo semestre de 2006 em nosso laboratório e contou com a colaboração e/ou financiamento das instituições estrangeiras mencionadas a seguir.

#### **3.2.2. Local de estudo e instituições participantes**

**National Reference Center for Mycobacteria, D-23845 Borstel, Germany.**

Esta Instituição disponibilizou os DNAs de isolados de pacientes com tuberculose pulmonar originários de Gana (África).

**Columbia University Medical Center-The New York - Presbyterian Hospital, University Hospital Columbia and Cornell, New York, EUA.**

Esta instituição disponibilizou os DNAs de isolados de referência e clínicos (humanos e veterinários) de micobactérias do Complexo *M. tuberculosis* que foram utilizados neste estudo para a validação de um dos resultados obtidos em nosso laboratório. Também realizamos neste instituto parte da diferenciação molecular (PCR e PCR-RFLP) dos isolados provenientes de Gana.

**Division of International Medicine and Infectious Diseases, Department of Medicine, Joan and Sanford I. Weill Medical College, Cornell University, New York, NY, EUA.**

Nesta instituição fizemos parte dos PCR-RFLP e seqüenciamos alguns genes avaliados neste estudo.

### **3.2.3. Seleção das amostras**

Para investigar a possível presença do gene *nat* gene em outras micobacterias do CMTB, seqüenciamos inicialmente 16 isolados clínicos (CMTB) recebidos do RIVM (Bilthoven, Holanda). Para a confirmação dos resultados obtidos com o seqüenciamento do gene *nat* em micobactérias do CMTB, foi selecionada uma coleção de 124 cepas do CMTB que já haviam sido caracterizadas bioquímica e molecularmente a nível de espécie (Huard *et al.*, 2006). Após a confirmação as SNPs foram validadas em uma segunda coleção de isolados de pacientes ganenses (África) com tuberculose pulmonar ainda não caracterizada.

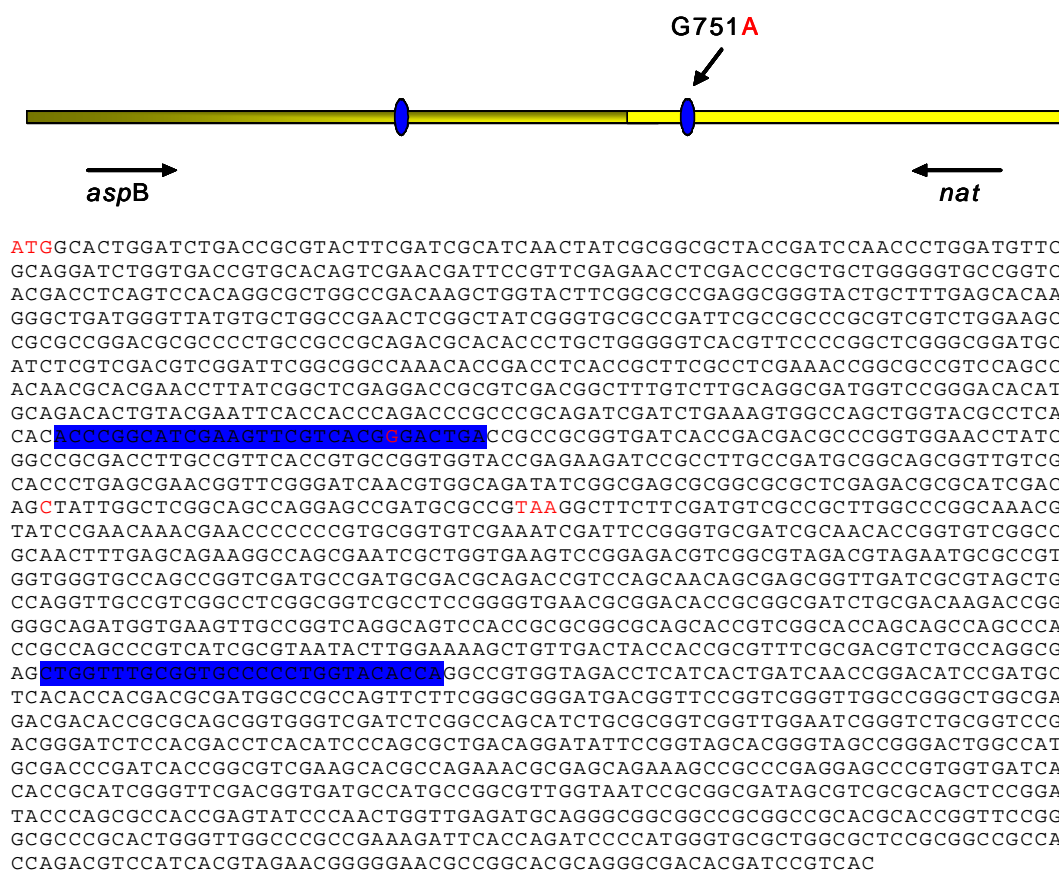
### **3.2.4. Amostras**

Uma coleção de DNA genômico de 124 bactérias pertencentes ao CMTB bem caracterizadas (Huard *et al.*, 2006) compreendendo *M. canetti* (n= 5), *M. tuberculosis* (n= 44), *M. africanum subtipo 1a* (n= 18), *M. africanum subtipo 1b* (n= 12), *dassie bacillus* (n= 4), *oryx bacillus* (n= 2), *M. microti* (n= 10), *M. pinnipeddi* (n= 7), *M. caprae* (n= 1), *M. bovis* (n= 14), *M. bovis BCG* (n= 8). Esta coleção é composta tanto por cepas de referência como por isolados clínicos de origens diversas e um segundo grupo composto por uma coleção de 47 DNAs de cepas provenientes de pacientes com tuberculose pulmonar originários de Gana (África).

### **3.2.5. Desenho de iniciadores, condições de PCR e sequenciamento para a análise da composição genética de isolados de CMTB.**

Como descrito na tabela 3.2, alguns iniciadores foram obtidos de publicações anteriores (Brosch *et al.*, 2002, Goh *et al.*, 2001, Huard *et al.*, 2003, Huard *et al.*, 2006, Lee *et al.*, 2002, Mostrom *et al.*, 2002, Niemann *et al.*, 2002 e Tsolaki *et al.*, 2004) e outros foram desenhados como descrito anteriormente com auxílio do programa PrimerSelect (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). No caso das regiões de deleções (TbD1, RD7, RD8, RD9 e RD10) foram desenhados 3 iniciadores (um interno e dois externos), para amplificar fragmentos de aproximadamente 500 e 300 pb dependendo da presença ou ausência de deleções. Foram selecionados precisamente marcadores que possibilitariam a distinção entre *M. tuberculosis* de *M. africanum* e seus subtipos, pelos novos marcadores encontrados e pela natureza dos isolados estudados. Para este fim foram analisados SNPs em alguns genes específicos, bem como longas seqüências polimórficas, através de seqüenciamento, PCR ou PCR-RFLP, dependendo da viabilidade ou custo efetividade.

Para a confirmação da SNP *nat*<sup>751</sup> (G-A), foram seqüenciados alguns isolados representativos do CMTB utilizando a mesma abordagem descrita na seção **3.1.7**, após a confirmação foram desenhados iniciadores para abranger a região polimórfica gerando um fragmento de 766 pb, sendo um dos iniciadores anelando a partir do nucleotídeo 596 do gene *nat* e o outro a partir do nucleotídeo 623 do gene *aspB*, para o desenvolvimento do protocolo de PCR-RFLP para a detecção deste SNP.

*Mycobacterium Tuberculosis* H37Rv

■ Iniciadores natRFLP 751-F e natRFLP 751-R

**Figura 3.2:** Desenho dos iniciadores usados para a genotipagem da mutação *nat* G751A PCR-RFLP.

Dois microlitros do DNA purificado (25 a 50 ng) foram adicionados a reação de PCR contendo 25  $\mu$ L High Fidelity PCR Master (Roche Diagnostics, Roche Applied Science, Germany), 2,5  $\mu$ L de DMSO<sup>5</sup> (5%), 20  $\mu$ M de cada iniciador em um volume final de 50 $\mu$ L. Três programas foram usados para amplificação: Programa 1) desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguindo por 35 ciclos de 94°C por 1 min., 60°C por 1 min., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 10 min; programa 2) desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguindo por 35 ciclos de 94°C por 1 min., 65°C por 1 min., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 10 min. e programa

<sup>5</sup> Para a PCR para amplificação da região RD701, foi necessário adicionar 10% de DMSO (5  $\mu$ L)

3) desnaturação inicial a 94°C por 5 min., seguindo por 45 ciclos de 94°C por 1 min., 60°C por 1 min., 72°C por 1 min. e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os detalhes de cada sistema estão listados na tabela 3.2.

Com relação a genotipagem por PCR-RFLP dos SNPs *nat*<sup>751</sup> (G-A), *aroA*<sup>117</sup> (G-A), *cpf* 32<sup>311</sup> (G-A) e *TbD1*<sup>197</sup> (C-T), as enzimas usadas, foram escolhidas com o auxílio do programa MapDraw (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) ou baseadas na literatura tabela 3.3.

**Tabela 3.2:** Condições de ampliações.

Locus	Iniciadores	Tamanho em pb	
<i>katG</i> <sup>203</sup>	katG203-F 5' GCC GGC GCC ATG GGT CTT ACC GAA AGT GTG 3'	370	2
	katG203-R 5' GGG CCG CTG GTC CCC AAG CAG AC 3		
<i>katG</i> <sup>463</sup>	katG203-R 5' GGG CCG CTG GTC CCC AAG CAG AC 3'	351	2
	katG463-F 5' GAC GAG GTC GGC GAA GGA CAC TTT GA 3',		
<i>gyrA</i> <sup>95</sup>	gyrA-F 5' GGA GGT GCG CGA CCG GCT CAA G 3'	354	2
	gyrA-R 5' ACC CGG CCG TCG TAG TTA GGG ATG AAA TC 3		
<i>rpoB</i> <sup>1163</sup> <i>rpoB</i> <sup>1049</sup>	rpoB-F 5' TCA AGG AGA AGC GCT ACG A 3'	359	1
	rpoB-R 5' GGA TGT TGA TCA GGG TCT GC 3'		
<i>hsp65</i> <sup>540</sup>	hsp65-F 5' ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT 3'	441	1
	hsp65-R 5' CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT 3'		
Rv1510 <sup>1129</sup>	Rv1510-F5' GTG CGC TCC ACC CAA ATA GTT GC 3'	1.033	1
	Rv1510-R 5' TGT CGA CCT GGG GCA CAA ATC AGT C 3'		
<i>gyrB</i> <sup>1450</sup>	gyrA-R 5' ACC CGG CCG TCG TAG TTA GGG ATG AAA TC 3',	1.400	1
	gyrB-F 5' TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC 3'		
<i>aroA</i> <sup>117</sup>	aroA-F 5' ACC GCA CCC GGT GGC CTC GTC TAT 3' ,	431	1
	aroA-R 5' ACC GTG CCC GCC AAG CCA CAG TC 3'		
PRONarGHJ I <sup>-251</sup>	PRONarGHJ-IF 5' AAC CGA CCG TGT GGT GAC 3'	150	1
	PRONarGHJ-IR 5' ATC TCG ATG GTA GGG CGT C 3'		
<i>nat</i> <sup>751</sup>	natRFLP 751-F 5' ACC CGG ATC GAA GTT CGT CAC GGG ACT GA 3'	766	2
	natRFLP 751-R 5' TGG TGT ACC AGG GGG CAC CGC AAA CCA G 3'		
<i>cpf 32</i> <sup>311</sup>	3'cpf32-F 5' CGA ATC ATT GGC ACG TCT ACT TTG 3'	372	1
	3'cpf32-R 5' GTG GCA CCG GCG GCA CCG CAC ACC T 3'		
TbD1 <sup>197</sup>	TbD1-F 5' CGT TCA ACC CCA AAC AGG TA 3'	500	1
	TbD1-R 5' AAT CGA ACT CGT GGA ACA CC 3'		

Continuação tabela 3.2

Lócus	Iniciadores	Tamanho em pb	Programa (PCR)
<b>TbD1</b>	TbD1fInk-F 5' CTA CCT CAT CTT CCG GTC CA 3'	500/300	2
	mmpL6-R 5' CAT AGA TCC CGG ACA TGG TG 3'		
	TbD1fank-iF AAG GAA CTG CGA GAT AGG ATC GCC		
<b>RD7<sup>d</sup></b>	RD7-F 5' CGC CGC GCC ATG GTA ATC GTA ATC GTG 3'	500/300	2
	RD7-R 5' CGT CCC GTG TTC GCA ATG CTA TGA GAC C 3'		
	RD7-iR 5' ATC ACC GCC CAT GGG ATC GTC ATC AAC A 3'		
<b>RD8</b>	RD8-F 5' CAT GCT AAG CAG ATC GTC AGT AGT TTT GA 3'	500/300	2
	RD8-iF 5' GCC GCA TTG TCG GGG TCG GAT TCC CACACC 3'		
	RD8-R 5' CGCTTC CGG CGGGCT CCG GAT TGC TGT ACT 3'		
<b>RD9</b>	RD9-F 5' ACT CCC AGC GCT CGG CGG TGA CGG TAT CGT 3'	500/300	2
	RD9-R 5' GTG GCT CGG CAC GCA CAA CTC GTT CAA CAG 3'		
	RD9-iR 5' ATT CCG TGG GCG CTG CGG CCA ATG TTT GTT 3'		
<b>RD10</b>	RD10-F 5' GCG CCA CCT CGG CCG GAT TCC TGC AAC CAT 3'	500/300	2
	RD10-R 5' CTC GGC GGC AAG TCG GCG GCC ATC ATT CTC 3'		
	RD10-iR 5' TTC GGC CTT GCC GTC ATA GCG CAA TAG CGA 3'		
<b>RD701</b>	RD701-F 5' CTG TGC AGG TGG TCG TTT C 3'	2.08/340	3
	RD701-R 5' CGA ATT GCT CAT CCC GTA AC 3'		
<b>RD702</b>	RD702-F 5' CCG CAA CTT CGA GTA CCT TT 3'	2.10/732	3
	RD702-R 5' GTT GGG TTG CTG GTC CAT 3'		
<b>RD711</b>	RD711-F 5' GGC CGC CCT GCT CAA GAA CCT 3'	2.885/942	3
	RD711-R 5' CCT AGG CCG GCG ACG AAG TG 3'		
<b>RD713</b>	RD713-F 5' CCATCT GCG CTT TCG GTG CTT CT 3'	Falha/4.248/2.798	3
	RD713-R 5' CTG CCA GTC GTC TTC CCC ATT GTG 3'		
<b>cfp32</b>	rv0577-F 5' ATG CCC AAG AGA AGC GAA TAC AGG CAA 3'	787	3
	rv0577-R 5' CTA TTG CTG CGG TGC GGG CTT CAA 3'		
<b>*PPE55</b>	PPE55-F 5' AGG ACA ACC CCG ACA GCT GCT CAC CAA cat 3'	346	1
	PPE55-R 5' AGC GTC ACT GTC GGC CCT ATC CTG 3'		
<b>*RD 13</b>	Rv1257c-F 5' GGT GGC GAG CTG GAA TTC GTG AGA CAT TAC 3'	456	1
	Rv1257c-R 5' CAT GCG CGA GGA GCG GAA TCT GAT GAT 3'		
<b>*RD711 SNP390</b>	RD711-390-F 5' GCC CTG CGA GCC TGC ACG AAC CTG AGA TT3'	344	1
	RD711-390-F 5'CGA GCC CCC GAC GTC GGT GAT GGA GTT CA 3'		
<b>*pks15/18</b>	pks1I-F 5' TCT TGC CCA CCG ACC CTG GC 3'	520	1
	pks1J-R 5' GCA GGC GAT GCG TCA TGG GG 3'		

\* Estes loci foram seqüenciados para a detecção das mutações investigadas.



**Tabela 3.3:** Protocolos PCR-RFLP usados para a diferenciação de espécies do CMTB.

Lócus	Enzima de restrição	Subespécies CMTB	Padrão de digestão [bp]	Publicação prévia (referência)
<i>katG</i> <sup>203</sup>	<i>Bst</i> NI	PGG1a CMTB	370	Huard,2006
		PGG1b, PGG2, PGG3 CMTB	230,140	
<i>katG</i> <sup>463</sup>	<i>Bst</i> NI	PGG1 CMTB	174,104,61,2	Huard,2003.
		PGG2, PGG3 <i>M. tuberculosis</i>	278, 61,12	
<i>gyrA</i> <sup>95</sup>	A/eI	PGG3 <i>M. tuberculosis</i>	193, 161	Huard,2006.
		PGG1, PGG2 CMTB	354	
<i>rpoB</i> <sup>1163</sup>	<i>Bst</i> UI	<i>M. africanum</i> Ia	332,28	Huard,2006.
		Outras espécies CMTB,	253, 79, 28	
<i>rpoB</i> <sup>1049</sup>	<i>Sau</i> 3AI	<i>M. africanum</i> Ia	250,69,18,12,11	Le Fle`che,2002.
		Outras espécies CMTB,	163, 87, 69,12, 11, 12	
<i>hsp65</i> <sup>540</sup>	<i>Af</i> III	<i>M. africanum</i> Ia	391, 50	Huard,2006.
		Outras espécies CMTB	441	
Rv1510 <sup>1129</sup>	<i>Nru</i> I	<i>M. africanum</i> Ia, <i>dassie bacillus</i>	841, 192	Huard,2006.
		Outras espécies CMTB	1033	
<i>gyrB</i> <sup>1450</sup>	<i>Taq</i> I $\alpha$	<i>M. canettii</i> , <i>M. tuberculosis</i>	444, 270, 129, 94,74,6,	Niemann,2000.
		Outras espécies CMTB	444,177,163,129,94,74,21,6	
<i>aroA</i> <sup>117</sup>	<i>Bss</i> HI	<i>M.africanum</i> 1b	254,177	Neste estudo
		Outras espécies CMTB	150, 104	
<i>nat</i> <sup>751</sup> *	<i>Bcgl</i>	<i>M.africanum</i> Ia	271,208, 177,111	Neste estudo
		Outras espécies CMTB	447, 208, 111,	
<i>cpf 32</i> <sup>311</sup>	<i>Bst</i> NI	PGG1a C	235, 75, 34, 28	Neste estudo
		Outras espécies CMTB	263, 75, 34	
TbD1 <sup>197</sup>	<i>Tsel</i>	<i>M. africanun</i> Ib	454, 46	Neste estudo
		Outras espécies CMTB	261, 180, 59	

### **3.2.6 Confirmação dos protocolos de PCR-RFLP usados neste estudo**

Todos os sistemas de PCR e PCR-RFLP desenvolvidos durante a realização deste estudo foram confirmados através do seqüenciamento de, no mínimo, 3 amostras com genótipos conhecidos.

### **3.2.7 Purificação dos fragmentos amplificados**

Para a purificação dos produtos amplificados (retirada dos iniciadores e nucleotídeos não incorporados na reação de PCR) foi usado o kit comercial de purificação QIAquick® (QUIAquick PCR Purification Kit/QIAGEN).

### **3.2.8 Seqüenciamento**

O seqüenciamento automático direto do produto de PCR foi realizado em seqüenciador ABI3730 (Applied Biosystems). Os iniciadores usados para o seqüenciamento de diferentes alvos foram os mesmos usados para a amplificação. O produto purificado juntamente com os iniciadores foram enviados para BioResource Center na Cornell University, Ithaca/N.Y, (<http://www.brc.cornell.edu>).

### **3.2.9 Análise das seqüências**

As análises das seqüências foram feitas com o auxílio do programa MegAlign (DNASTAR Inc., Madison, Wis.). As seqüências foram alinhadas e comparadas com a seqüência já publicada do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv depositadas no GenBank ([http://www.sanger.ac.uk/Projects/M\\_tuberculosis](http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_tuberculosis)).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Avaliação da possível associação da variante mutante 619-A presente no gene *nat* de *Mycobacterium tuberculosis* com resistência a INH.**

Para a determinação da frequência da variante mutante 619-A e determinação da sua possível associação com a resistência à isoniazida, 443 isolados oriundos de diferentes pacientes com TB pulmonar (período de 1996-2005) de diferentes regiões do país foram avaliados (Tabela 4.1). Destas, 237 (53,5%) apresentavam resistência a pelo menos uma das drogas usadas no tratamento da TB enquanto 206 (46,5%) não apresentaram resistência, sendo consideradas sensíveis (S) (Figura 4.1a).

**Tabela 4.1:** Origem dos diferentes isolados clínicos de acordo com a região geográfica e resultado dos testes de sensibilidade.

Perfil de Resistência	NORTE	NORDESTE	SUL	SUDESTE	
	Belém	Ceará	Porto Alegre	Rio de Janeiro	São Paulo
R-INH	20	1	25	23	22
MDR	12	4	20	56	57
S	16	-	17	160	10
TOTAL	48	5	62	239	89

Quando agrupamos de acordo com o tipo de resistência, das 237 cepas resistentes 88 (37%) eram mono resistentes e 149 (63%) eram resistentes a múltiplas drogas (MDR; Figura 4.1b). Dos isolados mono resistentes, todos apresentaram resistência apenas à isoniazida enquanto que as cepas MDR apresentaram resistência não somente a isoniazida e rifampicina, como também a outras drogas usadas no tratamento da TB (drogas de primeira linha-Tabela A1/anexo I). Como o objetivo principal deste trabalho foi avaliar mutações associadas à resistência a isoniazida, as amostras foram apenas agrupadas em resistentes a isoniazida e MDR, não levando em consideração resistências específicas.

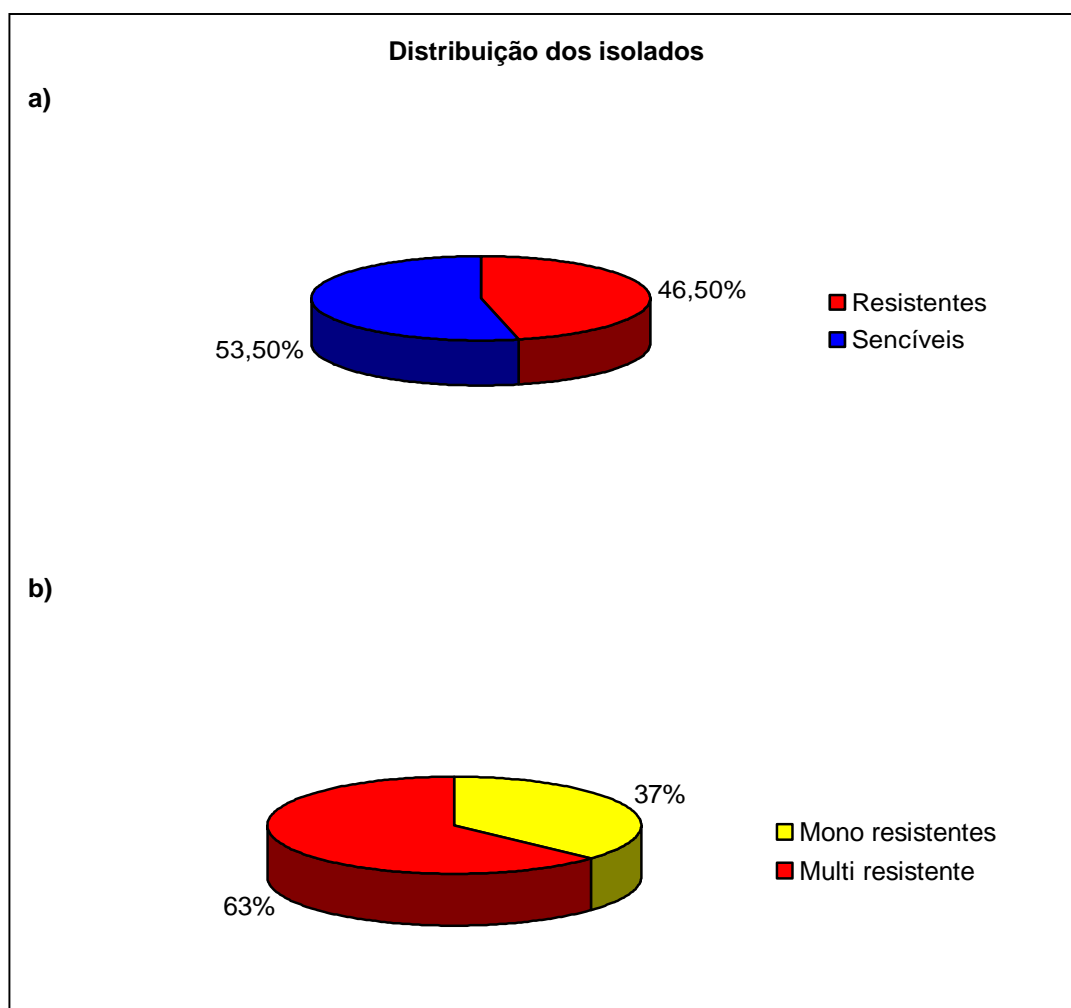


Figura 4.1: a) Distribuição dos isolados estudados de acordo com a sensibilidade às drogas usadas no tratamento da tuberculose; b) Distribuição dos isolados estudados de acordo com o tipo de resistência.

Os DNAs provenientes de 331 isolados foram submetidos à RFLP-PCR para detecção da variante 619A no gene *nat* (181 dos 206 isolados sensíveis e 150 dos 237 isolados resistentes pelo menos à INH, totalizando 74,7 % das amostras/Figura 4.3). Entre estes, 112 isolados foram seqüenciados (87 resistentes e 25 sensíveis) com objetivo de buscar novos polimorfismos; entretanto, quarenta e nove isolados (42 resistentes e 7 sensíveis) tiveram o gene *nat* totalmente seqüenciado enquanto sessenta e três (45 resistentes à INH e 18 sensíveis) tiveram somente a parte inicial de 460 pb seqüenciada, já que esta região mostrou ser mais polimórfica em nossos resultados preliminares.

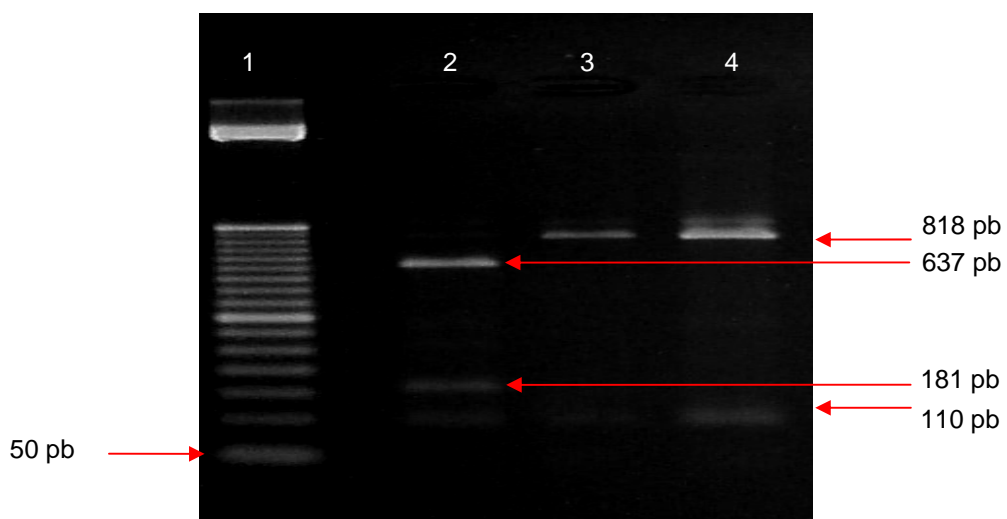


Figura 4.3: PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo no gene *nat* de *M. tuberculosis* na posição 619. Eletroforese em gel de agarose 2%, TAE 1X, corado com brometo de etídio. Poço1: Marcador de 50 pb, poço: 2: Isolado com a mutação (637bp, 181bp e 110bp); poço 3 e 4: isolados selvagens (818bp e 110bp).

Após a determinação da frequência da variável mutante 619A a partir dos resultados obtidos por PCR-RFLP e o seqüenciamento total do gene *nat* (n= 381), pudemos observar que vinte isolados apresentaram a variável mutante 619A, resultando numa frequência total (sensíveis + resistentes) de 5,2%. Na tabela 4.2 são mostradas as diferentes frequências observadas após a estratificação das amostras em resistentes, sensíveis, MDR e resistentes somente a isoniazida. A frequência da variável mutante 619A foi significativamente maior nos isolados resistentes que nos sensíveis, sendo 8,6 % e 1,6 % respectivamente ( $p = 0,002$ , OR = 5,73, IC 1,55 - 25,02). Comparando os isolados sensíveis e resistentes a INH (13,2%) a diferença foi altamente significativa ( $p < 0,001$  OR = 0,11, IC 0,02-0,45) e uma diferença “borderline” quando comparado aos MDR. ( $p = 0,05$  OR = 0,27, IC 0,05-0,120). Análise separada das amostras resistentes estratificadas em MDR e R-INH não mostrou diferenças significativas ( $p = 0,06$ , OR = 0,40, IC 0,13 – 1,21).

**Tabela 4.2:** Distribuição da frequência da variante mutante 619A de acordo com a sensibilidade as drogas utilizadas no tratamento da tuberculose.

Isolados	<i>nat</i> <sup>619</sup>
Todos os isolados (20/381) <sup>a</sup>	0,052
Resistentes (17/198) <sup>a</sup>	0,086
Sensíveis(3/183) <sup>a</sup>	0,016
MDR (7/122) <sup>a</sup>	0,058
R-INH (10/76) <sup>a</sup>	0,132

<sup>a</sup>Número de isolados com a variante mutante *nat*<sup>619</sup> em relação aos isolados estudados.

---

#### **4.1.1. Distribuição da variante mutante 619A nos isolados resistentes (resistentes a isoniazida e resistentes à múltiplas drogas) de acordo com a procedência.**

A freqüência geral da variante mutante nos isolados de Porto Alegre foi de 13,5%. Nenhum dos isolados sensíveis apresentou a mutação, enquanto nos isolados resistentes (R-INH + MDR), a freqüência foi de 16,2%. De acordo com o tipo de resistência, a frequência encontrada foi de 21% nos isolados resistentes à isoniazida e de 8,3% nos isolados MDR, não apresentando diferença significativa ( $p = 0,34$ , OR = 0,34, IC 0,01 – 4,21).

Nos isolados provenientes de Pará, a freqüência geral foi de 6,2% e novamente, não foi encontrado o alelo mutante 619A entre os isolados sensíveis. Entre os isolados resistentes à freqüência foi de 9,4%, sendo igual a 10 % em isolados resistentes a isoniazida e 8,3 % em isolados MDR, não apresentando diferença com significância estatística ( $p = 0,68$ , OR = 0,82, IC 0,03 – 14,02).

No estado de São Paulo, a freqüência geral foi de 6,8% com nenhum dos isolados sensíveis apresentando a variável mutante; dentre os resistentes a freqüência da mutação em questão foi significativamente maior nos isolados resistentes a isoniazida que nos MDR (respectivamente 27% e 2,6%,  $p = 0,03$ , OR = 0,07, IC 0,00 – 0,97).

Na análise dos isolados provenientes do Rio de Janeiro, a freqüência geral foi de 3,3%, sendo de 6,2% em isolados resistentes e 1,9% entre os sensíveis, sem significância estatística ( $p = 0,08$ , OR = 3,40 IC 0,69 – 18,49). Dentre os isolados resistentes a freqüência foi de 8,5% par os isolados resistentes à isoniazida e 5,6% em isolados MDR, sem significância estatística ( $p = 0,64$ , OR = 0,49, IC 0,08 – 6,04). O Rio de Janeiro foi a única região onde a variante 619A foi observada em isolados sensíveis as drogas utilizadas no tratamento anti-TB.

O número de isolados analisados da região nordeste (Ceará) foi pequena, tornando difícil analisar de maneira confiável a freqüência deste polimorfismo nesta região (Tabela 4.3).

A análise da distribuição da variante 619A de acordo com a procedência dos isolados mostrou também que a frequência geral desta variante foi duas vezes maior nos isolados de Porto Alegre que nos de São Paulo e Pará, e quatro vezes maior que nos isolados do Rio de Janeiro. No Ceará a variante pesquisada não foi encontrada (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3:** Frequência da variante mutante 619A nos isolados clínicos de acordo com a região.

Perfil de sensibilidade	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	
	Pará (n= 48)	Ceará (n= 5)	Porto Alegre (n= 37)	Rio de Janeiro (n= 239)	São Paulo (n= 58)
INH sensíveis	(0/16)	-	(0/6)	0,019 (3/158)	(0/9)
resistentes	0,093 (3/32)	(0/5)	0,094 (5/31)	0,062 (5/81)	0,081 (4/49)
MDR	0,083 (1/12)	(0/4)	0,083 (1/12)	0,056 (3/56)	0,026 (1/38)
R-INH	0,10 (2/20)	(0/1)	0,21 (4/19)	0,080 (2/25)	0,27 (3/11)
<i>Frequência total</i>	<i>(3/48)</i> <i>0,0625</i>	<i>(0/5)</i>	<i>0,135</i> <i>(5/37)</i>	<i>0,033</i> <i>(8/239)</i>	<i>0,068</i> <i>(4/58)</i>



#### 4.1.2. Seqüenciamento de outros genes de *Mycobacterium tuberculosis* associados à resistência a INH.

Tendo em vista os diferentes relatos relacionados à associação entre mutações em alguns genes do *M. tuberculosis* (*katG*, *kasA*, *inhA*, *oxyR-ahpC*) e a resistência à isoniazida, os isolados que apresentaram a variante mutante 619A no gene *nat* foram seqüenciados a fim de verificarmos se o fenótipo de resistência observado era resultante somente da alteração em *nat* ou se era resultante de uma combinação de mutações nos outros genes com o alelo 619A. As seqüências geradas foram alinhadas com a seqüência de referência do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (NC\_000962) e analisados com o auxílio do programa SeqScape (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Seqüências usadas como referência para análise dos genes associados com resistência a INH.

Gene <sup>a</sup>	Lócus <sup>b</sup>	Tamanho <sup>c</sup>
<i>nat</i> Arlamina <i>N</i> -acetil Transferase NAT (Arlamina Acetilase)	Rv3566c	852 pb
<i>inhA</i> enoil-(acil proteína carreadora) redutase	Rv1484	810 pb
<i>oxyR</i> Pseudogene <i>oxyR</i>	Rv2427Ac	517pb
<i>ahpC</i> Acil Hidroperoxide Redutase Proteína C AHPC (Acil Hidroperoxidase C)	Rv2428	588 pb
<i>katG</i> Catalase-Peroxidase-Peroxinitrase T KATG	Rv1908c	2223 pb
<i>kasA</i> 3-oxoacil- sintase (acil proteína carreadora)	Rv2245	1251 pb

<sup>a</sup>Genes e proteínas;

<sup>b</sup>Lócus correspondente ao genoma de *M. tuberculosis* H37Rv;

<sup>c</sup>Tamanho aproximado do fragmento amplificado em pb.

---

Devido a problemas técnicos, não foi possível analisar os quatro genes (*katG*, *InhA*, *oxyR-ahpC* e *KasA*) em 11 dos 20 isolados com a variante 619A (Tabela 4.5). Foram usados dois protocolos de purificação para os produtos amplificados (acetato de amônia e o kit comercial de purificação QIAquick®). As concentrações dos iniciadores e DNA foram testadas, mas infelizmente não foram obtidas seqüências de boa qualidade para análise.

Oito isolados tiveram todos os quatro genes seqüenciados e analisados, cinco isolados tiveram três genes, quatro isolados com dois genes e em três isolados apenas um dos quatro genes foi analisado.

Para o gene *katG*, foi possível analisar 15 dos 20 isolados que apresentaram a substituição G619A no gene *nat*; para tal, parte da região codificante do gene *katG*, considerada como “Hot Spot”, foi seqüenciada. Várias mutações nesta região estão associadas à resistência a INH, sendo as mutações no códon 315 as mais freqüentes. Dos 15 isolados analisados, nove (60%) apresentaram mutação neste códon, oito isolados apresentaram uma substituição de C para G a qual ocasiona a troca de uma serina por um triptofano. Um isolado apresentou uma substituição de C para T na mesma posição acarretando na substituição de uma serina por uma lisina e finalmente. Seis isolados (40%) não apresentaram nenhum tipo de mutação nesta região.

Um fragmento de 216 pb correspondendo a parte da região codificante do gene *inhA* (do códon 63 a 131) foi analisado em 17 isolados e nenhuma mutação foi observada. A região intergênica *oxyR-ahpC* de 319pb foi analisada em 14 isolados, dos quais dois isolados (14,3%) apresentaram mutações C(-39) T e G(-6)A.

A região codificante do gene *kasA* foi seqüenciada em 14 isolados, e apenas um isolado (7,1%) apresentou mutação (G-269-S). Dos oito isolados que tiveram todos os quatro genes seqüenciados, seis apresentavam mutações em *katG* (75%), sendo que um isolado (9039), também apresentou mutações em *kasA* e *xyR-ahpC*. Dois isolados apresentaram somente a mutação 619A no gene *nat* e ambos foram sensíveis a todas as drogas testadas (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5:** Mutações detectadas nos genes *kasA*, *inhA*, *katG* e na região intergênica *oxy-R ahpC* dos isolados de *M. tuberculosis* que apresentam a variante 619A no gene *nat*.

Isolado	Resistência	<i>kasA</i>	<i>inhA</i>	<i>katG</i>	OxyR- <i>ahpC</i>	Estado
C52/00	INH	NR	NR	S315L	NR	SP
C44/00	R-INH	NR	-	NR	-	SP
C2248/00	MDR	NR	NR	-	NR	SP
C1237/00	R-INH	NR <sup>a</sup>	NR	-	NR	SP
9244	MDR	- <sup>b</sup>	-	S315T	-	RS
9210	R-INH	-	-	S315T	-	RS
9092	R-INH	-	-	S315T	-	RS
9039	R-INH	G269S	-	S315T	C (-39)T	RS
8135	MDR	-	-	S315T	G(-6)A	RS
926/00	MDR	NR	-	S315T	-	RJ
528/03	S	-	-	-	-	RJ
394/03	S	-	-	-	-	RJ
378/03	R-INH	NR	-	-	NR	RJ
332	MDR	-	-	S315T	-	RJ
2007/03	S	-	-	NR	-	RJ
1657/96	MDR	-	-	NR	-	RJ
1594/03	R-INH	NR	-	NR	-	RJ
727	R-INH	-	-	NR	-	PA
1114	MDR	-	-	-	NR	PA
1102	MDR	NR	-	S315T	NR	PA

<sup>a</sup>Não realizado;

<sup>b</sup>sem alteração.

---

### 4.1.3 Genotipagem dos isolados de *Mycobacterium tuberculosis* por spoligotyping

Para verificar se a frequência da variante mutante 619A na população estudada foi consequência de um surto de uma ou mais cepas, os mesmos foram genotipados por spoligotyping. Entre os vinte isolados contendo a variante 619A, encontramos dez spoligotipos diferentes, pertencendo a oito diferentes famílias. Cinco isolados (25%) apresentaram o spoligotipo S (tipo 34), oito isolados (40%) tinham perfil característico para a família LAM “Latin-American and Mediterranean family”, sendo um isolado LAM 9, três isolados LAM tipo 2571 e quatro LAM 3 e S convergente; um isolado (5%) apresentou o genótipo Haarlem 3; três isolados (15%) pertenciam a família T (dois isolados T1 e um T3), um isolado apresentou o perfil X1 e encontramos dois perfis não descritos anteriormente (10%), não existentes na versão mais recente do banco de dados internacional de Spoligotyping - SpolDB4 (Tabela 4.6). Todos os isolados da família S eram provenientes do Rio de Janeiro, enquanto que os isolados da família LAM foram de três diferentes locais (Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul).



---

mesmo spoligotipo e serem da mesma região de origem (São Paulo), foi possível verificar que apenas uma apresentava a mutação 619A. A frequência desta mutação foi de 1,8% (2/112) nos isolados seqüenciados. Em outro isolado resistente (0051) foi observada uma substituição de uma citosina por uma timina na posição 20 (C-20-T), acarretando a troca de uma alanina por uma valina no códon 7 (A7V); este isolado apresentou spoligotipo T4.

Quatro isolados sensíveis à isoniazida provenientes do estado do Pará apresentaram uma substituição de uma timina por uma citosina na posição 312 (T-312-C); esta mutação é silenciosa, não causando troca de aminoácido. Todos estes 4 isolados na análise por spoligotyping pertenciam à família EAI5 (East-African Indian) (Figura 4.2 e Tabela 4.7).

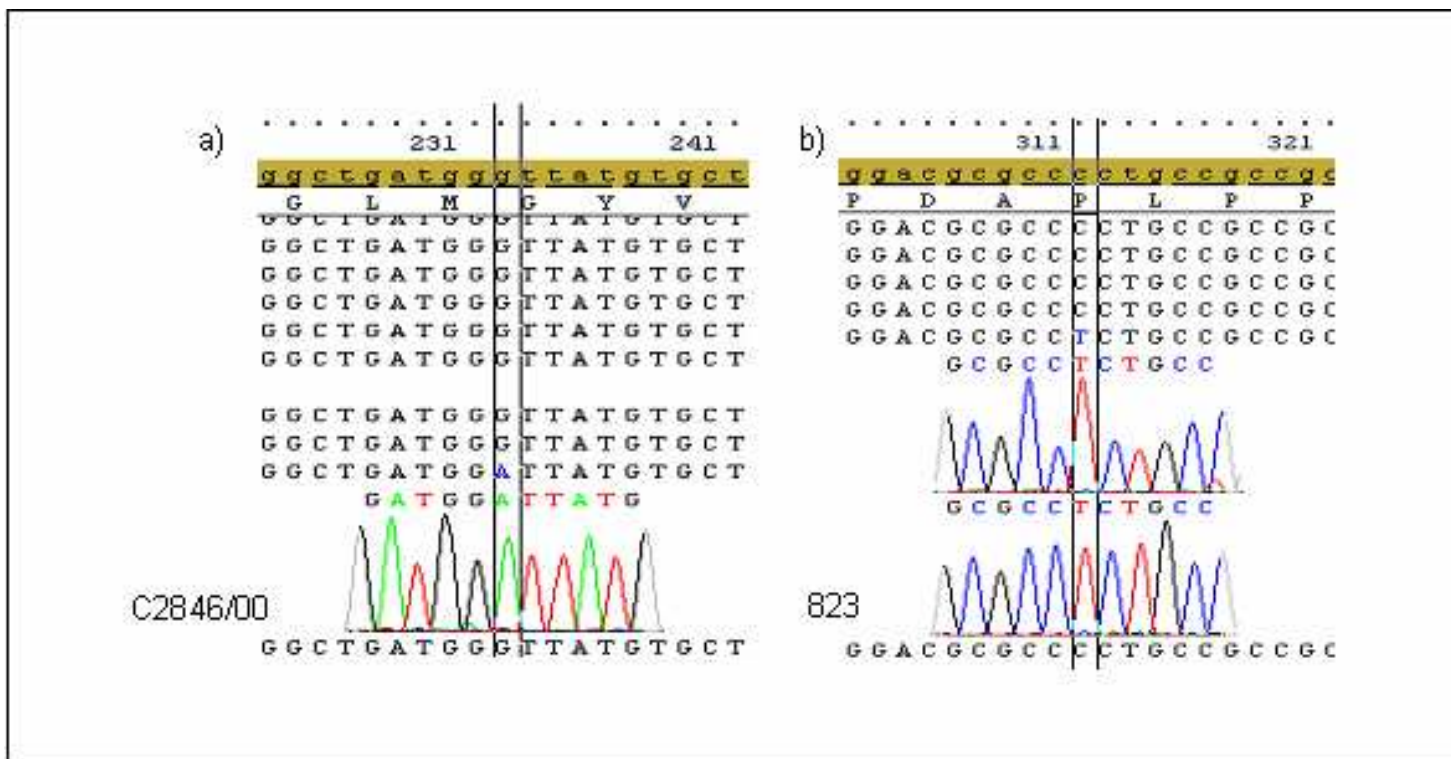


Figura 4.2: Alinhamento e análise das seqüências *nat* em *M.tuberculosis*. a) Isolados C2846/00, novo polimorfismo observado na posição 233(G-A), ocasionando a troca de glicina por um ácido aspártico; b) isolado 823 mutação silenciosa na posição 312.

**Tabela 4.7:** Mutações encontradas no gene *naI* micobacteriano.

Isolado	Sensibilidade INH	Mutação	Tipo de mutação	Alteração	Spoligotipo	Origem
427	S	T312C	silenciosa	-	EAI5	PA
804	S	T312C	silenciosa	-	EAI5	PA
823	S	T312C	silenciosa	-	EAI5	PA
630	S	T312C	silenciosa	-	EAI5	PA
0051	R	C20T	<i>não-sinônima</i>	alanina→valina (A7V)	T4	SP
C2848	R	A233G	<i>não-sinônima</i>	glicina→ác. aspártico(G78D)	LAM3/S convergente	SP
C52/00	R	A233G G619A	<i>não-sinônima</i>	glicina→ác. aspártico (G78D) tirosina→histidina(Y107H)	LAM3/S convergente	SP
C2248/00	R	C529T G619A	<i>não-sinônima</i>	tirosina→histidina (Y107H) glicina→arginina(G207R)	T1	SP



---

## 4.2 Investigação e análise comparativa do gene *nat* em espécies do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*.

Devido a falta de informação em relação a presença e composição do gene *nat* na maioria das espécies do CMTB e a identificação de novos SNPs neste gene em vários isolados de *M. tuberculosis*, decidimos iniciar um estudo para pesquisar a presença de *nat* nas demais espécies do CMTB. Para tal, uma coleção de 16 DNAs de isolados do CMTB recebidos do RIVM (Bilthoven, Holanda), (Tabela 4.8) previamente caracterizados em diferentes grupos e estudos baseados em deleções cromossomiais, SNPs e outros polimorfismos genéticos no genoma do CMTB (Kremer *et al.*, 2005) foi submetida a amplificação pela PCR utilizando o sistema desenhado para a amplificação do gene *nat* de *M. tuberculosis* para o seqüenciamento. Um fragmento com 1069 pb foi amplificado em todos os DNAs, conforme observado em *M. tuberculosis*; todos os produtos amplificados foram seqüenciados.

Quatorze dos dezesseis isolados apresentaram similaridade de 100% da seqüência nucleotídica do gene *nat* quando alinhados contra a seqüência referência de *M. tuberculosis* H37Rv. Dois isolados (*M. africanum* subtipo I isolados 6 e 85), apresentaram uma mutação ainda não descrita, consistindo da substituição de um nucleotídeo na posição 751 A-G (códon 251) acarretando uma troca de um ácido glutâmico por uma lisina. Estes isolados foram recentemente caracterizados melhor usando novos marcadores (Huard *et al.*, 2006), sendo os isolados 6 e 85 reclassificados com sendo *M. africanum* subtipo Ia, o isolado 92 como *M. africanum* subtipo Ib e o isolado 47 como sendo *M. tuberculosis* "Ancestral" (Tabela 4.8). Para a confirmação da mutação *nat*<sup>751</sup>, estes isolados foram novamente amplificados, purificados e seqüenciados.

**Tabela 4.8:** Isolados do Complexo *M. tuberculosis* utilizados para a análise comparativa do gene *nat* em espécies do CMTB.

Isolado	Espécies (segundo Kremer <i>et al.</i> , 2005)	Espécies (segundo Huard <i>et al.</i> , 2006)	Origem
6 <sup>a</sup>	<i>M. africanum</i> subtipo I	<i>M. africanum</i> subtipo Ia	Holanda*
85 <sup>a</sup>	<i>M. africanum</i> subtipo I	<i>M. africanum</i> subtipo Ia	Holanda*
92	<i>M. africanum</i> subtipo II	<i>M. africanum</i> subtipo Ib	Holanda
47	<i>M. africanum</i> subtipo II	<i>M. tuberculosis</i> "Ancestral"	Holanda
76	<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. pinnipedii</i>	Argentina
81	<i>M. pinnipedii</i>	<i>M. pinnipedii</i>	Argentina
117	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	Argentina
128	<i>M. bovis</i>	<i>M. bovis</i>	Holanda
2	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG	Holanda
71	<i>M. bovis</i> BCG	<i>M. bovis</i> BCG	Japão
116	<i>M. canettii</i>	<i>M. canettii</i>	Somália
129	<i>M. canettii</i>	<i>M. canettii</i>	Somália
25	<i>M. microti</i>	<i>M. microti</i>	Inglaterra
62	<i>M. microti</i>	<i>M. microti</i>	Inglaterra
13	<i>M. tuberculosis</i> (Haarlem)	<i>M. tuberculosis</i> (Haarlem)	Sri Lanka
22	<i>M. tuberculosis</i> (Beijing)	<i>M. tuberculosis</i> (Beijing)	Mongólia

<sup>a</sup> Isolados com a mutação no gene *nat* 751-A/ E251K.

Para verificar se a presença da mutação G751A era uma particularidade das cepas de referência ou se também encontrava-se especificamente em isolados de *M. africanum* subtipo Ia, escolhemos como estratégia inicial o seqüenciamento de um fragmento de 452 pb (final da região codificante) do gene *nat* em mais 17 isolados de CMTB provenientes de uma coleção de 124 isolados compreendendo isolados clínicos, veterinários e cepas de referências disponibilizadas pelo Dr. Huard (Columbia University Medical Center-The New York - Presbyterian Hospital, University Hospital Columbia and Cornell, New York, EUA-anexo 2). Esta coleção inclui oito isolados dos 16 que tiveram o gene *nat* seqüenciado previamente neste estudo (isolados 6, 47, 92, 76, 85, 81, 116 e 117).

Dentre os dezessete isolados, cinco isolados eram de *M. africanum* (três *M. africanum* subtipo Ia e dois *M. africanum* subtipo Ib) e outras espécies representativas do CMTB (Tabela 4.9). O polimorfismo G-751-A foi observado somente nos 3 isolados de *M. africanum* subtipo Ia (Figura 4.3).

Com intuito de verificar se o SNP G751A ocorria em outros isolados clínicos de *M. africanum* ou em outras espécies do CMTB, toda a coleção de 124 isolados de CMTB foi avaliada (anexo 2).

**Tabela 4.9:** Relação dos isolados usados para o seqüenciamento parcial de *nat* em isolados do CMTB, para a busca do SNP G-751-A.

Cepa:	CMTB Subespécies:	Isolado de:	Origem:
68.717	dassie bacillus	Hyrax <sup>6</sup>	África do Sul
ATCC25420	<i>M. africanum</i> subtipo Ia	Humano	Senegal
Percy 34	<i>M. africanum</i> subtipo Ia	Humano	Somália
Percy18	<i>M. africanum</i> subtipo Ia	Humano	Nigéria
AF0236	<i>M. africanum</i> subtipo Ib	SI	SI
Percy204	<i>M. africanum</i> subtipo Ib	Humano	Camarões
ATCC19210	<i>M. bovis</i>	Vaca	USA
BCG0336	<i>M. bovis</i> BCG	SI <sup>7</sup>	SI
21794	<i>M. canetti</i>	Humano	França
Cip10577	<i>M. caprae</i>	Cabra	Espanha
ATCC19422	<i>M. microti</i>	Ratazana	Reino Unido
FCC69	<i>M. pinnipedii</i>	Foca	Austrália
Percy290	<i>M. tuberculosis</i> "Modern"	Humano	França
Cb33	<i>M. tuberculosis</i> "Modern"	Humano	USA
ATCC15190	<i>M. tuberculosis</i> "Modern"	Humano	USA
Percy211	<i>M. tuberculosis</i> "Ancestral"	Humano	França
CA24	oryx bacillus	Oryx <sup>8</sup>	Arábia Saudita

<sup>6</sup> Espécie de mamífero razoavelmente pequeno, herbívoro da ordem Hyracoidea, encontrado na África e no Oriente Médio.

<sup>7</sup> SI= Sem informação.

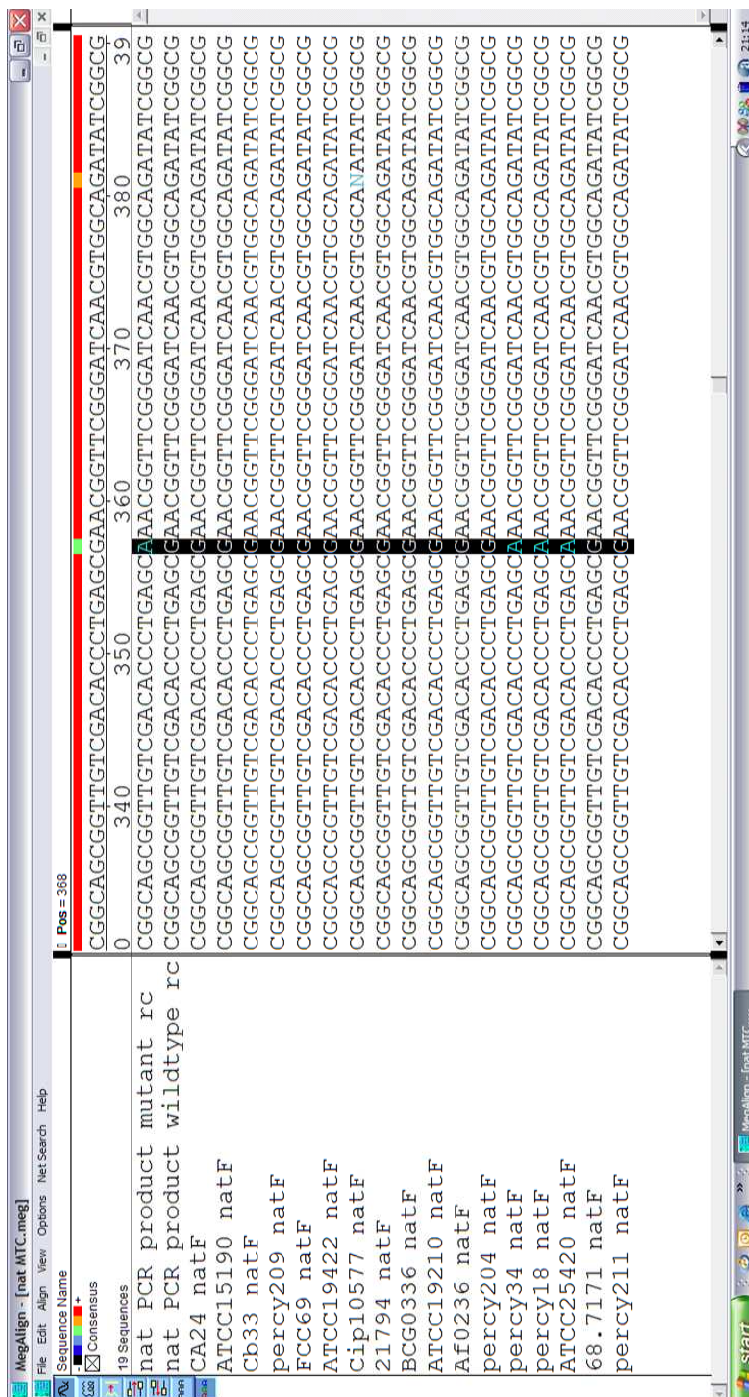


Figura 4.3: Análise das seqüências (*nat*) em espécies pertencentes ao CMTB para a confirmação do polimorfismo G-751-A. Apenas a segunda metade do gene foi seqüenciada, usando os iniciadores nat3F e nat4R<sup>8</sup>; a posição das bases figura não representa a posição exata da mutação no gene *nat*.

<sup>8</sup> Espécie de antílope do gênero *oryx* encontrados na África, Ásia e no sul de Israel.

---

#### **4.2.1 Desenvolvimento de protocolo de PCR-RFLP para a genotipagem do SNP G751A.**

Utilizamos o programa MapDraw para a busca de possíveis sítios de enzimas de restrição para a detecção da variante mutante e nenhum sítio para detecção deste SNP através de digestão enzimática foi encontrado. Como estratégia alternativa um novo par de iniciadores foi desenhado (natRFLP-F e natRFLP-R; Tabela 3.3) que permitiu a criação de um produto amplificado contendo um sítio de restrição para a enzima *Bcgl*, permitindo assim a diferenciação visual entre a presença ou não da variante G-751-A. A utilização desta abordagem em isolados previamente caracterizados através de seqüenciamento confirmou a eficiência e especificidade do sistema (Figura 4.4).

#### **4.2.2 Especificidade do SNP G-751-A para detecção de *Mycobacterium africanum* subtipo Ia.**

Uma vez padronizada a metodologia para a identificação desta variante, submetemos todos os isolados, inclusive os que já haviam tido o gene *nat* seqüenciado (Anexo 2) a este sistema de PCR-RFLP. Novamente, somente os isolados de *M. africanum* Ia (n=18) apresentaram o padrão de restrição compatível com a presença do nucleotídeo A na posição 751 (Tabela 4.10), confirmando assim os resultados anteriores e mostrando que este SNP é um marcador específico para *M. africanum* subtipo Ia.

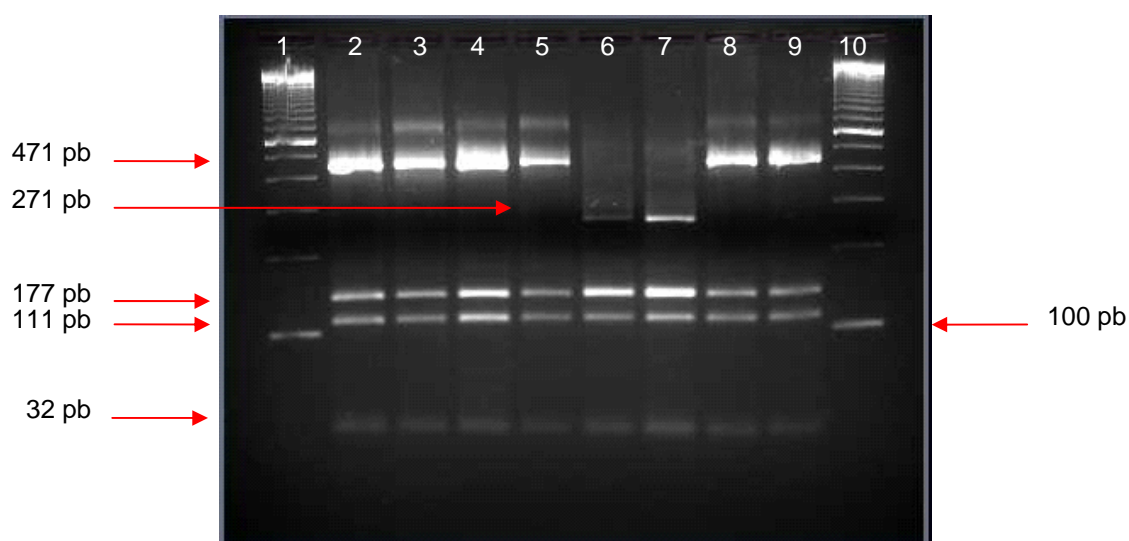


Figura 4.4: PCR-RFLP para a detecção da mutação 751A em espécies próximas do CMTB. 30  $\mu$ L do produto amplificado por foram digeridos por 4 horas com 8U da enzima *Bcgl*. Poço 1 e 10: 100 bp ladder; poço 2: *M. tuberculosis* (CDC1551); poço 3, *M. tuberculosis* (ATCC15910); Poço 4: *M. africanum* subtipo Ib (AF0271); poço 5: *M. africanum* subtipo Ib (15082); poço 6: *M. africanum* subtipo Ia (ATCC25420); Poço 7: *M. africanum* subtipo Ia (1565/93); poço 8: *M. microti* (CDC97-1297); poço 9: *M. bovis* BCG (BCG0336).

**Tabela 4.10:** Isolados submetidos a PCR-RFLP para a detecção do SNP 751A no gene *nat*.

CMTB	Nº de isolados analisados (124)	<i>nat</i> <sup>751</sup>
<i>M. canettii</i>	5	G
<i>M. tuberculosis</i> PGG1b Ancestral	6	G
<i>M. tuberculosis</i> PGG1b Moderno	13	G
<i>M. tuberculosis</i> PGG2 Moderno	20	G
<i>M. tuberculosis</i> PGG3	5	G
<i>M. africanum</i> 1b	11	G
<i>M. africanum</i> 1a	18	A
dassie bacillus	4	G
oryx bacillus	2	G
<i>M. microti</i>	10	G
<i>M. pinnipedii</i>	7	G
<i>M. caprae</i>	1	G
<i>M. bovis</i>	14	G
<i>M. bovis</i> BCG	8	G

Após a validação deste polimorfismo em isolados do CMTB anteriormente caracterizados, com o objetivo de melhor avaliar o poder discriminatório do G751A para a diferenciação de *M. tuberculosis* de *M. africanum* I a e dos subtipos Ia e Ib, avaliamos uma outra coleção proveniente da República de Gana (Oeste da África) composta supostamente somente de isolados de *M. tuberculosis* e *M. africanum* provenientes de pacientes com TB pulmonar (Anexo 3).

### 4.2.3. Melhor caracterização de isolados do Complexo *Mycobacterium tuberculosis*

Após a definição da variante G751A no gene *nat* nestes isolados, submetemos os mesmos a uma caracterização rigorosa. Para a caracterização destes isolados selecionamos alguns marcadores (SNPs e LPGs) que em combinação permitiriam a diferenciação de espécies do CMTB. Inicialmente, verificamos a presença do gene *cpf32*, descrito como sendo exclusivo de organismos do CMTB (Huard *et al.* 2002 e 2003), para confirmar que todos os isolados pertencem ao CMTB. A presença de mais 15 SNPs foi examinada através de PCR-RFLP nos seguintes loci: *hsp65*<sup>540</sup>, *rpoB*<sup>1163</sup>, *rpoB*<sup>1049</sup>, *katG*<sup>203</sup>, *katG*<sup>463</sup>, *gyrB*<sup>1450</sup>, *gyrA*<sup>95</sup>, *rv1510*<sup>1129</sup> e PRONarGHJI<sup>251</sup>. Adicionalmente, desenvolvemos novos protocolos de PCR-RFLP para os três SNPs nos loci *aroA*<sup>117</sup>, *cpf 32*<sup>311</sup> e TbD1<sup>197</sup> (Figuras: 4.6, 4.7 e 4.8). Analisamos, através de seqüenciamento, a presença de outros quatro SNPs nas regiões definidas como *RD13*<sup>174</sup>, *PPE55*<sup>2148</sup> e *PPE55*<sup>2154</sup>, microdeleções em *pks15/1* (Goh *et al.*, 2005, Huard *et al.*, 2003 e 2006)

Durante o desenvolvimento deste estudo foi identificada uma outra mutação, ainda não descrita, localizada na região RD711 e composta por uma substituição T por G (RD711<sup>390</sup> G-T)<sup>9</sup>; sendo esta uma mutação não sinônima que acarreta na troca de uma valina por uma leucina (V175U). A região onde ocorre esta mutação é conservada em todas as espécies do CMTB e corresponde ao locus Rv1332 em *M. tuberculosis* H37Rv codificando para uma proteína que possivelmente está envolvida na transcrição.

Tentamos desenvolver um protocolo de PCR-RFLP para a detecção desta mutação, mas esta região não apresenta sítio de restrição que possibilite a diferenciação direta através desta abordagem. Sendo assim, desenhamos iniciadores para amplificar e seqüenciar a região contendo RD711<sup>390</sup> G-T e 37 dos 124 isolados foram seqüenciados (Tabela 4.12). Este polimorfismo mostrou ser exclusivo para *M. africanum* subtipo Ib e decidimos e então incluí-lo na avaliação,

<sup>9</sup> A posição 390 corresponde ao alinhamento da região RD711, quando comparada ao *M. tuberculosis* H37Rv.



---

compondo o painel de análise para diferenciação dos isolados de Gana. Todos os 47 isolados tiveram o locus RD711 e somente os isolados de *M. africanum* Ib (n= 20) apresentaram a variante mutada (Tabela 4.11).

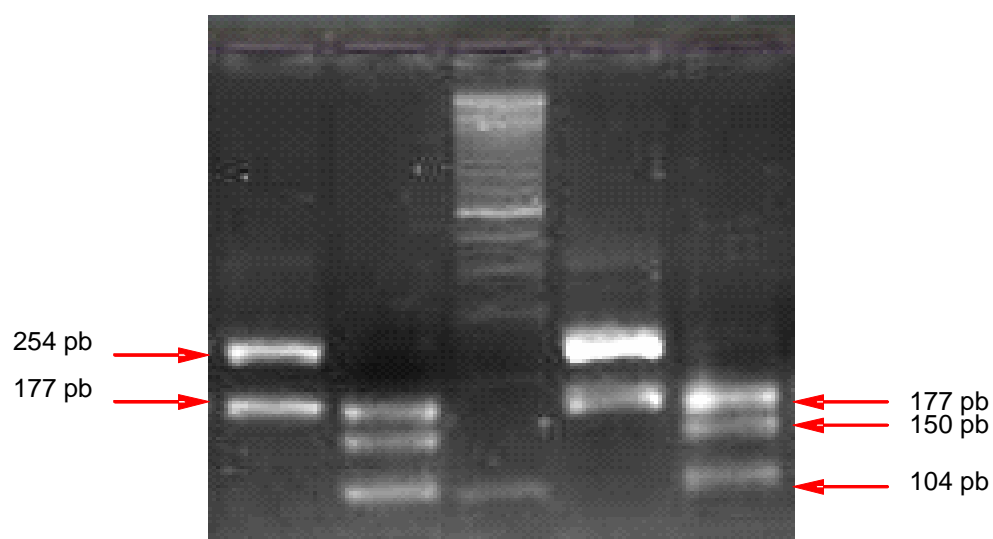


Figura 4.5: PCR-RFLP *aroA*<sup>177</sup> para diferenciação de espécies do CMTB. Digestão do produto amplificado (431 pb) com a enzima de restrição *BssH* II. Eletroforese em gel de agarose 2% TAE I X, corado com brometo de etídio. poços 1 e 4: *M. africanum* subtipo Ib (isolados: 5434.02 e 5473.02); poço 3: marcador de 100 pb; Poço 2: *M. africanum* subtipo Ia (isolados 5468.02) e poço 5: *M. tuberculosis* (isolado 10348.01).

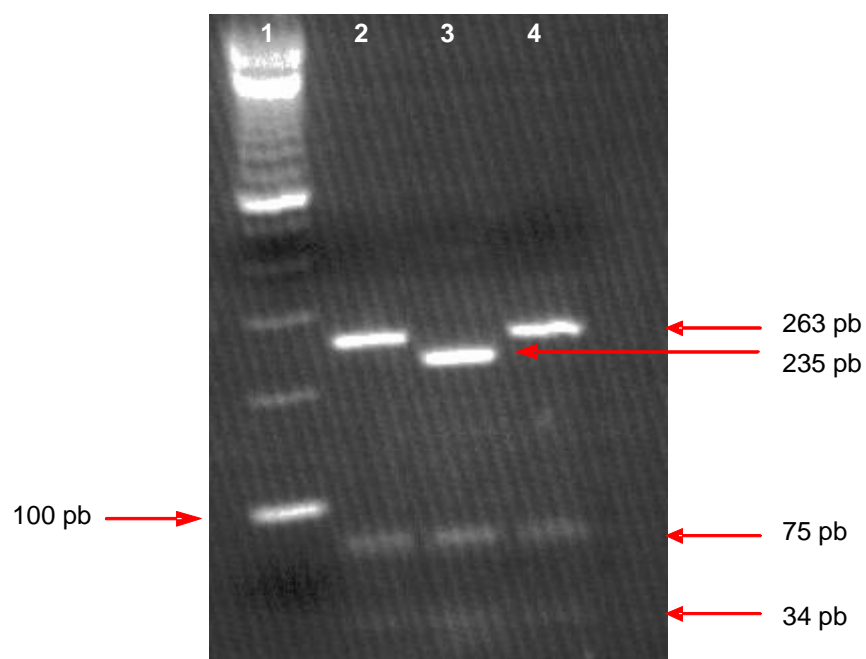


Figura 4.6: PCR-RFLP *cpf32*<sup>311</sup> para diferenciação de espécies do CMTB. Digestão do produto amplificado (373 pb) com a enzima de restrição *BstN I*. Eletroforese em gel de agarose 3% TAE I X, corado com brometo de etídio. Poço 1: marcador de 100 pb; poço 2: *M. tuberculosis* (isolado: 1417.02); poço 3: *M. africanum* subtipo Ia (isolado 5383.02) poço 4: *M. africanum* subtipo Ib (isolado 1443.2). A banda de 28 pb

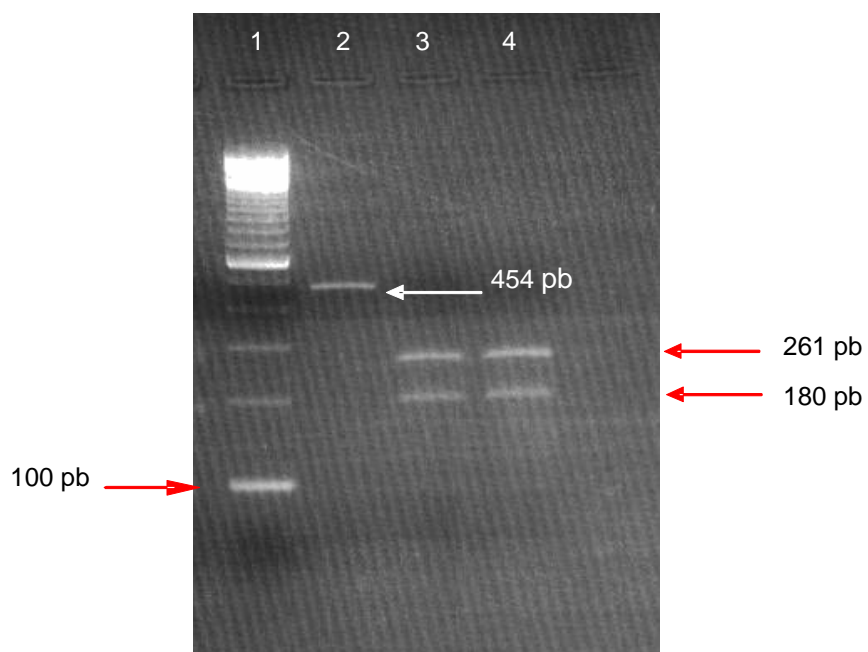


Figura 4.7: PCR-RFLP TbD1<sup>197</sup> para diferenciação de espécies do CMTB. Digestão do produto amplificado (500 pb) com a enzima de restrição *Tse I*. Eletroforese em gel de agarose 2% TAE I X, corado com brometo de etídio. Poços 1: marcador de 100 pb; poço 2: *M. africanum* subtipo Ib (isolado: 1443.02); poço 3: *M. africanum* subtipo Ia (isolado: 5383.02); poço 4: *M. africanum* subtipo Ia (isolado: 5383.02).

**Tabela 4.11:** SNPs investigados para diferenciação das cepas de Gana

Lócus	<i>M. tuberculosis</i> (n= 18)	<i>M. africanum</i> subtipo Ia (n= 9)	<i>M. africanum</i> subtipo Ib (n= 20)
<i>hsp65</i> <sup>540</sup>	C	G	C
<i>rpoB</i> <sup>1163</sup>	C	T	C
<i>rpoB</i> <sup>1049</sup>	C	C	C
<i>katG</i> <sup>203</sup>	C	T	C
<i>katG</i> <sup>463</sup>	G	T	T
<i>gyrB</i> <sup>1450</sup>	G	T	T
<i>nat</i> <sup>751</sup>	G	A	G
<i>aroA</i> <sup>285 c</sup>	A	A	G
<i>gyrA</i> <sup>95</sup>	C	C	C
<i>cfp32</i> <sup>311</sup>	G	A	A
TbD1 <sup>197</sup>	- <sup>a</sup>	A	C
Rv 1510 <sup>1129</sup>	G	A	G
PRONarGHJI <sup>-215</sup>	T	C	C
PPE55 <sup>2148</sup>	A	G	A
PPE55 <sup>2154</sup>	A	G	A
RD711 <sup>390</sup>	G	G	T

<sup>a</sup> A região TbD1 é deletada em *M. tuberculosis*, sendo assim não apresenta este SNP.

**Tabela 4.12:** Isolados CMTB que foram seqüenciados para a detecção da variante RD711<sup>390</sup> G-T

Espécies CMTB	Isolado	RD711 <sup>390</sup>
<i>M. canettii</i>	96-46 17727	G
<i>M. tuberculosis</i>	Percy 157b Percy 211	G
<i>M. tuberculosis</i>	Percy 91 Percy 209	G
<i>M. tuberculosis</i>	Percy 47 97-279	G
<i>M. tuberculosis</i>	NYiso ATCC27294 (H37Rv)	G
<i>M. africanum</i> subtipo lb	Percy 13 Percy 16 Percy 17 Percy 56 Percy 58 Percy 59 Percy 60 Percy 99A Percy 200 15082 AF0236 AF0271	T
<i>M. africanum</i> subtipo la	ATCC25420 1225/93	G
dassie bacillus	14114 FCC49	G
oryx bacillus	CA-24 CA-69	G
<i>M. microti</i>	ATCC11152 97-2272	G
<i>M. pinnipedii</i>	CA-81 FCC72	G
<i>M. caprae</i>	CIP 1055776	G
<i>M. bovis</i>	ATCC 35732 ATCC 27290	G
<i>M. bovis</i> BCG	ATCC35732 ATCC27290	G

---

Outras regiões de diferença, inclusive RD701, RD702, RD711 e RD713, TbD1, RD7, RD8 e RD9, foram caracterizadas através de protocolos de PCR desenvolvidos por Huard *et al.* (2003 e 2006), para amplificação destas regiões polimórficas, levando a observação de novas deleções. Os loci RD701, RD702, RD711 e RD713 foram analisados por PCR, usando iniciadores que flanqueiam LSPs, gerando produtos amplificados de tamanhos diferentes, dependendo da presença ou ausência de deleções (Tabela 3.2). Enquanto isolados de *M. tuberculosis* não apresentam deleções nestas regiões, apresentando bandas de 2081, 2101, 2885 e 4248 pb, respectivamente; os isolados de *M. africanum* subtipo Ia, apresentam deleções nos loci RD701 e RD702 (340 e 732 pb) e o *M. africanum* subtipo Ib apresentam deleções nos loci RD711 e RD713 (942 e 2798 pb), quando comparados à *M. tuberculosis* que apresenta estas regiões integras.

Devido a ausência de reprodutibilidade dos protocolos para análise dos loci TbD1, RD7, RD8 e RD9, descritos anteriormente (Huard *et al.*, 2006), desenvolvemos novos protocolos de PCR (Figuras 4.8 e 4.9), utilizando dois iniciadores externos (“forward” e “reverse”) e um iniciador interno para cada locus. Segundo esta estratégia, caso a região investigada contiver a deleção, os dois iniciadores externos anelam gerando um produto de PCR específico de aproximadamente 500 pb; se a região tiver a deleção os iniciadores externos não geram amplicons devido ao tamanho das seqüências investigadas. Neste caso, um dos iniciadores externos junto ao iniciador interno gera um produto de PCR de aproximadamente 300 pb (Figuras 4.8 e 4.9).

Todos os isolados de *M. tuberculosis* apresentaram apenas o locus TbD1 deletado, enquanto os isolados de *M. africanum* subtipo Ib apresentam deleções nos loci TbD1, RD9 e RD711, *M. africanum* subtipo Ia apresentam todos com exceção do locus TbD1 e RD711 deletado (Tabela 4.13). Conforme descrito anteriormente (Huard *et al.*, 2006).

Estes novos protocolos se mostraram rápidos e eficientes para a diferenciação de espécies do CMTB. Informações mais detalhadas sobre a localização dos diferentes loci, mutações usados, encontra-se nos anexos 4 e 5.

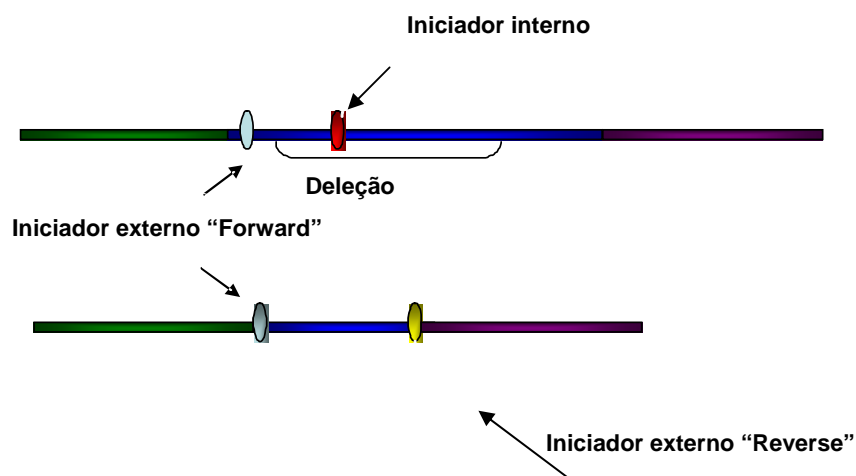


Figura 4.8: Desenho dos iniciadores usados nos novos protocolos da PCR usado para amplificar os loci TbD1, RD7, RD8 e RD9. Três iniciadores foram usados para amplificar estes loci, com ou sem deleção.

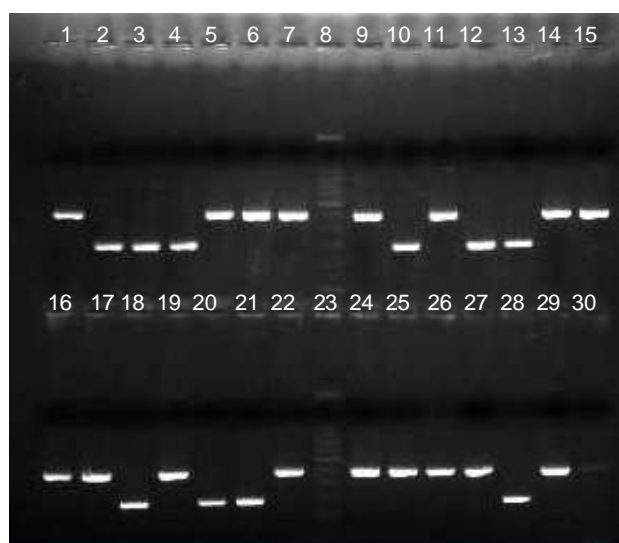


Figura 4.9: RD9 Flanking. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 2% TAE 1X. Poços 8 e 23: marcador de 100 pb; poços 2-4, 10, 12, 13, 18, 20, 21: *M. tuberculosis*; poços: 1, 5-9, 11, 14-16, 19, 22, 25, 30 *M. Africanum* subtipo Ib; lpoços 17, 24, 26: *M. africanum* subtipo Ia; poços: 28-30 controles positivos, *M. tuberculosis* H37RV (ATCC2794) e *M. africanum* subtipo Ia (ATCC25420) e *M. africanum* subtipo Ib (AF0236)



**Tabela 4.13 :** Distribuição dos isolados de Gana de acordo as com deleções.

Isolados de gana	TbD1 flank <sup>a</sup>	RD7 flank <sup>a</sup>	RD8 flank <sup>a</sup>	RD9 flank <sup>a</sup>	RD10 flank <sup>a</sup>	RD701 flank <sup>b</sup>	RD702 flank <sup>b</sup>	RD711 flank <sup>b</sup>	RD713 flank <sup>b</sup>	<i>cpf32</i> gene <sup>f</sup>	<i>pks15A</i> <sup>g</sup>
<i>M. tuberculosis</i> (n= 18)	Del <sup>c</sup>	Int.	Int.	Int.	Int.	Int.	Int.	Int.	Int.	+	7
<i>M. africanum Ia</i> (n= 9)	Int <sup>d</sup>	Del	Del	Del	Del	Del	Del	Int.	- <sup>e</sup>	+	6
<i>M. africanum Ib</i> (n=20)	Del	Int.	Int.	Del	Int.	Int.	Int.	Del	Int.	+	0

<sup>a</sup> Região de diferença amplificada usando iniciadores internos e externos;

<sup>b</sup> Região de diferença amplificada usando externos;

<sup>c</sup> Região deletada;

<sup>d</sup> Região intacta;

<sup>e</sup> Falha na amplificação, por ser tratar de uma região complexa, onde ocorre a sobreposição com RD7 e RD2 (Huard *et al.* 2006),

<sup>f</sup> Presença do gene.

<sup>g</sup> Números de nucleotídeos deletados, detectado por seqüenciamento.

---

A análise combinatória de todos os loci polimórficos descritos nas Tabelas 4.11 e 4.13 possibilitou a classificação dos isolados de Gana em espécies e subtipos: dos 47 isolados, 18 isolados foram identificados como sendo *M. tuberculosis*, nove isolados como *M. africanum* subtipo Ia e 20 isolados como *M. africanum* subtipo Ib.

Os mesmos isolados foram caracterizados como pertencendo a dois dos três grupos genéticos principais (PGGs). Todos os isolados classificados com sendo *M. africanum* (subtipo Ia e Ib) apresentaram a combinação alélica que permite considerá-los como sendo do grupo 1 (códon 463 *katG* CTG e *gyrA* códon 95 ACC). Os isolados de *M. tuberculosis* apresentaram a combinação códon 463 *katG* (CGG) e *gyrA* códon 95, sendo assim, considerados como grupo 2. Nenhum isolado foi identificado como sendo do grupo 3, caracterizados pela combinação de (463 *katG* (CGG) e *gyrA* códon 95 (AGC).

As mutações em *nat*<sup>751</sup> e RD711<sup>390</sup> são específicas dos subtipos de *M. africanum* e ocorreram em momentos diferentes na escala evolutiva atualmente proposta para as espécies do CMTB (Huad *et al.*, 2006) podendo portanto ser utilizadas em combinação com outros marcadores para diferenciação dos subtipos de *M. africanum* (Figura 4.11).

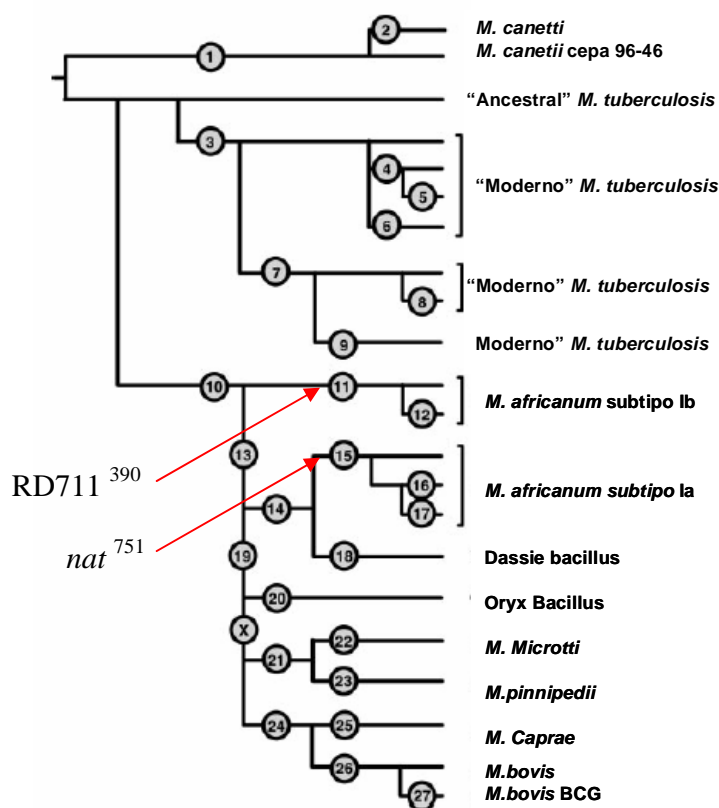


Figura 4.10: A atual interpretação filogenética do CMTB (Huard *et al.*,2006) mostra a divisão do CMTB segregado de acordo com a presença de polimorfismos (inter- e intra- específicos). Os círculos correspondem aos lugares pontuais na história evolutiva onde possivelmente ocorreram as mutações que levaram ao polimorfismos. Os círculos numerados na figura correspondem: círculo 1: RD12<sup>can</sup>, *hsp65*<sup>631</sup>, *gyrB*<sup>can</sup>, *mmpL6*<sup>1879</sup>, *oxyR*<sup>183</sup>, *pncA*<sup>138</sup>, Rv0911<sup>249</sup>, RD13<sup>255</sup> e *aroA*<sup>91</sup>; círculo : 2, *PPE55*<sup>can</sup>; círculo :3, TbD1 e *narGHJI* SNP; círculo : 4, N-RD25tbA; círculo 5: RD1tbB; círculo 6:, N-RD25tbB; círculo 7:, *pks15/1* (deleção de 7 pb ), *katG*<sup>463</sup> e a perda dos espaçadores 33-36 no spoligotyping; círculo 8:, *aroA*<sup>117</sup>; círculo 9: *gyrA*<sup>95</sup>; círculo 10:, RD9 and *gyrB*(1450G3T); círculo 11:, RD713, TbD1<sup>197</sup> e *aroA*<sup>285</sup>; círculo 12: RD711; círculo 13:, RD7, RD8, RD10, *pks15/1* (deleção de 6 pb), *3\_cfp32*<sup>311</sup>, RD13<sup>174</sup>, *PPE55*<sup>2148</sup> e *PPE55*<sup>2154</sup>; círculo 14:, Rv1510<sup>1129</sup>; círculo 15: RD701, RD702 e *hsp65*<sup>540</sup>; círculo: 16, *rpoB*<sup>1163</sup>; círculo: 17, *rpoB*<sup>1049</sup>; círculo: 18, RD1das, N-RD25das, *3\_cfp32*<sup>224</sup> e Rv0911<sup>389</sup>; círculo 19: *mmpL6*<sup>551</sup>; círculo 20: *gyrB*<sup>oryx</sup>, TbD1<sup>171</sup>, *PPE55*<sup>2162</sup> e *PPE55*<sup>2163</sup>; círculo 21: MiD3 e RD13<sup>380</sup>; círculo l22: *gyrB*<sup>mic</sup>, 16S rRNA<sup>1234</sup> e RD13<sup>67</sup>; círculo 23: 16S rRNA<sup>1249</sup> e RD13<sup>228</sup>; círculo: 24, RD12, RD13 e deleção nos espaçadores 3 e 2 N-RD25bovis/cap, *gyrB* (756G3A) e *oxyR*285; círculo 25:, *gyrB*<sub>(1311T3G)</sub>; círculo 26: RD4, *gyrB* (1410C3T) e *pncA*<sup>169</sup> e círculo 27:, RD1BCG. Observações: Os números são arbitrários e não refletem o número de variantes filogeneticamente relevantes em cada junção. A deleção dos espaçadores 40-43 ocorreu como um evento subsequente de divergência do oryx bacillus pontualmente no círculo X. Esta figura foi adaptada da publicada por Huard *et al.*,2006.

---

## **5 Discussão**

### **Mutações no gene *katG* de *Mycobacterium tuberculosis* e a resistência à isoniazida.**

A isoniazida foi introduzida no esquema de tratamento da tuberculose em 1952 e atualmente é usada tanto para o tratamento quanto na quimioprofilaxia da doença. De todas as drogas anti-TB a mesma é apontada com sendo a mais importante por apresentar um efeito bactericida alto e precoce<sup>10</sup>. Logo após a sua introdução, foram observados os primeiros casos de resistência à isoniazida, alguns associados com redução da atividade enzimática da catalase (Middlebrook e Dressler 1954). Contudo, a melhor definição da relação entre a perda da atividade desta enzima e a resistência a droga foi apresentada apenas em 1992, através da caracterização do gene *katG*, que codifica para uma enzima bifuncional com atividade catalase-peroxidase em *M. tuberculosis* (Zhang *et al.*, 1992)

Apesar da isoniazida ser usada no tratamento da tuberculose há mais de 50 anos, os mecanismos de ação e resistência ainda não foram totalmente esclarecidos. A isoniazida é considerada uma pró-droga, entrando no *M. tuberculosis* por difusão passiva, sendo em seguida ativada pela enzima bacteriana catalase-peroxidase (codificada pelo gene *katG*) e gerando metabólitos que potencialmente interrompem vários processos celulares através de um efeito pleitrópico (Bardou *et al.*, 1998). Basicamente, duas enzimas intracelulares, a “NADH-dependent enoyl acyl carrier protein (ACP) reductase”, codificada pelo gene *inhA*, e a “ $\beta$ -ketoacyl ACP synthase”, codificada pelo gene *kasA*, ambas envolvidas na biosíntese de ácidos micólicos, são os alvos para a isoniazida ativa (Dessen, *et al.*, 1995; Marrakchi *et al.*, 2000). Mutações nestes

---

<sup>10</sup> O efeito bactericida precoce seria o tempo ou velocidade em que a INH leva para iniciar seu efeito bactericida na fase inicial do tratamento.

---

genes e na região intergênica *oxyR-ahpC* são encontradas frequentemente em isolados resistentes à isoniazida.

Vários estudos estão sendo conduzidos com o objetivo de detectar polimorfismos ou mesmo outros genes envolvidos na resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida. Como resultado, vários genes associados com a resistência esta droga já foram identificados, inclusive *fbpC*, *fabD*, *accD6*, *efpA* and *ndh* (Ramaswamy *et al.*, 2003). O entendimento da natureza e freqüência de mutações associadas à resistência do *M. tuberculosis* às drogas usadas no tratamento anti-tuberculose podem auxiliar no diagnóstico, no tratamento mais eficiente e específico, e até mesmo no desenvolvimento de novas drogas.

A participação do hospedeiro no desenvolvimento de resistência contra antibióticos também é conhecida. Com relação a INH, a importância da relação entre os níveis da droga e o surgimento de culturas resistentes foi relatada há bastante tempo (Selkon *et al.*, 1964). A concentração de INH no soro é influenciada por inúmeros fatores, porém, o mais importante está relacionado com a metabolização de primeira passagem ocorrida principalmente, mas não exclusivamente no fígado, onde a isoniazida é acetilada, pela ação da enzima *N*-acetiltransferase 2, codificada pelo gene *NAT2* (humano). Em alguns casos, a acetilação reduz drasticamente a concentração da droga, podendo até mesmo atingir níveis sub-terapêuticos, o que permitiria (ou ajuda) a seleção de cepas resistentes. O sucesso ou a falha do tratamento da tuberculose provavelmente é o resultado da interação do “background” genético do hospedeiro e do patógeno.

O gene *nat* em *M. tuberculosis* também codifica para uma *N*-acetiltransferase cujo produto acetila isoniazida *in vitro* (Payton *et al.*, 1999; Upton *et al.*, 2001a). Recentemente foi demonstrado o envolvimento de *nat* micobacteriano na síntese de ácidos micólicos e outros componentes da parede celular micobacteriana (Bhakta *et al.*, 2004). Quando se cresce *M. tuberculosis in vitro* na presença de isoniazida, há aumento da expressão de *nat*; porém, ainda não está claro se este gene desempenha algum papel na resistência do parasito a esta droga. Sabe-se que isoniazida interage com o *nat*

---

micobacteriano mas um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nesta interação ainda se faz necessário (Bhakta, *et al.* 2004; Sholto-Douglas-Vernon *et al.* 2005).

A presença de um SNP na posição 619 (G619A) do gene *nat* em isolados clínicos de *M. tuberculosis* randomicamente selecionados foi constatada em 2001 (Upton *et al.*). Neste trabalho, os autores sugerem que este polimorfismo estaria associado a pequenas modificações na concentração inibitória mínima da isoniazida para os isolados portadores da variante mutante 619-A.

O objetivo inicial deste trabalho foi determinar a prevalência da variante mutante *nat* 619-A nas cepas de *M. tuberculosis* circulantes em algumas regiões do Brasil e avaliar uma possível associação da mesma com a resistência à isoniazida. Durante o desenvolvimento deste trabalho, decidimos analisar a seqüência inteira deste gene em alguns isolados para verificar se haveriam novos SNPs. Devido a ausência de informação sobre este gene em outras micobáctérias do CMTB, resolvemos também analisar este gene em outras espécies do CMTB.

Em primeira instância a presença da variante mutante 619A foi analisada em 443 isolados clínicos de *M. tuberculosis*. A freqüência desta mutação nos isolados em geral foi de 5,2%; esta freqüência foi menor do que as observadas anteriormente em dois estudos em isolados da África do Sul, que foram respectivamente 18 e 20% (Uptom *et al.*, 2001; Sholto-Douglas-Vernon *et al.* 2005a). A diferença entre as freqüências observadas neste estudo e nos outros poderia ser causada pela diferença genética ou ainda pelo critério de seleção da amostragem. Adicionalmente, encontramos em nosso estudo a variante mutante 619A em três isolados sensíveis a INH (1,6%), o que não foi observado nos trabalhos anteriores.

Entre as regiões estudadas, o Rio Grande do Sul foi o que apresentou isolados com maior freqüência desta mutação (13,5%), duas vezes maior que os isolados do Pará (6,25%) e São Paulo (6,8%), e quatro vezes maior do que os isolados do Rio de Janeiro (3,3%). Mutações em isolados brasileiros resistentes

---

a isoniazida podem variar tanto na frequência quanto na natureza da mutação envolvida, dependendo da região estudada (Silva *et al*, 2003).

Com relação à multidroga resistência (MDR), o(s) mecanismo(s) de aquisição deste tipo de resistência aparentemente está relacionado ao acúmulo de mutações em genes associados com a resistência contra drogas individuais numa maneira gradativa. Nossos resultados mostram que, embora a frequência da variante mutante 619A seja duas vezes maior nos isolados resistentes a isoniazida que nos MDR (13,2% e 5,8%), esta diferença não foi significativa ( $p = 0,06$ , OR = 0,40, IC 0,13 – 1,21). Por outro lado, a mesma comparação realizada somente em isolados de uma mesma região geográfica mostrou que no estado de São Paulo, a variante mutante 619A apresentou uma frequência significativamente maior nos isolados R-INH que nos MDR (27% e 2,7% respectivamente;  $p = 0,03$ , OR = 0,07, IC 0,00 – 0,97), mostrando que a frequência da mutação em questão e a associação com tipo de resistência varia de acordo com a região geográfica.

Para verificar se a resistência à isoniazida dos isolados com a variante 619A era decorrente de outras alterações e outros genes envolvidos na resistência à INH, foram seqüenciados os genes *katG*, *inhA*, *oxyR-ahpC* e *kasA*; apesar de não termos as seqüências de todos os genes para a maioria dos isolados verificamos que 66,6% destes isolados (seis em nove que tiveram os quatro genes seqüenciados) apresentaram adicionalmente mutações no gene *katG*, especificamente no códon 315. Mutações neste códon podem levar a diferentes tipos de troca de aminoácidos, sendo a troca S315T a mais freqüentemente relacionada à resistência à INH. Quando analisamos as mutações nos genes separadamente, dentre os 15 isolados que tiveram o gene *katG* seqüenciado, nove apresentaram mutações no códon 315, oito das quais resultavam na troca de aminoácidos S315T e um na troca S315L. Nossos dados estão em concordância com outros trabalhos que apontam as mutações no códon 315 do gene *katG* como sendo a mais freqüentemente relacionada com a resistência à isoniazida (Silva *et al.*, 2003). Em relação aos outros genes envolvidos com a resistência à isoniazida, dois isolados que apresentaram

---

mutações em *katG*, também apresentaram mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* ( $n = 1/G(-6)A$  e  $n = 1/C(-39)T$ ); sendo que um destes isolados também apresentou uma mutação não sinônima em *kasA* (G269S); nenhuma alteração foi observada nos isolados que tiveram o gene *inhA* seqüenciado. Com estes resultados, podemos inferir que há uma associação entre a presença da variante *nat* 619A e outras mutações associadas com a resistência à isoniazida, principalmente em *katG*.

Mutações em *inhA*, *oxyR-ahpC* e *kasA* são frequentemente associados com alterações em *katG* e conseqüentemente a resistência à isoniazida (Kelly *et al.*, 1997; Sherman *et al.*, 1996; Ramaswamy *et al.*, 1998 e 2003). Estudos sugerem que mutações na região intergênica *oxyR-ahpC* resultam em maior expressão da proteína codificada por *ahpC*, sendo possivelmente um mecanismo compensatório para a perda da atividade da catalase, decorrente de mutações em *katG* (Ramaswamy *et al.*, 2003). Dois dos isolados sensíveis não apresentaram nenhuma mutação relacionada com resistência à isoniazida. Embora tenha sido analisado um número reduzido de isolados para estes genes, a freqüência destas mutações foi similar a outros estudos em isolados brasileiros (Silva *et al.*, 2003).

Mutações não sinônimas em *M. tuberculosis* normalmente têm uma freqüência baixa e podem variar de freqüência de acordo com a pressão seletiva. O acúmulo de mutações em diferentes loci esta freqüentemente relacionado a mudanças fenotípicas de sensibilidade às drogas, sendo o grau de resistência associado com tipo e quantidade de mutações, embora não se exclua a possibilidade de outros mecanismos, tais como bombas de efluxo (Rossi *et al.*, 2006).

Apesar da freqüência de *nat* 619A ser baixa nos isolados de uma forma geral, a mesma se mostrou significativamente maior nos isolados resistentes que nos sensíveis ( $p = 0,002$ , OR = 5,73, IC 1.55 - 25,02) sugerindo uma forte associação com resistência de um modo geral; quando analisamos separadamente o tipo de resistência, verificamos uma associação “borderline” entre a presença da variante mutante nos isolados com resistência ( $p = 0,05$ ) e



---

uma associação muito forte com a resistência à isoniazida ( $p < 0,0001$ ). Estes resultados confirmam a hipótese de que esta mutação, de alguma forma está relacionada com a resistência do *M. tuberculosis* à isoniazida, tendo uma relevância maior no contexto com outras mutações ligadas a resistência à isoniazida. A variante mutante *nat* 619A provavelmente pode estar relacionada somente a níveis baixos de resistência à isoniazida e quando associada a outras mutações potencializaria a resistência. Contudo, o mecanismo pelo qual isto se dá ainda precisa ser elucidado, sendo cogitada a possibilidade de NAT competir com a catalase-peroxidase pela isoniazida, o que de alguma forma reduziria a ativação da mesma. Por outro lado, estudos prévios indicam que a variante mutante da enzima (619A) produz uma enzima menos estável e com uma menor afinidade à isoniazida (Sholto-Douglas-Vernon *et al.* 2005), o que contradiz esta teoria.

A metodologia aplicada para a detecção de resistência nestes isolados clínicos foi o método de proporções (Canetti *et al.* 1963), método que determina a relação proporcional de cepas resistentes e sensíveis presentes em uma amostra clínica através do cultivo em meio de cultura com ou sem as drogas usadas no tratamento da tuberculose. Com base no número de unidades formadoras de colônia no meio com droga em relação ao sem a droga se determina a fração da população bacteriana resistente; quando este valor é maior do que a fração definida para a droga (entre 1 e 10%), a população bacteriana é considerada resistente. Este método permite definir apenas a proporção de unidades formadoras de colônias que são resistentes as concentrações das drogas utilizadas nesta metodologia. Entretanto, esta abordagem não mostra o grau de resistência no sentido quantitativo, ou seja, a concentração da droga necessária para matar (parte da população) das bactérias. A determinação da concentração mínima inibitória (MIC) é baseada neste princípio.

E possível que haja uma associação entre a presença do SNP 619A e a resistência a baixo nível, não percebido (detectado) no presente estudo, devido a ausência de informação sobre comportamento de alguns isolados quando

---

avaliados na presença de concentrações menores de isoniazida do que a utilizada no método de proporções. A determinação da MIC não é uma prática de rotina e infelizmente, por limitações técnicas e operacionais, só foi possível obter esta informação para apenas oito isolados clínicos. Estes isolados apresentaram valores  $\geq 16 \mu\text{g/mL}$  (MIC da INH =  $0,02 \mu\text{g/ml}$ ), e adicionalmente mutação no gene *katG* (S315T), o que poderia estar influenciando os níveis de resistência à INH. Para complementar o estudo e definir melhor a importância da presença do SNP 619A para aquisição resistência à isoniazida, seria necessário a determinação da MIC em um maior número de isolados.

A fim de descartar a possibilidade da variante 619A estar relacionada a um cluster (agrupamento) específico, os 20 isolados que apresentaram a mutação foram analisados por “spoligotyping” e os resultados mostraram que tais isolados representavam 5 diferentes famílias, definidas como spoligotipos (LAM, S, T, X e Haarlem). Adicionalmente, dois isolados apresentaram spoligotipos ainda não depositados no banco de dados internacional “spoligotyping” SpolDB4. Foi sugerido anteriormente que tanto a variante mutante 619A como a 529C poderiam ser usadas como marcadores moleculares em estudos epidemiológicos para identificação de grupos de cepas que compartilham o mesmo perfil de RFLP IS6110 (família 3 e 28), devido a forte associação dos mesmos com número restrito de genótipos (Sholto-Douglas-Vernon *et al.*, 2005), pois a presença de um ou mais SNP(s) como marcador (es) genotípico (s) pode ter um significado importante dependendo da região geográfica e da população estudada. Entretanto, esta observação não se aplica a nossa amostragem, já que a variante 619A está presente em várias famílias, definidas por “spoligotipos” bastante diferentes. As famílias LAM, S, T, X e Haarlem apresentam genótipos bem distintos também quando analisadas por outros métodos de tipagem (Mathema, *et al.* 2006) e encontram-se com frequências distintas em diferentes populações. Estes dados estão em conformidade com o que foi observado por Gomes *et al.*, (2006), o qual verificou que 46,5% dos isolados brasileiros pertencem à família LAM, seguidos pela família T (19,5%) e a família S (1,7%). Outras famílias foram observadas, mas

---

com uma frequência inferior a 1%. A família X1 é atualmente caracterizada com uma família com baixo número de cópias do elemento de inserção IS6110, sendo altamente prevalente na América do Norte e na América Central (Brudey., 2006).

Oito isolados com a variante 619A fazem parte de dois grupamentos “spoligotyping” (LAM nos isolados do RS e S nos isolados do RJ); tal fato pode ter ocorrido devido a análise de uma mesma cepa que infectou diferentes doentes ou devido ao baixo poder discriminatório do “spoligotyping” nesta situação, classificando cepas diferentes como pertencentes a um mesmo “cluster”. No sentido epidemiológico, vale apontar que na literatura, certas famílias definidas com um ou vários spoligotipos, apresentam uma variabilidade genética diferente quando analisadas por outros métodos de genotipagem. No caso de tais grupamentos serem verdadeiros, poderiam estar viciando a amostragem, o que daria uma frequência errada destes SNPs. Neste contexto, é importante salientar a família S, no presente trabalho, representada por cinco isolados e contendo a variante 619A com spoligotipos idênticos. Normalmente, esta família é encontrada em uma baixa frequência na população de cepas circulantes no Brasil (Gomes et al., 2006). Contudo, os isolados desta família foram todos provenientes de doentes tratados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ). Tal fato pode sugerir que os isolados fazem parte de um surto, o que seria um argumento contra o significado da associação da variante mutante 619A com a resistência à isoniazida.

A Família S é altamente prevalente na Sicília e Sardenha (Europa) e no artigo referente ao SpolDB4 (Brudey *et al.*, 2006), a mesma seria idêntica aos isolados F28 encontrados na África do Sul (perfil RFLP IS6110). A primeira publicação referente à descrição da variante mutante *nat* 619A (Upton *et al.*, 2001) relata que a mesma foi identificada em isolados classificados como F28. Assim, o fato de termos encontrado a mesma em isolados definidos por spoligotipo pertencentes a família S reforça a hipótese das cepas definidas como pertencentes a família S serem idênticas a F28 e a associação da 619<sup>a</sup> com

---

esta família. De qualquer modo, a técnica de “spoligotyping” sozinha não é suficiente para afirmar que os isolados com o mesmo spoligotipo se tratam de um mesma cepa. Para esclarecer melhor, é necessário submeter os isolados definidos por “spoligotyping” a outro método de tipagem como o MIRU para aumentar o poder discriminatório (Gopaul *et al.*, 2006).

Através do seqüenciamento do gene *kat* de 87 isolados resistentes (42 isolados o gene inteiro e 45 isolados parte do gen), identificamos duas novas (ainda não descritas na literatura) mutações não sinônimas nas posições 20 (C-20-T) e 233 (A-233-G) em três isolados; dois isolados apresentando a variante mutante 233G e um com a variante mutante 20-T. Na proteína estas mutações resultam na troca de uma alanina por uma valina no códon 7 e de uma glicínia por um ácido aspártico no códon 78. Embora tenhamos seqüenciado isolados sensíveis e não termos detectado estas mutações, será conveniente aumentar o número de isolados sensíveis para que os mesmos possam ser relacionados ou não com a resistência à isoniazida. Estudos funcionais seriam igualmente importantes para entender os efeitos destas mutações, pois possivelmente, estas alterações podem afetar a estrutura local ou global da enzima e conseqüentemente a sua atividade ou afinidade à isoniazida. Além de mudar a estrutura da mesma, mutações podem alterar sua estabilidade e solubilidade, o que poderia afetar a sobrevivência destes isolados durante a exposição à isoniazida.

Um conceito ainda não suficientemente explorado ou apresentado é a manifestação de populações bacterianas mistas durante a análise de seqüências. As análises das seqüências foram feitas tanto visualmente através da análise do eletroferograma, quanto de forma semi-automática com o objetivo de facilitar a detecção de SNPs através do programa Seqscape. A vantagem da análise visual é a interpretação mais exata. As seqüências de dois isolados apresentaram dois picos (A-G) na posição 233; estes isolados foram seqüenciados por mais duas vezes, e os resultados anteriores foram confirmados, sugerindo a assim a presença de duas populações distintas (no sentido genotípico) ou uma população contendo frações bacterianas com um

---

alelo de cada. Tanto contaminação no momento do isolamento ou presença de duas populações bacterianas distintas no paciente explicariam tal fato. Estes dados foram excluídos dos resultados QUER DIZER, NÃO CONSIDEROU COMO MUTANTE, entretanto a frequência da mutação (A-233-G) é maior do que a mencionada nos resultados.

O seqüenciamento do gene *nat* em 25 isolados sensíveis (sete com gene inteiramente e 18 parcialmente seqüenciado) revelou a presença de uma mutação sinônima (ainda não descrita) na posição 312 (T312C) em 4 isolados (16%), todos classificados por “spoligotyping” como pertencentes a família EAI5 (East-African Indian). A análise do SpolDB4 mostra que os isolados desta família encontra-se em baixa frequência na América do Sul e no Brasil. Embora as observações em relação à natureza dos isolados da Família S (surto de uma cepa ou cepas diferentes), acreditamos que esta variante mutante poderia servir como marcador para esta família de cepas, mas para verificar esta possibilidade precisaremos genotipar outros isolados desta mesma família.

### **A presença do gene *nat* no Complexo *Mycobacterium tuberculosis***

O CMTB é composto por organismos que causam TB humana e animal, sendo as espécies *M. canettii*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. caprae*, *M. bovis*, as raras variantes conhecidas como dassie e oryx bacillus (que estão aguardando serem definidas) e a cepa vacinal *M. bovis* BCG. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que a tuberculose humana teria surgido com a domesticação do gado e conseqüentemente, o *M. bovis* seria o ancestral do *M. tuberculosis* pela adaptação específica do patógeno animal para o hospedeiro humano (Stead *et al.*, 1995). Antes daquela época, a segregação taxonômica dos organismos era baseada na combinação de observações do crescimento, morfologia, características fisiológicas e bioquímicas, variações nas distribuições geográficas e na preferência por hospedeiro (Niemann *et al.*, 2000).

Este cenário mudou com o avanço das técnicas de biologia molecular e com as publicações dos genomas micobacterianos, *M. tuberculosis* H37Rv e

---

CDC15551 e *M. bovis* (Cole *et al.* 1998 e Garnier *et al.*, 2003), o que possibilitou verificar que os organismos do CMTB e suas sublinhagens apresentam diferenças genéticas e biológicas pela combinação de polimorfismos (SNPs) bem como deleções, inserções, inversões e duplicações que são conhecidas como regiões de diferenças (RD), as quais são usadas atualmente para um maior entendimento das diferenças entre as espécies do CMTB bem como os aspectos evolutivos

A comparação do genoma de *M. tuberculosis* H37Rv e *M. bovis* BCG permitiu a identificação de 14 RDs (RD1- RD14) que podem variar de tamanho entre 2 a 12.7 Kb, e que estavam ausentes em BCG. Em paralelo, 6 regiões em H37Rv (RvD1-5) foram identificadas como sendo ausentes e TbD1 em *M. bovis* (Gordon *et al.*, 1999; Brosch *et al.*, 1999; Kremer *et al.* 1999). Em 1997, Sreevatsan *et al.* exploraram em isolados do CMTB a presença de dois SNPs, um no códon 463 do gene *katG* e outro no códon 95 do gene *gyrA*, definindo nesta maneira três grupos genéticos principais (PGGs), associando estes genótipos tanto com diferentes graus de virulência quanto ancestralidade. Em 2002, Brosch *et al.* analisaram 20 regiões de diferença em conjunto com estes e outros SNPs, e propuseram que todas as espécies do CMTB surgiram de um ancestral comum e que *M. canettii* divergiu deste ancestral comum antes de *M. tuberculosis*. Após estes trabalhos, novos SNPs e RDs foram identificados em espécies do CMTB e estão sendo hoje usados em conjunto tanto para a diferenciação como para estudos filogenéticos. Em 2006, Huard *et al.*, analisaram uma coleção de 125 isolados representativos do CMTB, através da análise de SNPs e LSPs que considerou filogeneticamente mais relevantes e incluiu *dassie* e *oryx bacillus* assumindo assim que estes organismos fariam parte do CMTB. Os autores propuseram também que todas as espécies surgiram de um ancestral comum sendo o *M. canettii* o representante filogeneticamente mais distante dos membros do CMTB, e que *M. africanum* subtipo Ia, *dassie bacillus*, *M. microti* e *M. pinnipedii* dividem o mesmo progenitor, confirmando o modelo evolutivo do CMTB proposto por Brosch *et al.* (2002)

---

Neste trabalho, verificamos pela primeira vez a associação entre SNPs e diferentes famílias de cepas, como definidos pelo genótipo obtido através de “spoligotyping”. Estes resultados, despertaram então nosso interesse em investigar outras espécies do CMTB, com o intuito de identificar marcadores adicionais para o reconhecimento de organismos deste complexo no nível de espécie e apoiar a identificação do parasito causador da tuberculose. Até o momento da concepção deste trabalho, estavam disponíveis na literatura informações sobre este gene apenas em *M. tuberculosis* e *M. bovis*. Com os iniciadores usados para amplificação deste gene em *M. tuberculosis*, conseguimos identificar o gene *nat* em todas as espécies do CMTB. Após o seqüenciamento do mesmo, foi possível verificar que este gene é idêntico em todas as espécies do CMTB, quando comparado com o gene *nat* do *M. tuberculosis* H37Rv, com exceção do *M. africanum* subtipo Ia, que apresenta uma mutação não sinônima na posição 751 (G-751-A) resultando numa troca de aminoácido no códon 251 (E251K).

Duas coleções diferentes contendo as espécies do CMTB foram analisadas neste trabalho, totalizando 171 Isolados (Anexos 2 e 3). Destes, 124 já tinham sido caracterizados previamente (Huard *et al.* 2006).

A fim de simplificar a caracterização destas espécies, desenvolvemos um protocolo de PCR-RFLP para a detecção desta variante e submetemos a este sistema os 124 DNAs de isolados do CMTB. Interessantemente, a variante mutante esteve presente em todos os *M. africanum* subtipo Ia e não foi encontrado em nenhum dos outros isolados, sugerindo a fixação do mesmo neste subtipo de *M. africanum* em algum momento na escala evolutiva. Este dado corrobora com a hipótese, hoje aceita, de que o *M. africanum* subtipo Ia e Ib em algum momento divergiram de um ancestral comum (Huard *et al.* 2006).

O *M. africanum* é geralmente isolado de pacientes africanos e em certas regiões, representa cerca de 60% dos casos de tuberculose pulmonar (Niemann *et al.* 2000). Esporadicamente, esta espécie é encontrada na Europa e nos Estados Unidos (Kremer *et al.*, 1999; Desmond *et al.*, 2004). Naquela época, acreditava-se na segregação do *M. africanum* em dois subtipos, baseado em

---

similaridades fenotípicas com *M. bovis* ou *M. tuberculosis* e origem geográfica dos pacientes. O chamado subtipo I seria de pacientes principalmente do oeste da África enquanto o subtipo II encontrava-se no leste da África (Mostowy *et al.*, 2004a). Através da avaliação de características bioquímicas e de análises numéricas, concluíram que o *M. africanum* subtipo I seria mais próximo do *M. bovis* enquanto o subtipo II do *M. tuberculosis* (Niemann *et al.*, 2000). Recentemente, foi mostrado que isolados do Oeste da África (subtipo I) eram caracterizados geralmente pela presença de baixo ou médio número de bandas de IS6110 nos perfis estabelecidos por RFLP, e por perfis de “spoligotyping” com ausência de espaçadores típicos, tanto para perfis de *M. bovis* quanto *M. tuberculosis*. Os isolados do leste (subtipo II) apresentavam altos números de IS6110 e spoligotipos similares ao de *M. tuberculosis*. Com o surgimento de novos marcadores genéticos para definição das espécies do CMTB, as cepas *M. africanum* subtipo I foram divididas em duas distintas variantes genotípicas (subtipo Ia e Ib) e o *M. africanum* subtipo II provou ser uma variante fenotípica de *M. tuberculosis* (Brosch *et al.*, 2000; Huard *et al.* 2006; Sola *et al.*, 2003). Assim, a nomenclatura anterior (subtipo I e II) foi descartada e atualizada para subtipo 1a e 1b.

Com o objetivo de avaliar melhor o poder discriminatório do SNP nat<sup>751</sup> descrito no presente trabalho como novo marcador, o mesmo foi estudado em uma segunda coleção que ainda não havia sido caracterizada quanto as espécies. Utilizamos métodos de tipagem para marcadores já descritos (Mostowy *et al.*, 2004a; Mostowy *et al.*, 2004b; Huard, *et al.* 2006). Como a probabilidade de encontrarmos outra espécie do CMTB nesta coleção era pequena, escolhemos inicialmente um conjunto de marcadores que permitiria a diferenciação de *M. tuberculosis* e *M. africanum* bem como seus subtipos (Ia e Ib). Caso algum isolado não fosse caracterizado como sendo *M. tuberculosis* ou *M. africanum*, outros marcadores seriam adicionalmente inseridos. Durante esta etapa do trabalho novos protocolos foram desenvolvidos ou adaptados para a caracterização de certos marcadores. O controle de qualidade dos sistemas utilizados (novos e já descritos) foi estabelecido através de seqüenciamento das



---

regiões contendo os marcadores em questão, pelo menos um de cada padrão esperado.

Além de confirmar que a mutação 751A era específica para *M. africanum* subtipo Ia, identificamos um outro SNP na posição 390 (G390T), presente na região conservada do locus RD711, que somente foi encontrado em isolados de *M. africanum* subtipo Ib. A especificidade deste novo SNP para este subtipo foi validada nas cepas do CMTB da coleção cedida pelo Dr. Huard, o que nos fez inseri-lo no painel de marcadores usados para diferenciação dos isolados de Gana. Este painel permitiu a identificação de 18 isolados de *M. tuberculosis*, 20 de *M. africanum* subtipo Ib e 9 de *M. africanum* subtipo Ia.

O fato de ter confirmado que estes novos marcadores mostraram-se ser espécie específicos nos torna confiante em relação do uso dos mesmos como marcador auxiliar no diagnóstico da tuberculose, importante devido ao fato que *M. africanum* é o segundo patógeno causador da tuberculose humana em algumas partes do mundo. A definição e utilização de novos marcadores também podem auxiliar em estudos filogenéticos e epidemiológicos para avaliar a frequência destes subtipos em regiões onde a infecção por *M. africanum* são mais frequentes. A associação destes novos SNPs (nat<sup>751</sup> e RD711<sup>390</sup>) aos três descritos anteriormente por Huard *et al.*, em 2006 (hsp65<sup>540</sup>, TbD1<sup>197</sup> e aroA<sup>285</sup>) e validados neste estudo na coleção de isolados de Gana seria uma boa estratégia para estes propósitos.

Através deste estudo, temos a nossa disposição um maior número de marcadores genéticos para auxiliar em estudos filogenéticos e melhor definição do patógeno causador do TB, necessário para melhor entendimento a relação patógeno hospedeiro e o dinamismo da tuberculose humana e animal.

Há vários relatos sugerindo que a enzima codificada por nat é importante em diferentes vias bioquímicas e fisiológicas de *M. tuberculosis*, tais como: síntese de ácidos micólicos e na acetilação da isoniazida. Embora tenhamos descoberto várias mutações neste gene em *M. tuberculosis*, a maioria encontra-se em baixa frequência, o que poderia ser devido à influência negativa na

---

população bacteriana que os adquiriu, ou de termos analisado uma amostragem viciada ou a outros fatores.

Como a variante mutante 619A está associada com a resistência à isoniazida sugerimos analisar a influência das mutações não sinônimas, pois existe a possibilidade de as mesmas estarem também sozinhas ou em combinação, influenciando os níveis de expressão e atividade enzimática da *N*-acetil transferase. A modificação da expressão desta enzima pode tanto influenciar a resistência à isoniazida quanto outros fenótipos, por exemplo, partes dos que diferenciam *M. tuberculosis* de *M. africanum*.

Outra questão importante é o significado dos SNPs como marcadores específicos para espécies, subespécies, tipos ou famílias dentro do CMTB. Uma abordagem para confirmar se isto ocorre ou não seria a análise da presença dos SNPs em um número maior de isolados e, principalmente, isolados mais representativos (tanto geograficamente quanto em relação à definição de espécies e ou famílias obtida com outros marcadores genéticos). Não podemos esquecer que uma das primeiras definições de grupos em CMTB baseada em análise genética que foi feita 10 anos atrás e que resultou na definição dos PGG1, 2 e 3 (Sreevatsan *et al.*, 1997) que continua valendo, foi baseada na presença de dois SNPs. Porém, a validação e avaliação da relação entre os SNPs descritos aqui e outros marcadores genéticos, atualmente utilizados para definir grupos de organismos é oportuna. Em primeira instância, sugerimos avaliar os SNPs na coleção de DNAs disponível em nosso laboratório (organismos do CMTB que foram submetidos à “spoligotyping”).

Outra característica do *nat* em *M. tuberculosis* é que ele faz parte de um operon (Matthew *et al.*, 2006) composto por mais 5 genes (Rv366a, Rv3567c, Rv3568c, Rv3569, Rv3570) que codificam para proteínas e que são importantes para a sobrevivência de *M. tuberculosis* nos macrófagos (Rengarajan *et al.*, 2005). Devido à presença do *nat* em todos os isolados de CMTB analisados até agora, a presença do operon nos mesmos é provável. A análise da presença e da composição (LSPs e SNPs) deste operon em isolados selecionados poderia

ensinar sobre a importância destas em micobactérias do complexo e fatores relacionados ao desenvolvimento da tuberculose.

---

## 6.0 Conclusões

Os resultados obtidos nesse trabalho possibilitaram um maior conhecimento sobre a presença do gene *nat* em todas as espécies do CMTB, bem como alterações genotípicas que podem estar relacionadas a mecanismos de resistência à isoniazida em isolados de *M. tuberculosis* resistentes e na diferenciação de espécies do CMTB.

A variante *nat* G619A, apesar de ter baixa frequência em nossos isolados, mostrou ter uma associação com a resistência à isoniazida. Caracterizamos alterações não descritas anteriormente em isolados de *M. tuberculosis* resistentes a INH, demonstraram que este gene é polimórfico e que possivelmente estas alterações podem estar relacionadas a resistência a INH ou em outras alterações fenotípicas, sendo necessários experimentos adicionais para verificar estas possibilidades.

Descrevemos pela primeira vez a presença do gene *nat* em outras espécies do CMTB, além de verificar uma alteração pontual neste gene que permite diferenciar *M. africanum* subtipo Ia das outras espécies, bem como no locus RD711<sup>390</sup> para *M. africanum* subtipo Ib, o que pode auxiliar tanto no diagnóstico como nos estudos filogenéticos do CMTB. Estudos adicionais deste gene ou até mesmo do operon onde ele está localizado em espécies do CMTB, podem auxiliar no entendimento da importância deste gene em micobactérias bem como o envolvimento deste na patogênia.

---

**Referências:**

II Consenso Brasileiro de Tuberculose. Diretrizes Brasileiras para tuberculose 2004. Jornal Brasileiro de Pneumologia. 2004;30.

Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res. 2005; 36(6):697-705.

Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz *et al* . 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2003; 53(Pt 6):1785-9.

Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um K, Wilson T, *et al*. *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science 1994;263:227-30.

Banerjee A, Dubnau E, Quemard A, Balasubramanian V, Um KS, Wilson T, *et al* *inhA*, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1994. 14;263(5144):227-30.

Bardou F, Raynaud C, Ramos C, Laneelle MA, Laneelle G. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiology. 1998;144 (9):2539-44.

Bass B, Farer L, Hopewell P, O'Brien R, Jacobs R, Ruben F, *et al* . Treatment of tuberculosis and tuberculosis infection in adults and children. American Thoracic Society and The Centers for Disease Control and Prevention. Am J Respir Crit Care 1994;278:1359–74.

Bhakta S, Besra GS, Upton AM, Parish T, Sholto-Douglas-Vernon C, Gibson

---

KJ, *et al.* Arylamine N-acetyltransferase is required for synthesis of mycolic acids and complex lipids in *Mycobacterium bovis* BCG and represents a novel drug target. *The Journal of Experimental Medicine*. 2004 3;199(9):1191-9.

Bigi F, Garcia-Pelayo M, Nunez-Garcia J, Peralta A, Caimi K, Golby P, *et al.* Identification of genetic markers for *Mycobacterium pinnipedii* through genome analysis. *FEMS Microbiol Lett*. 2005 Jul.;15:147-52.

Blanc L, Martinez L. Reaching the targets for TB control: call for papers. *Bull World Health Organ*. 2006 Sep;84(9):688.

Blanc L, Martinez L. TB Strategy and Operations World Health Organization (WHO). Reaching the targets for TB control: call for paper. 1211 Geneva27Switzerland RefNº06-035709. 2006.

Botha F, Sirgel F, Parkin D, van de Wal B, Donald P, Mitchison D. Early bactericidal activity of ethambutol, pyrazinamide and the fixed combination of isoniazid, rifampicin and pyrazinamide (Rifater) in patients with pulmonary tuberculosis. *Afr Med*. 1996;86(2):155-8.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretária de Políticas da Saúde. Programação de Medicamentos Tuberculostáticos. 2001.

Brasil, Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Centro de Referência Prof. Hélio Fraga, SBPT. Controle da Tuberculose: uma proposta de integração ensino-serviço. Rio de Janeiro; 2002a.

Brasil, Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Sanitária/ Fundação Nacional de Saúde/FUNASA. 2002b.

Brasil, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia do

---

Programa de Vigilância Epidemiológica da tuberculose multi resistente. Rio de Janeiro, Ministério da Saúde.; 2005.

Brasil, Ministério da Saúde. <http://portal.saude.gov.br/portal/svs>. 2006.

Brosch R, Philipp WJ, Stavropoulos E, Colston MJ, Cole ST, Gordon SV. Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated M. tuberculosis H37Ra strain. *Infection and immunity*. 1999 ;67(11):5768-74.

Brosch R, Gordon S, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, *et al* . A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Natl Acad Sci*. 2000;99:3684-9.

Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in microbiology*. 2001;9(9):452-8.

Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, *et al* . A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Mar 19;99(6):3684-9.

Brudey K, Driscoll JR, Rigouts L, Prodinger WM, Gori A, Al-Hajj SA, *et al*. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. *BMC Microbiol*. 2006;6:23.

Camus J, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv *Microbiology*. 2002;148:2967-73.

---

Canetti G, Froman S, Grosset J, Hauduroy P, Langerova M, Mahler HT, *et al* . *Mycobacteria: Laboratory Methods for Testing Drug Sensitivity and Resistance*. Bull World Health Organ. 1963;29:565-78.

Carvalho LGM, Buane A, Zöller MSADC, Scherman AP. Co-infecção por *Mycobacterium tuberculosis* e vírus da imunodeficiência humana: uma análise epidemiológica em Taubaté (SP) J Bras Pneumol. 2006;32(5):424-9.

Centers for Disease Control, CDC. Disseminated *Mycobacterium bovis* infection from BCG vaccination of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1985;34(16):227-8.

Centers for Disease Control, CDC. Disseminated *Mycobacterium bovis* infection from BCG vaccination of a patient with acquired immunodeficiency syndrome. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1985 Apr 26;34(16):227-8.

Cohen T, Lipsitch M, Walensky RP, Murray M. Beneficial and perverse effects of isoniazid preventive therapy for latent tuberculosis infection in HIV-tuberculosis coinfecting population. PNAS. 2006 2,2006.;103(18):7042-7.

Cohen T, Sommers B, Murray M. Isoniazid resistance and the future of drug-resistant tuberculosis. Microb Drug Resist. 2004;10(4):280-5.

Cohen T, Sommers B, Murray M. The effect of drug resistance on the fitness of *Mycobacterium tuberculosis*. Lancet Infect Dis. 2003;3(1):13-21.

Cole S. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiology. 2002;148:2919-28.

Cole ST, Brosch R, Parkhil JI, Garnier T, Churcher C, Harris D, *et al* .



---

Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. 1998;393:537-44.

Collins CH, Grange JM. Zoonotic implications of *Mycobacterium bovis* infection. *Ir Vet*. 1987(41):363-6.

Cousins DV, Baptista R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003 ;53.1305-14.

Crubezy E, Ludes B, Poveda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C R Acad Sci III*. 1998 ;321 (11):941-51.

Daniel T M. The History of Tuberculosis. *Respir Med*. 2006; 100(11):1862-70.

Davidson L, Takayama K. Isoniazid inhibition of the synthesis of monounsaturated long-chain fatty acids in *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother*. 1979 Jul.;16(1):104-5.

Deguchi T, Mashimo M, Suzuki T. Correlation between acetylator phenotypes and genotypes of polymorphic arylamine *N*-acetyltransferase in human liver. *J Biol Chem*. 1990;265(22):12757-60.

Desmond E, Ahmed AT, Probert SW, Ely J, Jang I, Sanders CA, *et al* . *Mycobacterium africanum* cases, California. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10:921-23.

Dessen A, Quemard A, Blanchard J, Jacobs Jr WR, Sacchettini JC. Crystal

---

structure and function of the isoniazid target of *Mycobacterium tuberculosis*. Science. 1995;267:1638–41.

Di Perri G, Bonora S. Which agents should we use for the treatment of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*? J A C. 2004 28,2004.

Dobner P, Rusch-Gerdes S, Bretzel G, Feldmann K, Rifai M, Loscher T, Rinder H. Usefulness of *Mycobacterium tuberculosis* genomic mutations in the genes *katG* and *inhA* for the prediction of isoniazid resistance. Int J Tuberc Lung Dis. 1997 Aug;1(4):365-9.

Donald P, Sirgel F, Botha F, Seifart H, Parkin D, Vandenplas M, *et al*. The early bactericidal activity of isoniazid related to its dose size in pulmonary tuberculosis. Am J Respir Crit Care Med. 1997 Sep;156(3 Pt 1):895-900.

du Toit LC, Pillay V, Danckwerts MP. Tuberculosis chemotherapy: current drug delivery approaches. Respir Res. 2006;7(1):118.

Evans DA, White TA. Human Acetylation Polymorphism. J Lab Clin Med. 1964 Mar;63:394-403.

Fleischmann R, Alland D, Eisen J, Carpenter L, White O, Peterson J, *et al* . Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. J Bacteriol. 2002;184(19):5479-90.

Fraser A, Paul M, Attamna A, Leiovici L. Treatment of latent tuberculosis in persons at risk for multidrug-resistant tuberculosis: systematic review. Int J Tuberc Lung Dis 2006; 10(1):19-23.

Frieden TR, Sterling TR, Munsiff SS, Watt CJ, Dye C. Tuberculosis. Lancet. 2003 Sep 13,2003;362(9387):887-99.

---

Friedman CR, Stoeckle MY, Johnson WDJ, Riley LW. Double-repetitive-element PCR method for subtyping *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Clin Microbiol. 1995;33(5):1383-4.

Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, *et al* . The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003 Jun 24;100(13):7877-82.

Goh KS, Fabre M, Huard RC, Schmid S, Christophe Sola C, Rastogi N. Study of the *gyrB* gene polymorphism as a tool to differentiate among *Mycobacterium tuberculosis* complex subspecies further underlines the older evolutionary age of 'Mycobacterium canettii'. Molecular and Cellular Probes 2006;20:182-90.

Goh K, Rastogi KN, Berchel M, Huard RC, Sola C. Molecular Evolutionary History of Tubercle Bacilli Assessed by Study of the Polymorphic Nucleotide within the Nitrate Reductase (*narGHJI*) Operon Promoter. J Clin Microbiol 2005;40:10-4.

Goh KS, Legrand E, Sola C, Rastogi N. Rapid differentiation of "Mycobacterium canettii" from other *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms by PCR-restriction analysis of the *hsp65* gene. J Clin Microbiol. 2001;39:3705-08.

Gomes H. Identificação molecular de cepas do Complexo *M. tuberculosis* e detecção de resistência a antibióticos. [Doutorado]. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz; 2006.

Gomez L, Camargo J, Castiblanco J, Ruiz-Narvaez E, Cadena J, Anaya J.

---

Analysis of IL1B, TAP1, TAP2 and IKBL polymorphisms on susceptibility to tuberculosis. *Tissue Antigens*. 2006;67(4):290-6.

Gordon SV, Brosch R, Billault A, Garnier T, Eiglmeier K, Cole ST. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Molecular microbiology*. 1999;32(3):643-55.

Gumbo T, Louie A, Liu W, Ambrose P, Bhavnani S, Brown D, *et al* . Isoniazid's Bactericidal Activity Ceases because of the Emergence of Resistance, Not Depletion of *Mycobacterium tuberculosis* in the Log Phase of Growth. *J Infect Dis*. 2007; 195(2):194-201.

Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA, Ricklefs SM, Hua S, Cousins DV, *et al*. Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics*. 2002;162(4):1533-43.

Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, *et al* . Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog*. 2005 Sep;;1(1).

Gopaul KK, Brown TJ, Gibson AL, Yates MD, Drobniowski FA. Progression toward an improved DNA amplification-based typing technique in the study of *Mycobacterium tuberculosis* epidemiology. *J Clin Microbiol*. 2006 Jul;44(7):2492-8.

Haas WH, Schilke K, Brand J, Amthor B, Weyer K, Fourie PB, *et al*. Molecular analysis of katG gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:1601-3.

---

Hayman J. *Mycobacterium ulcerans*: an infection from Jurassic time? . Lancet. 1984; 2(8410):1015-6.

Hesseling A, Marais B, Gie R, Schaaf H, Fine P, Godfrey-Faussett P, *et al* . The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. Vaccine. 2007;25(1):14-8.

Huard RC, Lazzarini LCO, Butler WR, van Soolingen D, L HJ. A PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. J Clin Microbiol. 2003;41:1637-50.

Huard RC, Fabre M, Haas P, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, *et al* . Novel Genetic Polymorphisms That Further Delineate the Phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Bacteriol. 2006;188: 4271-87.

Huard RC, Chitale S, Leung M, Lazzarini LC O, Zhu H, Shashkina E , *et al* .. The *Mycobacterium tuberculosis* Complex-Restricted Gene *cfp32* Encodes an Expressed Protein That Is Detectable in Tuberculosis Patients and Is Positively Correlated with Pulmonary Interleukin-10 Infec and Immun. 2003; 71: 6871-83.

Huitema H, Jaartsveld FH. *Mycobacterium microti* infection in a cat and some pigs. Antonie Van Leeuwenhoek. 1967;33(2):209-12

Iseman M, Madsen L. Drug-resistant tuberculosis. Clin Chest Med. 1989;10:341-53.

Jenne JW. Pharmacokinetics and the dose of isoniazid and p-aminosalicylic acid in the treatment of tuberculosis. Antibiot Chemother. 1964;12:407-32.

---

Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol.* 1997;35(4):907-14.

Kawamura A, Sandy J, Upton A, Noble M, Sim E. Structural investigation of mutant *Mycobacterium smegmatis* arylamine N-acetyltransferase: a model for a naturally occurring functional polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* arylamine N-acetyltransferase. *Protein Expr Purif.* 2003; 27(1):75-84.

Kelly CL, Rouse DA, Morris SL. Analysis of aphC gene mutations in isoniazid resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41.

Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, Panaiotov S, *et al* . Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(11):5628-38.

Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, Haas W, Hermans P, Martin C, *et al* . Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol.* 1999;37(8):2607-18.

Kritski AL, Conde M, de Souza GRM. *A História da Tuberculose.* 2 ed. São Paulo; 2000.

Laserson KF, Thorpe LE, Leimane V, Weyer K, Mitnick CD, Riekstina V, *et al* . Speaking the same language: treatment outcome definitions for multidrug-resistant tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2005 Jun;9(6):640-5.

---

Lee ASG, Lim IHK, Tang LLH, Telenti A, Wong SY. Contribution of kasA analysis to detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43:2087-9.

Lee ASG, Teo ASM, Wong SY. Novel mutations in *ndh* in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001(45):2157-9.

Lee AS, Tang LL, Lim IH, Bellamy R, Wong SY. Discrimination of single-copy IS6110 DNA fingerprints of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by high-resolution minisatellite-based typing. *Clin Microbiol.* 2002;40(2):657-9.

Lombard Z, Dalton D, Venter P, Williams R, Bornman L. Association of HLA-DR, -DQ, and vitamin D receptor alleles and haplotypes with tuberculosis in the Venda of South Africa. *Hum Immunol.* 2006;67(8):643-54.

Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, *et al*. Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* 2004;150(Pt 2):483-96.

Marrakchi H, Laneelle G, Quemard A. *InhA*, a target of the antituberculosis drug isoniazid, is involved in a mycobacterial fatty acid elongation system, *Fas-II*. *Microbiology* 2000;146:289–96.

Matthew C, Anderton MC, Bhakta S, Besra GS, Jeavons P, Eltis DL, *et al*. Characterization of the putative operon containing arylamine N-acetyltransferase (*nat*) in *Mycobacterium bovis* BCG. *Molecular microbiology.* 2006;59(1):181-92.

---

Middlebrook G, Dressler SH,. Clinical evaluation of isoniazid. Am Rev Tuberc. 1954;70(6):1102-3.

Middlebrook G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazide and the incidence of variants resistant to the drug in vitro. . Am Rev Tuberc. 1952;65(6):765-7.

Mitchison D. Mechanism of drug action in short-course chemotherapy. Bulletin International Union Against Tuberculosis. 1985;65:30-7.

Mokrousov I, Narvskaya O, Otten T, Limeschenko E, Steklova L, Vyshnevskiy B. High prevalence of KatG Ser315Thr substitution among isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from northwestern Russia, 1996 to 2001. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(5):1417-24.

Morlock G, Crawford J, Butler W, Brim S, Sikes D, Mazurek G, *et al* . Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44(2291-2295).

Mostowy S , Onipede A, Gagneux S, Niemann S, Kremer K, Desmond EP, *et al*. Genomic analysis distinguishes *Mycobacterium africanum*. J Clin Microbiol. 2004a ;42:3594-9.

Mostowy S, Cousins D, Behr MA. Genomic interrogation of the dassie bacillus reveals it as a unique RD1 mutant within the *Mycobacterium tuberculosis* complex. J Bacteriol 2004b;186:104-9.

Mostowy S, Inwald J, Gordon S, Martin C, Warren R, Kremer K, *et al* . Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. J Bacteriol. 2005;187:6386-95.



---

Moström P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. *Clin Microbiol Infect.* 2002 Nov;8(11):694-704.

Mdluli K, Sherman DR, Hickey MJ, Kreiswirth BN, Morris S, Stover CK, *et al.* Biochemical and genetic data suggest that *InhA* is not the primary target for activated isoniazid in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis.* 1996 Nov;174(5):1085-90

Musser JM, Kapur V, Williams DL, Kreiswirth BN, van Soolingen D, van Embden JDA. Characterization of the catalase-peroxidase gene (*katG*) and *inhA* locus in isoniazid-resistant and susceptible strains of *Mycobacterium tuberculosis* by automated DNA sequencing: restricted array of mutations associated with drug resistance. *J Infect Dis.* 1996;173:196-202.

Nerlich AG, Haas CJ, Zink A, Szeimies U, Hagedorn HG. Molecular evidence for tuberculosis in an ancient Egyptian mummy. *Lancet.* 1997 Jun 14:349.

Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3231-4.

Niemann S, Kubica T, Bange F, Adjei O, Browne E, Chinbuah M, *et al* . The species *Mycobacterium africanum* in the light of new molecular markers. *J Clin Microbiol.* 2004 Sep;42(9):3958-62.

Nolte F. Case studies in cost effectiveness of molecular diagnostics for infectious diseases: pulmonary tuberculosis, enteroviral meningitis, and BK virus nephropathy. *Clin Infect Dis.* 2006, 1;43(11):1463-7.

---

Payton M, Gifford C, Schartau P, Hagemeyer C, Mushtaq A, Lucas S, Pinter K, Sim E. Evidence towards the role of arylamine N-acetyltransferase in *Mycobacterium smegmatis* and development of a specific antiserum against the homologous enzyme of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*. 2001a;147(Pt 12):3295-302.

Payton M, Mushtaq A, Yu TW, Wu LJ, Sinclair J, Sim E. Eubacterial arylamine N-acetyltransferases - identification and comparison of 18 members of the protein family with conserved active site cysteine, histidine and aspartate residues. *Microbiology*. 2001b;147(Pt 5):1137-47.

Payton M, Auty R, Delgoda R, Everett M, Sim E. Cloning and characterization of arylamine N-acetyltransferase genes from *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: increased expression results in isoniazid resistance. *J Bacteriol*. 1999;181(4):1343-7.

Peters JH, Miller K, Brown P. Studies on the metabolic basis for the genetically determined capacities for isoniazid inactivation in man. *J Pharmacol Exp Ther*. 1965;150(2):298-304.

Ramaswamy S, Musser J. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis*. 1998;79:3-29.

Ramaswamy SV, Reich R, J DS, Jasperse L, Pan X, Wanger A, *et al* . Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Associated with Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1241-50.

Reid A, Scano F, Getahun H, Williams B, Dye C, Nunn P, *et al*. Towards universal access to HIV prevention, treatment, care, and support: the role of

---

tuberculosis/HIV collaboration. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(8):483-95.

Rengarajan J, Bloom B, Rubin E. From the cover: genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102:8327-32.

Riley R. Airborne Pulmonary Tuberculosis. *Bacteriol Rev.* 1961;25(3): 243-48.

Rosemberg J. Tuberculose aspectos Históricos, realidades, seu romantismo e transculturação. *Boletim de Pneumologia Sanotária.* 1999 jul/dez;7 (2).

Rossetti MLR, Valim ARM, Silva MSN, Rodrigues VS. Tuberculose resistente: Revisão Molecular. *Rev Saúde Pública.* 2002;36(4):525-32.

Rossi E, Ainsa JA, Riccardi G. Role of Mycobacterial efflux transporters in Drug Resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30:36-52.

Sandy J, Holton S, Fullam E, Sim E, Noble M. Binding of the anti-tubercular drug isoniazid to the arylamine *N*-acetyltransferase protein from *Mycobacterium smegmatis*. *Protein Sci.* 2005 14(3):775-82.

Sandy J, Mushtaq A, Kawamura A, Sinclair J, Sim E, Noble M. The structure of arylamine *N*-acetyltransferase from *Mycobacterium smegmatis*-An enzyme which inactivates the anti-tubercular drug, Isoniazid. *J Mol Biol.* 2002;318:1071-83.

Selkon J, Devadatta S, Kulkarni K, al e. The emergence of isoniazid-resistant cultures in patients with pulmonary tuberculosis during treatment with isoniazid alone or isoniazid plus PAS. *Bulletin of the World Health*

---

Organization. 1964;31:273-94.

Selvaraj P, Uma H, Reetha AM, Kurian SM, Xavier T, Prabhakar R, *et al* . HLA antigen profile in pulmonary tuberculosis patients & their spouses. Indian J Med Res. 1998a. Apr;107:155-8.

Selvaraj P, Uma H, Reetha AM, Xavier T, Prabhakar R, Narayanan PR. Influence of HLA-DR2 phenotype on humoral immunity & lymphocyte response to *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate antigens in pulmonary tuberculosis. Indian J Med Res. 1998b;107:208-17..

Selkon JB, Devadatta S, Kulkarni KG, Mitchison DA, Narayana AS, Nair CN, *et al*. The Emergence of Isoniazid-Resistant Cultures in Patients with Pulmonary Tuberculosis During Treatment with Isoniazid Alone or Isoniazid Plus Pas. Bull World Health Organ. 1964;31:273-94.

Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients & resistance in female contacts 2000;111 172-9.

Shafer RW, Edlin BR. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. Clin Infect Dis. 1996 Apr;22(4):683-704.

Sherman D, Sabo P, Hickey M, Arain T, Mahairas G, Yuan Y, *et al*. Disparate responses to oxidative stress in saprophytic and pathogenic mycobacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(14), 6625-9.

Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, *et al*. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Sep 2;94(18):9869-74.

---

Sholto-Douglas-Vernon C, Sandy J, Victor T, Sim E, Helden P. Mutational and expression analysis of *tbnat* and its response to isoniazid. 2005;54(Pt 12):1189-97.

Silva MS, Senna SG, Ribeiro MO, Valim AR, Telles MA, Kritski A, *et al.* Mutations in *katG*, *inhA*, and *ahpC* genes of Brazilian isoniazid-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2003;41(9):4471-74.

Sim E, Payton M, Noble M, Minchin R. An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and procaryotes. Hum Mol Genet. 2000;16:2435-41.

Sim E, Pinter K, Mushtaq A, Upton A, Sandy J, Bhakta S, *et al.* Arylamine N-acetyltransferases: a pharmacogenomic approach to drug metabolism and endogenous function. Biochemical Society transactions. 2003 Jun;31(Pt 3):615-9.

Sinclair J, Sandy J, Delgoda R, Sim E, Noble M. Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad. Nat Struct Biol. 2000;7:560-4.

Singh R, Wiseman B, Deemagarn T, Donald L, Duckworth H, Carpena X, *et al.* Catalase-peroxidases (KatG) exhibit NADH oxidase activity. J Biol Chem. 2004;279(41):43098-10.

Soborg C, Andersen A, Madsen H, Kok-Jensen A, Skinhoj P, Garred P. Natural resistance-associated macrophage protein 1 polymorphisms are associated with microscopy-positive tuberculosis. J Infect Dis 2002;186(4):517-21.

Sola C. SpolDB4.0. Institute Paster of Guadelupe; 2006.

---

Sola C, Rastogi N, Gutierrez MC, Vincent V, Brosch R, Parsons L, *et al* . J. Clin. Microbiol. Is *Mycobacterium africanum* subtype II (Uganda I and Uganda II) a genetically well-defined subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex? . 2003;41:1345-48.

Soini H, Musser JM. Molecular diagnosis of mycobacteria. Clin Chem. 2001; 47(5):809-14. Review.

Souza M, Antunes C, Garcia G. Perfil de sensibilidade e fatores de risco associados à resistência do *Mycobacterium tuberculosis*, em centro de referência de doenças infecto-contagiosas de Minas Gerais\*. J Bras Pneumol. 2006;32(5):430-7.

Stead W, Eisenach K, Cave M, Beggs M, Templeton G, Thoen C, *et al* . When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am J Respir Crit Care Med. 1995;151(4):1267-8.

Taype C, Castro J, Accinelli R, Herrera-Velit P, Shaw M, Espinoza J. Association between SLC11A1 polymorphisms and susceptibility to different clinical forms of tuberculosis in the Peruvian population Infect Genet Evol 2006 Sep;6(5):361-7.

Treatment Guidelines from the Medical Letter. Drugs for tuberculosis. 2004; 2 (29).

Tsolaki, A. G., A. E. Hirsh, K. DeRiemer, J. A. Enciso, M. Z. Wong, M. Hannan, Y. O. Goguet de la Salmoniere, K. Aman, M. Kato-Maeda, and P. M. Small. 2004. Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium*

---

*tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:4865–4870.

Tuberculosis GPoM. Genome Project of *Mycobacterium tuberculosis*. 2007.

Upton AM, Mushtaq A, Victor TC, Sampson SL, Sandy J, Smith DM, *et al* . Arylamine N-acetyltransferase of *Mycobacterium tuberculosis* is a polymorphic enzyme and a site of isoniazid metabolism. Molecular microbiology. 2001a; 42(2):309-17.

Upton A, Johnson N, Sandy J, Sim E. Arylamine N-acetyltransferases - of mice, men and microorganisms. Trends in pharmacological sciences. 2001b Mar;22(3):140-6.

Valway SE, Sanchez MP, Shinnick TF, Orme I, Agerton T, Hoy D, *et al* . An outbreak involving extensive transmission of a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. The New England journal of medicine. 1998 Mar 5;338(10):633-9.

van Embden J, Cave M, Crawford J, Dale J, Eisenach K, Gicquel B, *et al* . Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993;31(2):406-9.

van Soolingen D, de Haas P E , Herman P W, A. vED. RFLP Analysis of mycobacteria. Manual for fingerprinting of M.tuberculosis strains. In: National Institute of Public Health and Enviromental Protection, editor. Bilthoven, The Nertherlands; 1994.

van Soolingen D, PE de Haas, J. Haagsma, T. Eger, P. W. Hermans, V. Ritacco, *et al* . Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying

---

epidemiology of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol. 1994  
32:2425-33.

Van Soolingen D, Hoogenboezem T, Haas PEW, Hermans PWM, Koedam MA, Teppema KS, *et al* . A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa. International Journal of Systematic Bacteriology. 1997;47(4):1236-45.

van Soolingen D, Hermans P W, Groenen P M, van Embden J D. Comparison of various repetitive DNA elements as genetic markers for strain differentiation and epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 1993 Aug;31(8):1987-95.

Victor T, Warren R, Beyers N, van Helden P. Transmission of multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a high incidence community. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1997; 16, :548-9.

Warner DF, Mizrahi V. Tuberculosis Chemotherapy: the Influence of Bacillary Stress and Damage Response Pathways on Drug Efficacy. Clinical microbiology reviews. 2006 Jul;19(3):558-70.

Weber WW, Brenner W. A filter paper method for determining isoniazid acetylase phenotype. Am J Hum Genet. 1974 Jul;26(4):467-73.

Weber WW. Acetylation pharmacogenetics: experimental models for human toxicity. Fed Proc. 1984 15;43(8):2332-7.

Weber WW. The molecular basis of hereditary acetylation polymorphisms. Drug Metab Dispos. 1986 Jul-Aug;14(4):377-81.

Weber WW. Populations and genetic polymorphisms. Mol Diagn.



---

1999;4(4):299-307.

Wedlock ND, Skinner AM, de Lisle WG, Buddle BM. Control of *Mycobacterium bovis* infections and the risk to human populations. *Microbes Infect.* 2002;4(4):471-80.

Wengenack N, Jensen M, Rusnak F, Stern M. *Mycobacterium tuberculosis* KatG is a peroxynitritase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256((3):485-97.

Williams JA, Stone EM, Fakis G, Johnson N, Cordell JA, Meini W, Glatt H, Sim E, Phillips DH. *N*-Acetyltransferases, sulfotransferases and heterocyclic amine activation in the breast. *Pharmacogenetics.* 2001;11(5):373-88.

World Health Organization. Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. Geneva,: World Health Organization 2006a.

World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. WHO/HTM/TB. 2006b.

World Health Organization. XDR-TB Extensively Drug-Resistant TB. ; November 1, 2006c.

World Health Organization. The global plan to stop TB, 2006-2015 / Stop TB Partnership. Geneva: World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35); 2006d.

World Health Organization. Strengthening the teaching of tuberculosis control in basic training programmes A manual for instructors of nurses and other health-care workers. WHO/HTM/TB,. 2006e.

World Health Organization. 2006 Tuberculosis Facts; 2006f.

Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S. The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*. 1992 Aug 13(358):591-3.

Zhang Y, Garbe T, Young D. Transformation with *katG* restores isoniazid-sensitivity in *Mycobacterium tuberculosis* isolates resistant to a range of drug concentrations. *Mol Microbiol*. 1993;8:521-4.

Zhang Y, Dhandayuthapani S, Deretic V. Molecular basis for the exquisite sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* to isoniazid. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:13212-6.

Zhang Y, Post-Martens K, Denkin S. New drug candidates and therapeutic targets for tuberculosis therapy. *Drug Discov Today*. 2006; 11(1-2):21-7.

**8 - Anexos:**

**Anexo I**

Tabela A.1: isolados Clínicos (*M.tuberculosis*) de pacientes com tuberculose pulmonar, com suas respectivas origens e testes de sensibilidade.

Isolado	INH	RPM	PZA	BEM	ETH	SM	Origem	MATERIAL	LOCAL DA EXTRAÇÃO
341	R	R	S	S	R	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
2176	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1522	R	R	R	S	R	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
325	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
2255	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
371	R	R	R	S	S	R	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
010/23	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1580	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
17/96	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
324	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
332	R	R	R	S	S	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1645	R	R	R	S	R	R	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1886	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
2118	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
333	R	R	S	S	R	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
375	R	R	R	S	S	S	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1896	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
2248	R	R	*	*	*	*	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
353	R	R	R	R	R	R	RJ-UPT	DNA	FIOCRUZ
1043/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1496/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1525/03	R	S	S	S	S	R	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
384/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1411/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1717/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1604/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1758/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1953/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2136/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1991/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
909/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1486/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
802/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
409/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2024/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
332/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
794/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2200/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
528/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2056/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1484/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
162/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
89/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1493/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
106/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1041/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
97/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
275/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ

1847/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
826/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1777/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1887/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2196/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1741/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1435/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1069/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1615/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1125/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
979/02	R	S	S	S	R	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
9612/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1210/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
718/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1748/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1865/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1348/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1461/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
204/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1575/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1559/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
202/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1785/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
585/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
437/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
412/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1155/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1425/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1811/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1851/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
961/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
963/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
134/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
474/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1106/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2096/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1063/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1681/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
849/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1790/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1036/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1223/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1594/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2034/03	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
390/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
438/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1331/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
997/03	R	S	R	S	R	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1396/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1830/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1098/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2031/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
946/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ

300/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1201/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
378/03	R	S	S	S	S	R	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
167/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
92/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2049/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1534/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
791/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
38/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1126/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1042/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
715/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
741/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
630/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
788/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1666/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1079/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
143/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1042/02	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1041/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1198/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
827/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
98/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
923/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1397/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1019/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1066/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
142/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1028/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1059/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
723/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2008/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
598/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
279/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
266/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
99/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1547/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
394/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2028/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1509/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2007/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
265/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
122/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
178/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
903/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2172/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1381/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
288/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1629/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1494/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1754/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
979/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1753/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ

1068/02	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1562/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1077/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1450/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
349/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1996/03	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1740/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
720/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1374/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
959/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1532/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2048/03	R	S	S	S	R	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
887/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
721/03	R	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1469/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
740/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
222/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
265/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1825/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
403/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2134/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1995/03	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1997/03	R	R	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1226/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2104/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
741/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
282//02	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
722/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1998/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
2192/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1508/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1078/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
100/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1671/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
76/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
296/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1940/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1213/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
345/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1874/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1657/03	S	S	S	S	S	S	RJ-UPT	Lisado	FIOCRUZ
1021/98	R	R	R	S	R	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1105/00	S	S	S	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1512/00	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1122/96	R	R	S	R	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1129/98	R	R	S	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1266/01	S	S	S	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1287/00	R	R	R	R	R	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
14/97	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1510/97	R	R	R	S	S	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1512/00	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
165/00	R	S	R	R	R	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1657/96	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF

1699/96	R	R	R	R	S	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
1943/00	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
267/00	R	R	R	R	R	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
397/02	R	R	*	S	S	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
414/01	R	R	R	S	S	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
48/02	R	R	S	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
487/00	R	R	R	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
517/03	S	S	S	*	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
556/00	R	S	R	S	R	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
680/01	R	R	R	R	R	R	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
736/00	R	S	S	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
742/00	R	R	R	S	S	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
752/98	R	R	S	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
753/98	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
757/00	R	R	R	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
761/96	R	R	S	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
777/00	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
790/03	R	R	*	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
818/00	R	S	S	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
913/00	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
926/00	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
927/00	R	R	R	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
932/00	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
935/00	R	R	*	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
95/01	S	S	S	S	S	S	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
953/00	R	S	S	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
957/01	R	R	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
974/01	R	R	*	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
976/98	R	R	S	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
977/98	R	S	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
977/00	R	S	R	R	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
980/00	R	R	R	S	*	*	RJ-CRPEFF	DNA	CRPEFF
8378	R	R	S	S	R	R	RS	DNA	FEPPS
7681	R	R	R	S	S	R	RS	DNA	FEPPS
9034	R	R	R	S	S	R	RS	DNA	FEPPS
9181	R	R	S	S	S	R	RS	DNA	FEPPS
9245	R	S	S	S	S	R	RS	DNA	FEPPS
9430	R	S	S	R	S	S	RS	DNA	FEPPS
8003SM	R	R	R	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8183	R	R	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9248	R	R	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8059SP	R	R	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
7755	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8187	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9276	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9440	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8049SP	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9102	R		S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8511	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8135	R	S	R	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9039	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9092	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9210	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS



9488	R	R	*	S	*	S	RS	DNA	FEPPS
9494	R	R	*	S	*	S	RS	DNA	FEPPS
9241	R	R	*	S	R	*	RS	DNA	FEPPS
9502	R	R	*	S	R	*	RS	DNA	FEPPS
0330	S	S	S	S	R	S	RS	DNA	FEPPS
358	R	R	*	S	S	*	RS	DNA	FEPPS
0375	R	R	*	S	S	*	RS	DNA	FEPPS
0577	R	R	*	S	S	*	RS	DNA	FEPPS
0059	R	R	*	S	S	*	RS	DNA	FEPPS
0561	S	R	S	R	S	S	RS	DNA	FEPPS
0602	R	S	S	R	S	S	RS	DNA	FEPPS
9455	R	R	R	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8525	R	S	R	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9440	R	R	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
149	R	R	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9244	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0479	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9276	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9312	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9450	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0489	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9369	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9430	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9433	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9485	R	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0090	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0135	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0155	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0297	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0436	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0576	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
8600	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9016	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9473	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0486	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0597	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
0609	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9159	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9328	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
9409	S	S	S	S	S	S	RS	DNA	FEPPS
c12433/99	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c1243/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c597/00	R	R	R	R	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c1237/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c94018/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c93898/00	R	R	R	R	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c702/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c18/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c93843/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c582/00	R	R	S	R	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c1195/00	R	R	R	R	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c1194/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C1438/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP

c52/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c1250/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c92973/99	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c364/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c92507/99	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C91242/99	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c92508/99	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c92508/99	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c425/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c2898/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c2423/00	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c3059/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c2248/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c2898/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2626/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2637/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2846/00	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2466/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2518/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2431/00	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2341/00	R	R	R	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C93849/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C596/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C1210/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C93843/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C92506/99	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2335/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2627/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C2429/00	R	R	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
C553/00	R	S	S	S	S	S	SP	DNA	UNICAMP
c44/00	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C1246/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C93492/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C1285/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C93459	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C3076/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C3089/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2937/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2842/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2841/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C3079/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2371/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2763/00	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
72172	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
81874	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
71811	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
72595	R	R	R	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2295/00	R	R	R	R	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
83239	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
72060	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2324/00	R	R	R	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
72421	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
81304	R	R	S	S	S	R	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS

C2518/00	R	R	S	S	S	*	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
72418	R	R	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
71686	R	R	R	S	S	R	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C2325/00	R	R	R	R	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C6/00	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C523/00	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0059	R	R	*	S	S	*	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP7010	R	R	*	S	S	*	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP8045	R	R	*	S	S	*	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP9012	R	R	R	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0075	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP8049	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP9027	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
9440	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0072	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP9004	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0051	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0055	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0060	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP0100	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
SP9003	S	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
C402/00	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
c482/00	R	S	S	S	S	S	SP-Lutz	DNA	FEPPS-RS
259	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
266	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
272	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
293	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
364	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
416	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
426	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
427	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
429	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
443	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
453	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
466	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
537	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
630	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
694	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
699	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
727	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
751	S	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
792	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
796	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
798	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
799	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
804	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
814	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
820	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
823	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
827	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
834	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
846	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
853	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ

861	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
862	R	S	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
868	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
874	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
879	R	R	S	S	S	S	PA	DNA	FIOCRUZ
909	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
928	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
932	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
956	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
973	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
984	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
988	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
998	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
1004	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
1102	R	R	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
1111	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
1114	R	S	*	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
1121		R	R	*	*	*	PA	DNA	FIOCRUZ
3573	R	R	R	R	R	R	Ceará	DNA	Missejana
3574	R	R	*	*	*	*	Ceará	DNA	Missejana
3566	R	R	*	*	*	*	Ceará	DNA	Missejana
3787	R	*	*	*	*	*	Ceará	DNA	Missejana
3912	R	R	*	*	*	*	Ceará	DNA	Missejana

## **Anexo 2**

Tabela A.2: Cepas do CMTB usadas para a validação dos novos SNPs encontrados nestes estudo.

CMTB subspecies	Cepa	Hospedeiro	Origem	Publicação Prévia (referência)
"M. canettii"	96-46	Humano	França	Goh et al., 2001.
	217-94	Humano	Suíça	Goh et al., 2001.
	17727 (116)	Humano	Somália	Kremer et al, 1999.
	2002-937	Humano	Holanda	Huard et al., 2006.
	2002-1000	Humano	Holanda	Huard et al., 2006. Huard et al., 2006.
"Ancestral" <i>M. tuberculosis</i> [PGG1b]	97-66	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	15199 (47)	Humano	Holanda	Kremer et al, 1999.
	CA-65 (65)	Humano	Holanda	Kremer et al, 1999.
	CA-74 (74)	Humano	Índia	Kremer et al, 1999.
	Percy157b	Humano	Tailândia	Huard et al., 2006.
	Percy211	Humano	França	Lee et al., 2000. Huard et al., 2006.
"Modern" <i>M. tuberculosis</i> [PGG1b]	97-742	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-803	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-818	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-1177	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-1289	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-1438	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	13876 (100)	Humano	Holanda	Kremer et al, 1999.
	CA-43 (43)	Humano	China	Kremer et al, 1999.
	548.03	Humano	Brasil	Huard et al., 2006.
	2172.03	Humano	Brasil	Huard et al., 2006.
	Percy7	Humano	Djibuti	Huard et al., 2006.
	Percy91	Humano	Djibuti	Huard et al., 2006.
	Percy209	Humano	França	Huard et al., 2006. Huard et al., 2006.
"Modern" <i>M. tuberculosis</i> [PGG2]	CDC1551	Humano	EUA	Fleischmann et al., 2002.
	Cb3.3	Humano	EUA	Friedman et al., 1997.
	97-279	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-488	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	97-1503	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	970623	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	2001-1225	Humano	Holanda	Huard et al.,2003.
	CA-56 (56)	Humano	Curacao	Kremer et al, 1999.
	AH TN13475	Humano	EUA	Huard et al.,2003.
	Mtb21	Humano	EUA	Huard et al.,2003.
	Mtb22	Humano	EUA	Huard et al.,2003.
	133/92	Humano	Uganda	Haas et al., 1997.
	178/92	Humano	Uganda	Haas et al., 1997.
	290/92	Humano	Uganda	Haas et al., 1997.
	1167/93	Humano	Uganda	Haas et al., 1997.
	94-1055	Humano	Holanda	Huard et al., 2006.
	2002-1304	Humano	Holanda	Huard et al., 2006.
	2002-1330	Bonobo	Holanda	Huard et al., 2006.
Percy47	Humano	Djibuti	Huard et al., 2006.	
"Modern" <i>M. tuberculosis</i> [PGG3]	ATCC 27294	Humano	H37Rv	Huard et al., 2006.
	ATCC 25177	Humano	H37Ra	Huard et al., 2006.
	ATCC 15910	Humano	EUA	Huard et al., 2006.
	NYiso	Humano	EUA	Huard et al.,2003.
	CA-105 (105)	Humano	Holanda	Kremer et al, 1999.

<i>M. africanum</i> subtipolb [PGG1b]	15082 (92)	Humano	Holanda	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	AF0236	SI	SI	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	AF0271	SI	SI	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy13	Humano	Nigéria	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy16	Humano	Camarões	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy17	Humano	Nigéria	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy56	Humano	Camarões	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy58	Humano	França	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy59	Humano	França	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy60	Humano	Camarões	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy99a	Humano	França	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy204	Humano	Camarões	Huard <i>et al.</i> ,2006.
<i>M. africanum</i> subtipola [PGG1a]	ATCC 25420	Humano	Senegal	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	ATCC 35711	Humano	SI	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	1255/93	Humano	Serra Leoa	Haas <i>et al.</i> ,1997.
	1457/93	Humano	Serra Leoa	Haas <i>et al.</i> ,1997.
	1565/93	Humano	Serra Leoa	Haas <i>et al.</i> ,1997.
	1567/93	Humano	Serra Leoa	Haas <i>et al.</i> ,1997.
	17316 (6)	Humano	Holanda	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	17902 (85)	Humano	Holanda	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	Percy18	Humano	Nigéria	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy34	Humano	Somália	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy57	Humano	França	Lee <i>et al.</i> ,2000.
	Percy61	Humano	França	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy119	Humano	Djibouti	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy122b	Humano	França	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy171	Humano	França	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy199	Humano	Nigéria	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy203	Humano	Nigéria	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	Percy207	Humano	França	Huard <i>et al.</i> ,2006.
dassie bacillus [PGG1a]	68/7171	Hyrax	África do Sul	Wagner <i>et al.</i> , 1998.
	14114	Hyrax	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,1994.
	FCC49	Hyrax	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,1994.
	TB23/91Sw	Suricat	Sweden	Mostowy <i>et al.</i> ,2002. Huard <i>et al.</i> ,2006.
oryx bacillus [PGG1a]	CA-24 (24)	Oryx	Arábia Saudita	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	CA-69 (69)	Oryx	Holanda	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
<i>M. microti</i> [PGG1a]	ATCC 19422	Ratazana	Reino Unido	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	ATCC 35782	Ratazana	SI	Huard <i>et al.</i> ,2006.
	ATCC 11152	Ratazana	Reino Unido	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	97-1297	Feret	Holanda	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	97-2257	Humano	Holanda	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	97-2272	Humano	Holanda	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	15496	Ratazana	Reino Unido	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	15498	Ratazana	Reino Unido	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
	15912	Ratazana	Reino Unido	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.
16420	Lama	Belgica	van Soolingen <i>et al.</i> ,1998.	
<i>M. pinnipedii</i> [PGG1a]	CA-76 (76)	Foca	Argentina	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	CA-81 (81)	Foca	Argentina	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	CA-101 (101)	Foca	Argentina	Kremer <i>et al.</i> , 1999.
	FCC69	Foca	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,2003.
	FCC70	Foca	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,2003.
	FCC72	Foca	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,2003.
	FCC174	Foca	Austrália	Cousins <i>et al.</i> ,2003.

<i>M. bovis</i> [PGG1a]	ATCC 19210	Vaca	EUA	Huard et al., 2006.
	ATCC 35725	SI	SI	Huard et al., 2006.
	ATCC 35726	Vaca	SI	Huard et al., 2006.
	ATCC 35730	Vaca	SI	Huard et al., 2006.
	2001-831	Humano	Holanda	Huard et al., 2003.
	CA-73 (73)	Vaca	Holanda	Kremer et al, 1999.
	CA-117 (117)	Vaca	Argentina	Kremer et al, 1999.
	CA-126 (126)	Vaca	Argentina	Kremer et al, 1999.
	CA-130 (130)	Vaca	Holanda	Kremer et al, 1999.
	TN5022	Humano	EUA	Huard et al,2003.
	2001-1225b <sup>k</sup>	Humano	Holanda	Huard et al,2003.
	61760	Humano	EUA	Huard et al., 2006.
	BV0061	SI	SI	Huard et al., 2006.
	BV0063	SI	SI	Huard et al., 2006.
	<i>M. bovis</i> BCG [PGG1a]	ATCC 27290	Vacina	Copenhagen
ATCC 35730		Vacina	Japão	Huard et al., 2006.
ATCC 35732		Vacina	Sweden	Huard et al., 2006.
ATCC 35736		Vacina	Brasil	Huard et al., 2006.
BCGt		Vacina	Pasteur-Tunis	Huard et al,2003.
r4-93		SI	SI	Huard et al,2003.
TN10130		Humano	EUA	Huard et al,2003.
BCG0336		SI	SI	Huard et al., 2006.
<sup>a</sup> Sem Informação				



## **Anexo 3**

Tabela A.3: Isolados clínicos de pacientes Ganense com tuberculose Pulmonar (Oeste da África).

No. Tubo	No Isolado
1	1410,02
2	1417,02
3	1428,02
4	1438,02
5	1443,02
6	1449,02
7	1465,02
8	2569,02
9	2570,02
10	2577,02
11	2582,02
12	2597,02
13	3482,03
14	4802,03
15	4804,03
16	5383,02
17	5390,02
18	5398,02
19	5400,02
20	5429,02
21	5432,02
22	5434,02
23	5468,02
24	5473,02
25	8163,02
26	8236,02
27	8303,02
28	10400,02
29	10348,01
30	10439,01
31	10445,01
32	10446,01
33	10458,02
34	10462,01
35	10469,01
36	10470,01
37	10476,?
38	10473,01
39	10480,01
40	10481,01
41	10485,01
42	10486,01
43	10493,01
44	10494,01
45	10512,01
46	10515,01
47	10517,01

Anexo 4

Tabela A4: Discrição dos SNPs avaliados neste estudo.

LÓCUS <sup>11</sup>	CÓDON AFETADO Nº	TROCA DE NUCLEOTÍDIO	NATUREZA OU LOCALIZAÇÃO DA MUDANÇA
aroA <sup>177</sup>	-	177 G→A	Intergênica
TbD1 <sup>197</sup>	-	197 C→T	Intergênica
PRONarGHJ <sup>1255</sup>	-	-215 C→T	intergênica
RD711 <sup>390</sup> (RV1332)	175	390 G→T	Não sinonima
rpoB <sup>1163</sup>	388	1163 C→T	Não Sinônima
rpoB <sup>1049</sup>	350	1049 C→T	Não Sinônima
Nat <sup>751</sup>	251	751 G→A	Não Sinônima
Rv1510 <sup>1129</sup>	377	844 G→A	Não Sinônima
katG <sup>463</sup>	463	1388 G→T	Não Sinônima
gyrA <sup>95</sup>	95	283 C→G	Não Sinônima
3' <i>cpf32</i> <sup>311</sup>	1279	311 G→A	Sinônima
RD13 <sup>174</sup>	499	174 G→A	Sinônima
PPE55 <sup>2154</sup>	723	7321 A→G	Sinônima
PPE55 <sup>2148</sup>	725	7327 A→G	Sinônima
Hsp65 <sup>540</sup>	180	540 C→T	Sinônima
katG <sup>203</sup>	203	607 T→C	Sinônima
gyrB <sup>1450</sup>	484	1450 G→T	Sinônima

<sup>11</sup> As posições das substituições de nucleotídicas são correspondentes ao genoma de *M. tuberculosis* (H37Rv), exceto a substituição no lócus TbD1 que corresponde à posição no genoma de *M. bovis* (AF2122/97).

## **Anexo 5**

**Tabela A5:** Descrição das Regiões de Diferença (RD) avaliadas neste estudo.

RD <sup>12</sup>	Tamanho da deleção (bp)	ORF(s) Afetadas	Proteína
TbD1	2.153	mmpS6 mmpL6	Proteínas de membrana
RD7	12.718	Rv1964	"Integral membrane protein"
		Rv1965	"Integral membrane protein"
		<i>mce3</i>	"Invasin-like protein; RGD motif"
		Rv1967	"Exported protein"
		Rv1968	"Exported protein; RGD motif"
		Rv1969	"Exported protein"
		<i>lprM</i>	"Lipoprotein"
		Rv197	"Exported protein"
		Rv1972	"Membrane protein"
		Rv1973	"Exported protein"
		Rv1974	"Unknown"
		Rv1975	"Exported protein"
Rv1976c	"Unknown"		
Rv1977	"Unknown; Zn binding signature"		
RD8	5.895	<i>ephA</i>	"Epoxide hidrolase"
		Rv3618	"Monooxygenase"
		Rv3619c	"ESAT-6 Family"
		Rv3620c	"QLISS family"
		Rv3621c	"PPE protein"
		Rv3622c	"PE protein"
RD9	2.030	<i>lpqG</i>	Lipoproteína
		<i>cobL</i>	"Precorrina metilase"
		Rv2073c	"Oxidoreductase"
		Rv2074	"Unknown"
RD10	1.903	Rv2075	"Membrane or exported protein"
		<i>echA1</i>	"Enoyl CoA hidratase"
RD701	1.740	Rv0124	"Proteína da família PE-PGRS"
RD702	1.722	Rv0186	"Probable Beta-Glucosidase BGLS (Gentiobiase) (Cellobiase) (Beta-D-Glicosidae Glucohydrolase) <i>bg/S</i> "
RD711	1.943	Rv1333	"Probable Hidrolase"
		Rv1336	"Probable Cisteine Syntetase B CYSM (CSASE B) (O-acetylserine sulfhydrylase B) (O-acetylserine (Thiol)-lyase B)"
RD713	3.768	Rv1977	"hypothetical protein"
		Rv1979c	"Possible conserved permaase"
<i>pks15/1</i>	6 a 7	Rv2947c	"Probable Polyketide S syterase/ PKS15"

<sup>12</sup> As posições das substituições de nucleotídicas são correspondentes ao genoma de *M. tuberculosis* (H37Rv), exceto a substituição no locus TbD1 que corresponde à posição no genoma de *M. bovis* (AF2122/97).



# 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](#)