

Juliana Rosa Santos

**Padronização da amplificação e análise de genes envolvidos no metabolismo
de ácidos micólicos em estirpes de *Mycobacterium tuberculosis***

Florianópolis

2018



Juliana Rosa Santos

Padronização da amplificação e análise de genes envolvidos no metabolismo de ácidos micólicos em estirpes de *Mycobacterium tuberculosis*

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Farmácia

Orientadora: Prof. ^a Dra. Maria Luiza Bazzo

Coorientadora: MSc. Taiane Freitas Medeiros

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Santos, Juliana Rosa
Padronização da amplificação e análise de genes envolvidos no metabolismo de ácidos micólicos em estirpes de *Mycobacterium tuberculosis* / Juliana Rosa Santos ; orientador, Maria Luiza Bazzo, coorientador, Taiane Freitas Medeiros, 2018.
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Tuberculose. 3. Genes envolvidos no metabolismo de ácidos micólicos. 4. Padronização de PCR. 5. Sequenciamento de genes. I. Bazzo, Maria Luiza. II. Medeiros, Taiane Freitas. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guia e me sustenta todos os dias, me proporcionando tranquilidade, força e fé para eu concluir esta etapa da minha vida.

A minha orientadora Prof.^a Dra. Maria Luiza Bazzo, que me deu a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) e de adquirir novos conhecimentos, além de me orientar em todos os momentos, estando sempre disposta a me auxiliar.

A minha coorientadora MSc. Taiane Freitas Medeiros, que esteve sempre me auxiliando na realização deste trabalho, tanto na parte escrita como experimental, permitindo com que eu aprendesse novas metodologias, além de realizar sugestões e correções que contribuíram para a melhoria do meu trabalho.

À Equipe LBMMS, que além de me ajudarem na parte científica com sugestões, correções e conselhos, tornaram-se amigos que me apoiaram durante toda esta etapa.

Aos meus pais, por todo amor e carinho, que me apoiam em todos os momentos e que estiveram sempre ao meu lado para que eu conseguisse chegar até aqui.

Ao meu noivo Wesley, pelo companheirismo, amizade e por estar ao meu lado em todas as situações, sempre me dando apoio sentimental e incentivo para que eu conseguisse finalizar este trabalho.

Aos meus amigos, que me proporcionam muitos momentos alegres e que sempre estiveram me tranquilizando e dando todo o suporte necessário para eu concluir esta etapa.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que constitui um problema de saúde global, sendo considerada a nona maior causa de morte em todo o mundo. *Mycobacterium tuberculosis* é o principal agente causador de TB em humanos e seu envelope celular contém um alto teor lipídico, possuindo ácidos micólicos (AMs) como um dos principais componentes. *M. tuberculosis* produz três classes principais de AMs – alfa, metóxi e ceto-micolatos. Os AMs estão associados à virulência de *M. tuberculosis*, conferindo resistência à dessecação e à descoloração por álcool e ácido, resistência à lesão química e ao sistema imune do hospedeiro, bem como possuem capacidade de persistir e se multiplicar dentro do ambiente hostil do fagolisossoma dos macrófagos. Os genes envolvidos no metabolismo de AMs podem sofrer deleções ou mutações, fazendo com que o envelope celular apresente diferenças na composição lipídica. Estas diferenças na composição lipídica podem interferir na sensibilidade aos antimicrobianos e contribuir para diferenças na resposta imunológica do hospedeiro. Estirpes de *M. tuberculosis* apresentam uma diversidade genética e estudos demonstraram diferenças significativas nas proporções de AMs pertencentes a mesma linhagem filogenética. O objetivo deste estudo foi padronizar reações de PCR para amplificação de genes envolvidos no metabolismo de AMs e realizar uma análise inicial intralinhagem, sendo que os genes sequenciados (*mmaA2*, *mmaA4* e *kasB*) de isolados pertencentes à família LAM não apresentaram nenhuma mutação significativa. Sendo assim, torna-se importante a utilização de abordagens genômicas e lipidômicas em conjunto para auxiliar na caracterização de estirpes de *M. tuberculosis* que apresentam diferentes perfis clínicos.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*; ácidos micólicos; padronização de PCR; sequenciamento de genes.

ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is a contagious infectious disease that constitutes a global health problem, being considered the ninth largest cause of death worldwide. *Mycobacterium tuberculosis* is the main causative agent of TB in humans and its cellular envelope contains a high lipid content, possessing mycolic acids (MAs) as one of the main components. *M. tuberculosis* produces three main classes of MAs: alpha, methoxy and keto-mycolic acids. MAs are associated with the virulence of *M. tuberculosis*, conferring resistance to desiccation and discoloration by alcohol and acid, resistance to chemical injury and to the immune system of the host, as well as being able to persist and multiply within the hostile environment of the phagolysosome of macrophages. Genes involved in the metabolism of MAs may suffer deletions or mutations, causing the cell envelope to exhibit differences in lipid composition. These differences in lipid composition may interfere with antimicrobial susceptibility and contribute to differences in the immune responses of the host. *M. tuberculosis* strains present genetic diversity and studies have demonstrated significant differences in the proportions of MAs belonging to the same phylogenetic lineage. The objective of this study was to standardize PCR reactions for the amplification of genes involved in MAs metabolism and perform an initial intralinear analysis, and the sequenced genes (*mmaA2*, *mmaA4* e *kasB*) belonging to the LAM family did not present any significant mutation. Therefore, it is important to use genomic and lipidic approaches together to help characterizing strains of *M. tuberculosis* that present different clinical profiles.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*; mycolic acids; standardization of PCR; gene sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimativa da incidência de tuberculose no ano de 2017.....	17
Figura 2. Envelope celular de <i>M. tuberculosis</i>	19
Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos produzidos por <i>M. tuberculosis</i>	20
Figura 4. Estruturas químicas do ddNTP e dNTP, respectivamente.	24
Figura 5. Sequenciamento pelo Método Sanger.....	24
Figura 6. Ilustração do procedimento de purificação.	33
Figura 7. Montagem da placa de sequenciamento para os genes <i>mmaA2</i> , <i>mmaA4</i> e <i>kasB</i>	35
Figura 8. Produtos das PCRs para amplificação dos sete genes envolvidos no metabolismo lipídico.....	38
Figura 9. Eletroferograma da região parcial do gene <i>mmaA4</i> (códon 307 ao 338).....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema básico do tratamento da TB para adolescentes e adultos (2RHZE/4R.....	16
Quadro 2. Quantificação e diluição das amostras com baciloscopia positiva no segundo mês de tratamento.	28
Quadro 3. Quantificação e diluição das amostras com baciloscopia negativa no segundo mês de tratamento.....	29
Quadro 4. Genes relacionados ao metabolismo de AMs que serão avaliados, seu respectivo <i>locus</i> e tamanho do fragmento amplificado.....	30
Quadro 5. <i>Primers</i> desenhados para a amplificação dos genes de interesse.	30
Quadro 6. <i>Primers</i> internos desenhados para a amplificação dos genes de interesse.	31
Quadro 7. Modificações realizadas para a padronização das reações de amplificação.....	31
Quadro 8. Quantificação e diluição das amostras purificadas para sequenciamento.	34
Quadro 9. Condições de reação das PCRs testadas inicialmente.	36
Quadro 10. Padronização das condições de reação das PCRs para cada gene.....	36
Quadro 11. Protocolos de reação de PCR para os sete genes envolvidos no metabolismo de AMs.	38
Quadro 12. Características dos isolados incluídos no estudo	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AM – Ácidos micólico
- BCG – Bacillus Calmette-Guérin
- CFP-10 – *Culture Filtrate Protein* (Proteína de filtrado de cultura de 10kDa)
- CG – Citosina e guanina
- dATP – Desoxiadenosina
- dCTP – Desoxicitidina
- dGTP – Desoxiguanosina
- dTTP – Desoxitimidina
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA – Ácido dextrirribonucleico
- ddNTP – Didesoxinucleotídeo
- dNTP – Desoxinucleotídeo
- E – Etambutol
- ESAT-6 – *Early Secretory Antigenic Target* (Antígeno de secreção primária de 6kDa)
- FAS I – *Fatty Acid Synthase Type I* (Ácido Graxo Sintase Tipo I)
- FAS II – *Fatty Acid Synthase Type II* (Ácido Graxo Sintase Tipo II)
- H – Isoniazida
- IGRA – *Interferon Gamma Release Assay* (Ensaio de Liberação de Interferon-Gama)
- LAM – Latino-Americana e Mediterrânea
- LBMMS – Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
- MIRU-VNTR – *Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats* (Unidades Repetitivas Intercaladas de Micobactérias - Número Variável de Repetições em Tandem)
- MS – Ministério da Saúde
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- pb – Pares de bases
- PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
- R – Rifampicina
- RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)
- TB – Tuberculose

Z – Pirazinamida

WHO – *World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 TUBERCULOSE	13
1.2 DIAGNÓSTICO	14
1.3 TRATAMENTO.....	14
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.5 AGENTE ETIOLÓGICO	18
1.6 ÁCIDOS MICÓLICOS	19
1.7 GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE AMS	21
1.8 MÉTODOS MOLECULARES	22
1.8 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	22
1.8 Sequenciamento pelo método Sanger	22
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 AMOSTRAS	27
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA	27
3.3 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (<i>primers</i>).....	29
3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	31
3.5 ELETROFORESE EM GEL	32
3.6 PURIFICAÇÃO DO DNA	32
3.7 SEQUENCIAMENTO DOS GENES	33
3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DAS PCRs.....	36

4.2 ELETROFORESE EM GEL	38
4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES	39
4.4 CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS INCLUÍDOS NO ESTUDO.....	40
5 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que constitui um problema de saúde global, sendo considerada a nona maior causa de morte em todo o mundo e a principal causa por um único agente infeccioso (WHO, 2017). A doença possui caráter crônico e é causada por bactérias pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii*, *M. mungi*, *M. orygis* e Bacilo de Dasse), sendo *M. tuberculosis* o principal agente causador de TB em humanos (PANDOLFI, 2007; ALEXANDER et al., 2010; van INGEN et al., 2012; CDC, 2013; COSCOLLA et al., 2013).

A transmissão ocorre pelo contato direto com as gotículas contendo os bacilos que são expelidas pelo indivíduo portador da forma clínica pulmonar ou laríngea da doença, ao tossir, espirrar ou falar. As gotículas mais leves ficam em suspensão por muitas horas, enquanto que as gotículas com diâmetro de 1,0 a 5,0 μm são capazes de penetrar a mucosa respiratória e, caso sobrevivam às defesas primárias, os bacilos atingem os alvéolos pulmonares, local onde iniciarão o processo infeccioso. Os macrófagos pulmonares fagocitam os bacilos e os antígenos são processados, sendo apresentados aos linfócitos T auxiliares. Neste processo de fagocitose tem-se a liberação de citocinas e quimiocinas, sinalizando ao sistema imune a presença do patógeno, e com isto os neutrófilos, monócitos e linfócitos migram para o local de infecção. Entretanto, os bacilos possuem mecanismos de escape, sendo capazes de permanecerem íntegros e se multiplicarem no interior dos macrófagos. A tentativa de conter a disseminação dos bacilos tanto pelos macrófagos como pelos linfócitos T faz com que seja formado o granuloma, local onde os bacilos permanecem em estado de latência, podendo ser reativados caso haja comprometimento da atividade imune do indivíduo (PANDOLFI, 2007; KOZAKEVICH; SILVA, 2015). A probabilidade de o granuloma evoluir para tuberculose pulmonar ativa depende de fatores relacionados às características do bacilo e às defesas imunes do indivíduo. (CAMPOS, 2006a; PANDOLFI, 2007; CDC, 2013).

1.2 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da TB é feito pela associação do quadro clínico do indivíduo com a realização de exames laboratoriais. O diagnóstico clínico se dá pela presença de sinais e sintomas característicos da TB, como tosse por mais de três semanas, hemoptise, dor no peito, sudorese noturna, febre, perda de apetite, emagrecimento e fadiga. No que se refere aos exames laboratoriais, destacam-se os exames bacteriológicos, radiológicos, histopatológicos, imunológicos e moleculares (COSTA, 2013; KOZAKEVICH, 2015).

Os exames bacteriológicos são compostos pela baciloscopia e cultura. A baciloscopia é a mais utilizada na rotina por ser uma técnica simples, rápida e de baixo custo. Nesta técnica, o escarro do paciente é coletado e posteriormente corado por Ziehl-Neelsen, sendo este material observado em microscópio óptico, onde é realizada a contagem dos bacilos. A cultura é considerada o padrão ouro para o diagnóstico por ser um método mais sensível, entretanto apresenta como desvantagem a demora do resultado, que pode variar de 15 a 60 dias. Para a realização da cultura, a amostra clínica contendo os bacilos é semeada em meios de cultura específicos, como Löwenstein-Jensen e Ogawa-Kudoh (COSTA, 2013; KOZAKEVICH, 2015).

O exame radiológico tornou-se uma ferramenta importante no diagnóstico da TB, pois além de permitir a exclusão de outra doença pulmonar, também auxilia na evolução do paciente, principalmente daqueles que não respondem ao tratamento quimioterápico (CAMPOS, 2006b; KOZAKEVICH, 2015). O exame histopatológico é realizado pela biópsia dos tecidos que apresentam suspeita da doença, sendo confirmado o diagnóstico na presença de lesão granulomatosa (com ou sem necrose caseosa) e pela presença dos bacilos no local da lesão (BRASIL, 2002; COSTA, 2013).

Os testes imunológicos utilizados para auxiliar no diagnóstico são o teste tuberculínico e ensaio de liberação de interferon-gama (IGRA). O teste tuberculínico baseia-se no inóculo intradérmico de tuberculina, gerando uma reação de hipersensibilidade caso o indivíduo esteja infectado ou já tenha tido contato com alguma micobactéria. É um teste de baixa especificidade, pois pessoas que foram vacinadas contra o *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) também podem apresentar reação de hipersensibilidade com a realização deste teste. O IGRA tem como princípio a resposta do hospedeiro às proteínas ESAT-6 e CFP-10, que induzem a secreção de interferon-gama pelo indivíduo, sendo produzida pelas bactérias do complexo *M. tuberculosis* e por cepas patogênicas de *M. bovis* (FERRI et al., 2014).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares ao longo dos anos, é possível observar uma melhora significativa no diagnóstico da TB. Dentre os testes moleculares,

destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) por ser uma técnica rápida e por ter uma alta sensibilidade e especificidade em amostras positivas, comparado com a cultura (CAMPOS, 2006b). Para realizar a distinção de linhagens, diferenciação do complexo *M. tuberculosis* e auxiliar no estudo epidemiológico, tem-se as técnicas *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), *Spoligotyping* (*Spacer Oligonucleotide Typing*) e o MIRU-VNTR (*Mycobacterial Interspersed Repetitive Units – Variable Number of Tandem Repeats*) (FURLANETO, 2010; GROENEN et al., 1993).

A RFLP baseia-se na sequência de inserção IS6110 presente em *M. tuberculosis*, permitindo diferenciar cepas de micobactérias e ter uma melhor compreensão da evolução molecular das espécies (CAMPOS, 2006b). O *Spoligotyping* tem como fundamento o polimorfismo de DNA presente em uma região cromossômica exclusiva do complexo *M. tuberculosis*, denominado *locus DR* (*Direct Repeat*), detectando a presença ou ausência de espaçadores presentes entre estes *loci*. Já o MIRU-VNTR baseia-se no polimorfismo das sequências repetitivas organizadas em tandem (VNTR) no DNA, que estão em quantidades variáveis entre as cepas (MATHEMA et al., 2006; ROCHA, 2009; VAN BELKUM, 1999). As técnicas *Spoligotyping* e MIRU-VNTR possuem vantagem de ter uma análise mais simples em comparação com a RFLP, que produz padrões complexos, dificultando a análise quando se tem um grande número de amostras, além de ser uma técnica demorada e de alto custo (CDC, 2008).

1.3 TRATAMENTO

Apesar da TB ser uma doença de difícil tratamento, praticamente 100% dos doentes podem evoluir para cura, desde que as doses dos medicamentos sejam tomadas corretamente e que o esquema terapêutico seja adequado para cada situação clínica (CAMPOS, 2007).

O tratamento da TB adotado pelo Brasil para adultos (sem suspeita clínica de resistência) consiste na utilização de quatro antimicrobianos, que são considerados de primeira linha: Rifampicina (R), isoniazida (H), pirazinamida (Z) e etambutol (E). Este tratamento é composto por uma fase intensiva de dois meses com o esquema RHZE, seguido por uma fase de manutenção de quatro meses com o esquema RH (RABAHI et al., 2017). O quadro 1 mostra o esquema básico do tratamento da TB para adolescentes e adultos (2RHZE/4RH).

A rifampicina tem alto poder bactericida, sendo potente contra *M. tuberculosis*, atuando também contra bactérias do mesmo gênero e bactérias piogênicas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da atividade da RNA polimerase, bloqueando a síntese de RNA mensageiro que produz proteínas essenciais para o DNA bacteriano. A isoniazida também tem

alto poder bactericida, atuando na inibição da biossíntese do ácido micólico (AM) e na quelação de íons cobres fundamentais para as micobactérias (SILVA; GHIRALDI, 2010).

A pirazinamida possui ação bactericida, porém pode levar ao desenvolvimento de resistência se utilizada isoladamente. Este antimicrobiano age em meio ácido, contribuindo para a eliminação dos bacilos presentes dentro de macrófagos. O etambutol é um antimicrobiano bacteriostático que atua na inibição do RNA bacteriano. É utilizado na fase intensiva, nos casos de recidiva ou retorno após abandono, já que possui ação contra quase todas as cepas de *M. tuberculosis* (SILVA; GHIRALDI, 2010).

M. tuberculosis é resistente a muitos antimicrobianos, dificultando o tratamento da TB. Esta resistência é causada devido ao seu alto conteúdo lipídico presente no envelope celular e por fatores codificados no genoma, como enzimas β -lactamases e aminoglicosídeo-acetil-transferases e mecanismo de efluxo (COLE et al., 1998).

Quadro 1. Esquema básico do tratamento da TB para adolescentes e adultos (2RHZE/4RH).

Regime	Antimicrobianos	Faixa de peso	Unidade/dose	Meses
2RHZE	RHZE 150/75/400/275 mg Comprimido em dose fixa combinada	20 a 35 kg 36 a 50 kg >50kg	2 comprimidos 3 comprimidos 4 comprimidos	2
4RH	RH 300/200mg ou 150/100mg Cápsula	20 a 35 kg 36 a 50 kg >50kg	1 cáps 300/200 1 cáps 300/200 + cáps 150/100 2 cáps 300/200	4

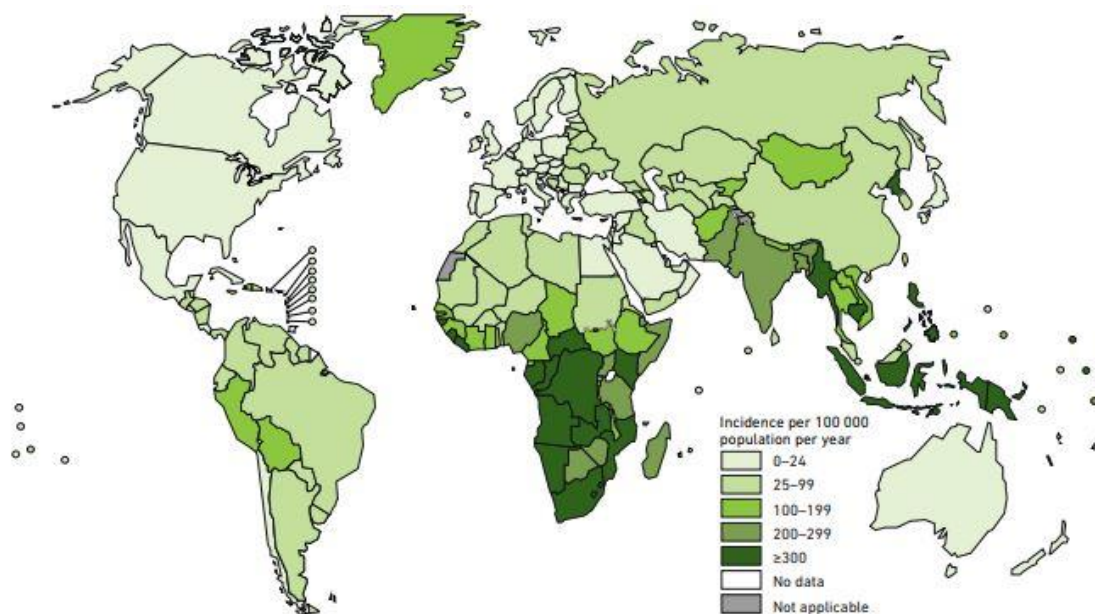
Fonte: BRASIL, 2011.

1.4 EPIDEMIOLOGIA

A TB continua sendo responsável por altos índices de mortalidade em todo o mundo, mesmo conhecendo-se o agente etiológico, a forma de transmissão e de ter tratamento eficaz disponível para a população (PANDOLFI, 2007). No ano de 2017, estima-se que tenham ocorrido 10,0 milhões de casos novos de TB em todo o mundo, e que 1,3 milhões de pessoas tenham morrido devido à doença. O número anual de casos incidentes de TB em 2017 teve uma variação ampla entre os países, sendo menos de 10 casos por 100.000 habitantes na maioria dos países desenvolvidos e 150-300 casos por 100.000 habitantes nos países em desenvolvimento. (WHO, 2018).

Com relação a TB resistente a antimicrobianos, houve 600.000 casos novos de resistência à rifampicina, que é considerada a primeira linha de tratamento, dos quais 490.000 tiveram tuberculose multirresistente (MDR-TB). Quase metade (47%) destes casos ocorreram na Índia, China e Rússia (WHO, 2018).

Figura 1. Estimativa da incidência de tuberculose no ano de 2017.



Fonte: Global Tuberculosis Report 2018.

No Brasil, no ano de 2017, foram notificados 69.569 casos novos de TB e foram registrados 13.347 casos de retratamento no país. Neste mesmo ano, a região Norte destacou-se por apresentar a maior incidência (42,7 casos/100.000 hab.), enquanto a região Centro-Oeste foi a que apresentou a menor incidência (20,0 casos/100.000 hab.) (BRASIL, 2018). Em Santa Catarina (SC), a incidência da TB se manteve estável no período de 2001 a 2017. Apesar de SC apresentar um baixo coeficiente de incidência (23,7/100.000 hab. em 2017) comparando-se a outros estados do Brasil, a taxa de cura em 2016 foi de 71,2%, valor abaixo do que é preconizado pelo Ministério da Saúde (MS) (85%) (BRASIL, 2018). Em 2016, o percentual de abandono de tratamento no país foi de 10,3%, estando acima da meta preconizada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (<5,0%). Florianópolis esteve entre as capitais com maior percentual de abandono de tratamento (superior a 20%) (BRASIL, 2018).

1.5 AGENTE ETIOLÓGICO

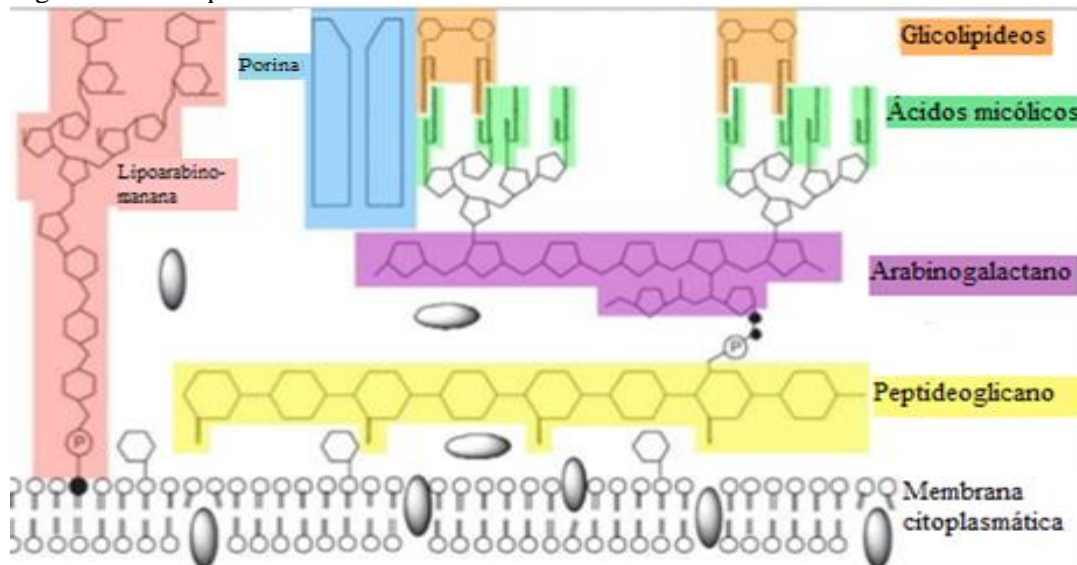
O agente etiológico da TB é uma micobactéria pertencente ao gênero *Mycobacterium*, família *Mycobacteriaceae*. O gênero *Mycobacterium* é composto por aproximadamente 60 espécies, sendo que *M. tuberculosis* tem sido considerado uma das espécies mais patogênicas (DUCATI et al., 2008).

M. tuberculosis é um patógeno intracelular aeróbico estrito, apresentando-se na forma de bacilo reto ou ligeiramente curto, imóvel, não esporulado, não encapsulado, de 0,2 a 0,6 µm de largura e 1 a 10 µm de comprimento (CAMPOS, 2006a; BARRERA, 2007; PANDOLFI et al., 2007). Seu envelope celular possui um alto teor lipídico, podendo representar até 40% do seu peso seco, sendo composto por uma camada de peptidoglicano, que está ligada covalentemente ao arabinogalactano. O arabinogalactano é um polissacarídeo ramificado, e, nas micobactérias, está esterificado em sua porção externa com os ácidos AMs (BARRERA, 2007; DAFFE et al., 2015). A figura 2 ilustra a composição do envelope celular do *M. tuberculosis*.

O genoma de *M. tuberculosis* H37Rv é composto por 4.411.532 pares de base (pb) e possui sequências ricas em guanina e citosina (G + C), correspondendo a 65,9%. O genoma contém 4.018 genes, sendo que estes genes estão distribuídos em diversas funções, como: virulência e adaptação, metabolismo lipídico, inserção de sequências, metabolismo intermediário e respiração. (COLE et al., 1998; CAMUS et al., 2002; LEW et al., 2011).

O complexo *M. tuberculosis* é constituído por sete linhagens principais (COMAS et al., 2013). Entre as linhagens destaca-se, pela relevância no Brasil, a linhagem Euro-Americana, que é composta pelas famílias Haarlem, LAM (Latino-Americana e Mediterrânea), S, T e X. As famílias LAM, Haarlem e T são as mais frequentes na África, América Central e América do Sul, englobando 80% de todos os isolados brasileiros (BRUDEY et al., 2006; FURLANETO, 2010). Em estudo realizado por Gomes e colaboradores (2012) observou-se que a família LAM é predominante (46%) no Brasil. O mesmo se observa em SC, onde estudos mostraram predominância da família LAM na população geral (40,1%) (NOGUEIRA et al., 2016), em isolados multirresistentes (41,3%) (PRIM et al., 2014) e em isolados provenientes das unidades prisionais do Estado (46,3%) (MEDEIROS et al., 2017). A diversidade genética presente no complexo *M. Tuberculosis* é responsável por consequências fenotípicas, e, segundo estudos, observa-se que há diferenças significativas nas proporções de AMs em uma mesma linhagem filogenética (COSCOLLA, GAGNEUX, 2010; PORTEVIN et al., 2014).

Figura 2. Envelope celular de *M. tuberculosis*.



A estrutura do envelope celular de *M. tuberculosis* é composta por uma camada de peptidoglicano ligada covalentemente ao arabinogalactano. O arabinogalactano está esterificado na sua porção externa com ácidos micólicos.

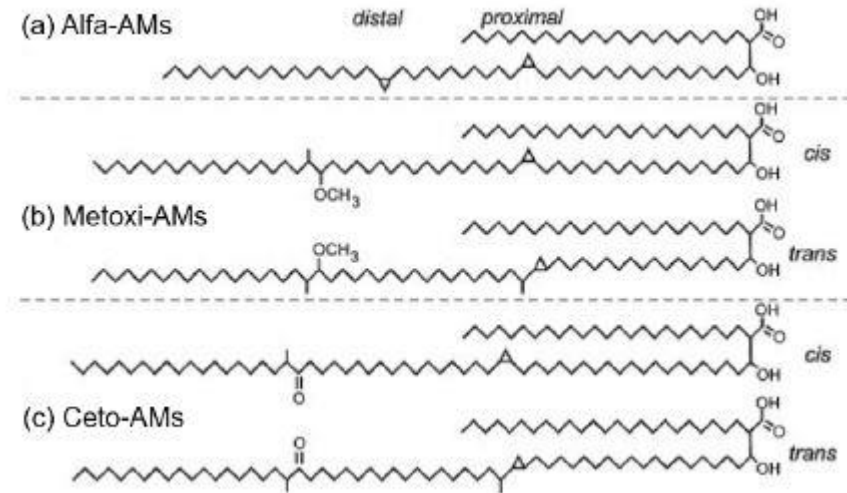
Fonte: Adaptado de KLEINNIJENHUIS et al., 2011.

1.6 ÁCIDOS MICÓLICOS

Os AMs são ácidos graxos de alto peso molecular que se ligam covalentemente a arabinogalactanos da parede celular, porém também podem ser encontrados como trealose monomicolatos (TMM), trealose dimicolatos (TDM) e hidróxi ácidos livres (MINNIKIN et al., 2002; VERSCHOOR; BAIRD; GROOTEN, 2012). São constituídos por glicolípideos complexos, como o arabinogalactano-micólico e trealose-6-6'-dimicolato. Os AMs específicos produzidos por *M. tuberculosis* são: alfa, ceto e metoxi-micolatos (figura 3) (BARRERA, 2007; DELL PORTILLO et al., 2007). Alfa-micolatos são os AMs mais predominantes, seguido de metoxi-AMs e ceto-AMs (WATANABE et al., 2002; GROENEWALD et al., 2014). Os AMs estão associados à virulência do *M. tuberculosis*, conferindo resistência à dessecação e à descoloração por álcool e ácido, resistência à lesão química e ao sistema imune do hospedeiro, bem como possuem capacidade de persistir e se multiplicar dentro do ambiente hostil do fagolisossoma dos macrófagos (MELO et al., 2009; VERSCHOOR et al., 2012; DAFFÉ et al., 2015). Os AMs possuem em sua estrutura anéis de ciclopropano que contribuem para a integridade da parede celular e protegem o bacilo contra o estresse oxidativo. Estudos sobre os AMs demonstraram que deleções no anel proximal do ciclopropano de alfa ou de metóxi e ceto-micolatos em *M. tuberculosis* levaram à redução na multiplicação dos bacilos em camundongos,

e deleção de ceto-micolatos resultou em multiplicação restrita do *M. tuberculosis* em macrófagos (YUAN et al., 1998; GLICKMAN, 2000; DUBNAU et al., 2002).

Figura 3. Estrutura química dos ácidos micólicos produzidos por *M. tuberculosis*.



Legenda: (A) Alfa-micolatos possuem anéis de ciclopropano nas posições distal e proximal em sua cadeia meromícólica, estando na configuração *cis*. (B) Ceto-micolatos possuem um anel de ciclopropano na posição proximal e uma cetona na posição distal. (C) Metóxi-micolatos possuem um anel de ciclopropano na posição proximal e um grupo metóxi na posição distal. A isomeria em metóxi e ceto-micolatos pode ser *cis* (ausência do grupo metil no ciclopropano proximal) ou *trans* (presença do grupo metil). Fonte: Adaptado de PORTEVIN et al., 2014.

A biossíntese dos AMs envolve dois sistemas distintos: o sistema ácido graxo sintase tipo I (FAS-I), encontrado em eucariotos e procariotos e o sistema ácido graxo sintase tipo II (FAS-II), encontrado em plantas e bactérias. O sistema FAS-I nas micobactérias é composto por um único complexo enzimático que é responsável por formar precursores de AMs. Neste sistema, estão incluídas reações de transacetilação de acetil-CoA e malonil-CoA, condensação, redução de β -cetoacil, desidratação e redução de enoil e reciclagem, que conduz a formação dos produtos C-20 e C-26, que são liberados como derivados de CoA. É pressuposto que o ácido graxo C-20 seja o ponto de partida para o sistema FAS-II assumir a síntese das cadeias longas de alfa, metóxi e ceto-AMs (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005).

O sistema FAS-II é composto por quatro enzimas: KasA/KasB, que é uma enzima condensadora; MabA, uma ceto-redutase; HadABC, uma desidratase; e InhA, uma enoil-redutase. FAS-II realiza a elongação dos ácidos graxos, conduzindo à formação de ácidos meromícólicos (C56), que é condensado à C-26-CoA (a partir do FAS-I), seguido por redução,

levando à produção de ácidos micólicos maduros (TAKAYAMA; WANG; BESRA, 2005; ABRAHAMS et al., 2016).

1.7 GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE AMS

Existe uma diversidade de genes envolvidos no metabolismo de lipídeos em estirpes de *M. tuberculosis* e sabe-se que estes genes podem sofrer deleções ou mutações, fazendo com que o envelope celular apresente diferenças na composição lipídica. Estas diferenças na composição lipídica, por sua vez, interferem na sensibilidade à antimicrobianos e contribuem para diferenças na resposta imunológica do hospedeiro (EHRT; SCHNAPPINGER, 2007; FORRELAD et al., 2013).

Em estudo realizado por Glickman (2002) observou-se que uma mutação no gene *mmaA2* resultou na ausência do anel de ciclopropano na posição distal, demonstrando que este gene é necessário para a introdução do anel ciclopropano na cadeia meromíclica. Com relação ao gene *mmaA4*, estudos mostraram que uma superexpressão do gene *mmaA4* em *M. smegmatis* levou à síntese de metóxi-micolatos, indicando que *mmaA4* participa da síntese de metóxi-micolatos, o qual é um precursor para a formação de AMs oxigenados em *M. tuberculosis* (YUAN, 1996; DUBNAU, 1997).

Os genes *fbpC* e *fbpA* codificam proteínas consideradas potencialmente virulentas, como o antígeno 85 (Ag85). Esta proteína possui atividade micolil transferase e está envolvida na síntese do envelope celular das micobactérias (ARMITIGE et al., 2000). Estudo feito por Jackson e colaboradores (1999) mostrou que quando os genes que codificam Ag85 são inativados, há uma redução (40%) na atividade micolil transferase, demonstrando que Ag85 desempenha uma função importante na transferência de micolatos para o envelope celular.

Pode-se observar, em estudo que avaliou o gene *kasB*, que uma mutação nesse gene levou à redução de dois a quatro carbonos da cadeia de AMs comparado com a cepa selvagem, sendo que esse defeito foi observado na porção proximal da cadeia meromíclica. Além disso, os genes mutantes apresentaram uma redução significativa de ceto-micolatos e alteração na permeabilidade, levando a uma maior sensibilidade aos antimicrobianos lipofílicos (GAO et al., 2003). Estudos envolvendo os genes *kasA* e *kasB* demonstraram que o gene *kasA* parece estar relacionado com o alongamento inicial dos AMs, os quais são estendidos posteriormente por *kasB* (KREMER et al., 2002; SLAYDEN; BARRY, 2002).

A trealose é um dissacarídeo presente no citoplasma das micobactérias e está envolvida no transporte de AM durante a síntese do envelope celular. Estudos indicam que OtsAOtsB é a via predominante para a formação de trealose em *M. tuberculosis* e que o gene *OtsB2* participa desta via, sendo considerado essencial para *M. tuberculosis* (MURPHY et al., 2005).

1.8 MÉTODOS MOLECULARES

1.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma das técnicas de biologia molecular utilizada para detectar *M. tuberculosis*. A técnica consiste na síntese de regiões específicas de DNA em ciclos repetidos e com alterações na temperatura (DROBNIEWSKI et al., 2013; MACENTE, 2009). Para obter uma amplificação eficiente, é necessário padronizar as melhores condições dos componentes da reação de PCR, envolvendo principalmente o ajuste da temperatura de hibridização, do número de ciclos, das concentrações de magnésio, desoxinucleotídeos (dNTPs), DNA e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*). A PCR possui três etapas, sendo que cada etapa ocorre a uma temperatura apropriada para que se obtenha maior eficiência da reação. As etapas são: (1) Desnaturação do DNA, realizada a uma temperatura próxima a 95°C; (2) hibridização dos *primers* à fita de DNA-molde, que ocorre a uma temperatura que varia de 55 e 62°C de acordo com a sequência dos *primers* e (3) extensão dos *primers*, etapa responsável pela síntese de DNA pela DNA-polimerase, ocorrendo a 72°C (temperatura ótima de atividade da enzima) (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2009).

Na etapa de desnaturação, as fitas do DNA-molde se separam devido ao rompimento das ligações de hidrogênio existentes entre as duas fitas, e, com o DNA desnaturado, um par de *primers* se liga à fita oposta (complementar) da sequência de DNA que será amplificada, indicando para a enzima DNA polimerase o ponto de início da amplificação. A síntese de DNA é feita pela ação da DNA-polimerase termoestável, que adiciona desoxirribonucleotídeos às extremidades 3'OH dos *primers*. A DNA-polimerase que é utilizada usualmente é a *Taq* DNA-polimerase, a qual foi originalmente isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus*. A amplificação ocorre após aproximadamente 25 a 30 ciclos, sendo de fundamental importância padronizar o número de ciclos, pois afeta tanto a obtenção do produto como a especificidade da reação (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2009).

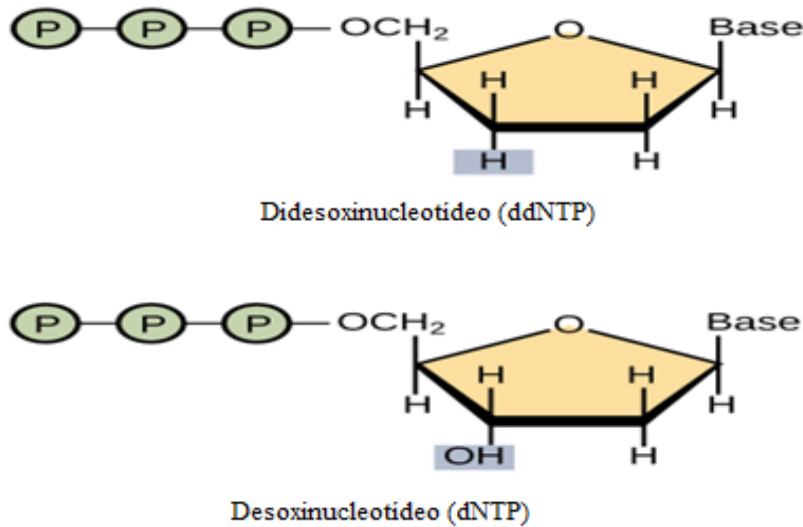
O magnésio (MgCl₂) é um cátion divalente que se liga à DNA polimerase, sendo um cofator essencial para a atividade da enzima. Se a concentração de magnésio for muito baixa, é

provável que pouco produto seja formado, e, se estiver em excesso, pode levar à formação de produtos inespecíficos. Os dNTPs são os blocos construtores do DNA e possuem um efeito quelante sobre os íons magnésio, podendo reduzir a quantidade de Mg^{+2} livre, interferindo na reação. Com relação à quantidade de DNA, a PCR é capaz de amplificar a partir de nanogramas de DNA inicial e recomenda-se que a quantidade de DNA não ultrapasse um a dois microgramas. Uma elevada quantidade de DNA pode fazer com que haja uma falsa hibridização dos *primers*, enquanto que amostras de DNA muito diluídas podem levar à redução da amplificação (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2009).

1.8.2 Sequenciamento de genes pelo método Sanger

O sequenciamento de genes consiste na determinação da sequência de bases nucleotídicas presente em um fragmento de DNA. O método de Sanger é utilizado para sequenciar fragmentos de DNA com até 900 pares de base e seu princípio fundamenta-se em uma mistura contendo uma amostra de DNA, *primer* e nucleotídeos de DNA (dATP, dTTP, dGTP, e dCTP) que é aquecida para a desnaturação do DNA molde e em seguida resfriada para que ocorra a hibridização dos *primers*. Após a hibridização, a temperatura é aumentada novamente, levando à síntese de DNA a partir da DNA polimerase. Em cada reação, um didesoxinucleotídeo (ddNTP) é incorporado aleatoriamente ao invés do dNTP correspondente, provocando o término da polimerização. Os ddNTPs inibem a síntese da cadeia recém-sintetizada em função de não possuírem a hidroxila no carbono 3', grupo que permite a ligação fosfodiéster com o próximo nucleotídeo (figura 4). Após a finalização da reação, o tubo irá conter fragmentos com tamanhos variados, de acordo com a posição e o ddNTP incorporado. Os ddNTPs são marcados por fluorescência característica e a visualização dos fragmentos é feita em um sequenciador automático, onde cada fragmento recebe um feixe de laser de argônio, que será detectado por um sistema óptico e um dispositivo de carga acoplada (CCD) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977; RYE et al., 2013). A figura 5 ilustra como ocorre o sequenciamento pelo método Sanger.

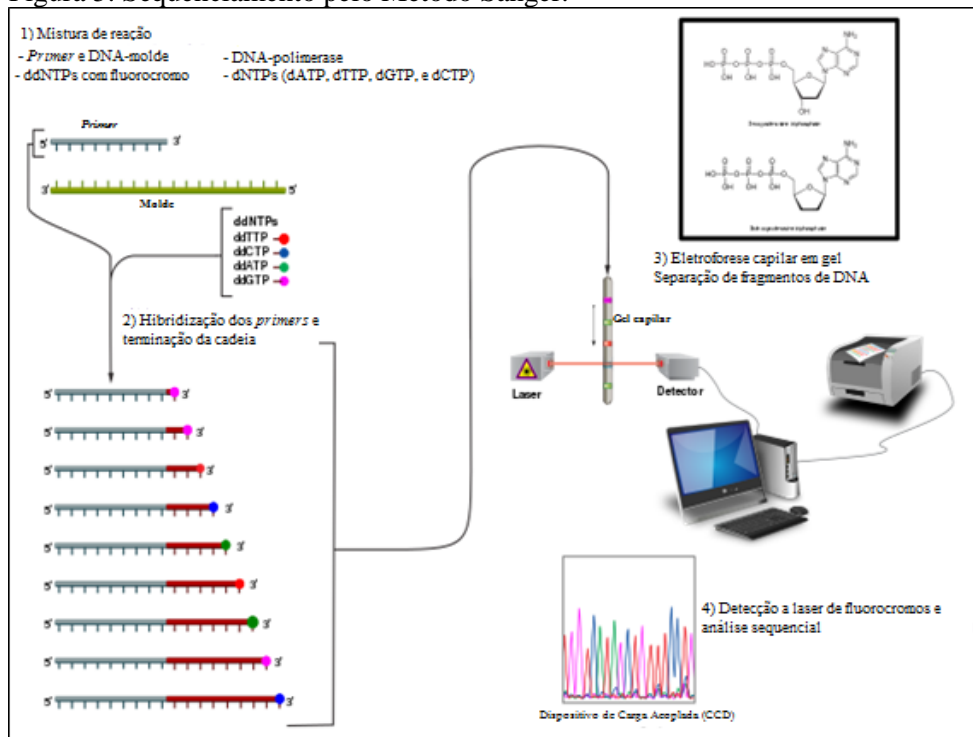
Figura 4. Estruturas químicas do ddNTP e dNTP, respectivamente.



O ddNTP possui uma estrutura similar com o dNTP, porém não contém a hidroxila no carbono 3'. Quando um ddNTP é incorporado, a síntese de DNA é finalizada.

Fonte: Adaptado de RYE et al., 2013.

Figura 5. Sequenciamento pelo Método Sanger.



A mistura de reação (1) é aquecida para a desnaturação do DNA molde e em seguida resfriada para que ocorra a hibridização dos *primers* (2). Em cada reação, um ddNTP marcado com fluorocromo é incorporado aleatoriamente ao invés do dNTP correspondente, provocando o término da reação (2). A separação de fragmentos de DNA é feita por eletroforese capilar em gel (3) e a visualização ocorre através de um sequenciador automático, onde cada fragmento recebe um feixe de laser de argônio, que será detectado por um sistema óptico e um dispositivo de carga acoplada (CCD) (4).

Fonte: Adaptado de RYE et al., 2013.

Estudos demonstraram uma diversidade no perfil de AMs em estirpes de *M. tuberculosis* em uma mesma linhagem filogenética, onde esta diferença estaria relacionada com a presença de mutações nos genes envolvidos no metabolismo de AMs (PORTEVIN et al., 2014). Neste contexto, o sequenciamento do genoma torna-se uma ferramenta útil para identificar a presença de deleções ou mutações que podem ocorrer nos genes envolvidos no metabolismo de AMs e, quando realizado em estirpes pertencentes à mesma linhagem filogenética e comparado entre estirpes com perfis diferentes de sensibilidade aos antimicrobianos, permite realizar uma caracterização inicial dos isolados que apresentam diferentes perfis clínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar reações de PCR para amplificação dos genes *fbpC*, *fbpA*, *mmaA2*, *mmaA4*, *otsB2*, *kasB* e *kasA*, envolvidos no metabolismo de AMs em estirpes de *M. tuberculosis*, e realizar análise inicial intralinhagem de mutações nos genes *mmaA2*, *mmaA4* e *kasB*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Selecionar estirpes de *M. tuberculosis* pertencentes à família LAM provenientes do banco de isolados clínicos do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS) da UFSC;

-Padronizar reações de PCR para amplificação dos genes *fbpA*, *fbpC*, *mmaA2*, *mmaA4*, *otsB2*, *kasA* e *kasB* envolvidos no metabolismo de AMs pertencentes a mesma linhagem filogenética;

-Sequenciar os genes *mmaA2*, *mmaA4* e *kasB*;

-Analisar as sequências obtidas, comparando-as com a sequência da cepa padrão de referência *M. tuberculosis* H37Rv.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAS

Para realizar a padronização das PCRs foram utilizadas estirpes de isolados clínicos previamente caracterizados como *M. tuberculosis* e a cepa padrão H37Rv. Para a análise, foram selecionadas estirpes provenientes do banco de amostras do LBMMS. Foram incluídas 30 estirpes, divididas em dois grupos: 1) 15 estirpes pertencentes à família LAM, com baciloscopia negativa no segundo mês de tratamento; 2) 15 estirpes pertencentes à família LAM, com baciloscopia positiva no segundo mês. O banco de amostras de onde foram selecionados os isolados faz parte do projeto já aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos/UFSC em 10/03/2014 sob número 550.598. 3.2.

3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

As cepas de *M. tuberculosis* do banco foram recultivadas e inoculadas em meio Ogawa-Kudoh. Após o crescimento das cepas, o DNA foi extraído utilizando o método de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio). Transferiu-se colônias isoladas de *M. tuberculosis* para uma solução de 400 µL de TE 1X (solução tampão) e foram aquecidas a 90°C por 30 minutos. Foram adicionados 50 µL de lisozima (10 mg/mL) e incubou-se por 24 horas a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se 70 µL de SDS (10%) e 5 µL de proteinase K (10 mg/mL) e a solução foi incubada a 65°C por 60 minutos. Em seguida, adicionou-se 100 µL de NaCl 5 M e 100 µL de CTAB/NaCl para que ocorresse a complexação de proteínas e lipídios, e essa mistura foi incubada por 10 minutos a 65°C. Para a separação do DNA foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e as fases foram separadas por centrifugação (5 minutos a 12.000 rpm). O sobrenadante aquoso foi transferido para um microtubo e adicionou-se 450 µL de isopropanol para que o DNA fosse precipitado e incubou-se a -20° *overnight*. Após a precipitação do DNA, realizou-se uma centrifugação por 15 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% a frio, centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm e desprezou-se novamente o sobrenadante. O tubo foi colocado em termobloco a 37°C por aproximadamente 1 hora até que o sedimento estivesse completamente seco. O DNA foi diluído de forma a obter-se uma concentração de 50 ng/ µl (quadro 2 e 3) e armazenado em geladeira até as análises moleculares.

Quadro 2. Quantificação e diluição das amostras com baciloscopia positiva no segundo mês de tratamento.

Amostra	ng/ μ L	1° diluição	Amostra- Água	ng/ μ L 1° diluição	2° diluição*	Amostra- Água	ng/ μ L 2° diluição
1	2227	1:10	2ul - 18ul	223	1:4	5ul - 15ul	56
2	1472	1:10	2ul - 18ul	147	1:2	10ul- 10ul	74
3	1276	1:10	2ul - 18ul	128	1:2	10ul- 10ul	64
4	648	1:10	3ul - 27ul	65	-	-	-
5	164	1:3	6ul - 12ul	55	-	-	-
6	2047	1:10	2ul - 18ul	205	1:4	5ul - 15ul	51
7	1393	1:10	2ul - 18ul	139	1:2	10ul - 10ul	70
8	1170	1:10	2ul - 18ul	117	1:2	10ul - 10ul	59
9	1041	1:10	2ul - 18ul	104	1:2	10ul - 10ul	52
10	1220	1:10	2ul - 18ul	122	1:2	10ul - 10ul	61
11	4769	1:10	2ul - 18ul	477	1:9	2ul - 16ul	53
12	2048	1:10	2ul - 18ul	205	1:4	5ul - 15ul	51
13	2984	1:10	2ul - 18ul	298	1:5	4ul - 16ul	60
14	2138	1:10	2ul - 18ul	214	1:4	5ul - 15ul	53
15	1099	1:10	2ul - 18ul	110	1:2	10ul - 10ul	55

* diluição que foi utilizada na PCR.

Quadro 3. Quantificação e diluição das amostras com baciloscopia negativa no segundo mês de tratamento.

Amostra	ng/ μ L	1° diluição	Amostra- Água	ng/ μ L 1° diluição	2° diluição*	Amostra- Água	ng/ μ L 2° diluição
16	2402	1:10	2ul - 18ul	240	1:4	5ul -15ul	60
17	2748	1:10	2ul - 18ul	275	1:5	10ul- 10ul	55
18	547	1:10	2ul - 18ul	55	-	10ul- 10ul	-
19	1320	1:10	2ul - 18ul	132	1:2	-	66
20	3282	1:3	2ul -18ul	328	1:6	-	55
21	1568	1:10	2ul -18ul	157	1:3	5ul -15ul	52
22	967	1:10	4ul - 16ul	97	1:3	10ul - 10ul	64
23	1873	1:10	2ul - 18ul	187	1:3	10ul - 10ul	62
24	2210	1:10	2ul - 18ul	221	1:4	10ul - 10ul	55
25	3072	1:10	2ul - 18ul	307	1:6	10ul - 10ul	51
26	2242	1:10	2ul - 18ul	224	1:4	2ul -16ul	56
27	2220	1:10	2ul - 18ul	222	1:4	5ul -15ul	56
28	2106	1:10	2ul - 18ul	210	1:4	4ul -16ul	53
29	1162	1:10	2ul - 18ul	116	1:2	5ul -15ul	58
30	1258	1:10	2ul - 18ul	126	1:2	10ul - 10ul	63

* diluição que foi utilizada na PCR.

3.3 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (*primers*)

Para o desenho dos *primers* necessários para a amplificação dos genes de interesse (quadro 4), foram utilizados os bancos de dados GenBank e Primer-Blast e o *software* Primer Select. Os *primers* foram avaliados quanto a sua especificidade em amplificar a sequência alvo (quadro 5). Também foram desenhados *primers* internos para melhorar a qualidade do sequenciamento (quadro 6).

Quadro 4. Genes relacionados ao metabolismo de AMs que serão avaliados, seu respectivo *locus* e tamanho do fragmento amplificado

Gene	<i>locus</i>	Tamanho (pb)
<i>fbpA</i>	Rv3804	1017
<i>fbpC</i>	Rv0129c	1023
<i>mmaA2</i>	Rv0644c	864
<i>mmaA4</i>	Rv0642c	906
<i>otsB2</i>	Rv3372	1176
<i>kasA</i>	Rv2245	1251
<i>kasB</i>	Rv2246	1317

Quadro 5. *Primers* desenhados para a amplificação dos genes de interesse.

Gene	Iniciador Senso (F)	Iniciador Antissenso (R)
<i>fbpA</i>	CCCTTCATGTGTCCACCTCC	TTGACTACACGAGCACTGCC
<i>fbpC</i>	CCGATGCTGGCTTGCTGG	CGGCAGATGAGAGTTGGGAT
<i>mmaA2</i>	CTCGATCGGGATTTGCCAGA	GGGTCCGGAAAGGCATTACA
<i>mmaA4</i>	CCATCCATCACCCGCAACTT	AGTAGACTTTCGTGCCACCG
<i>otsB2</i>	CGACATACCTGCTGCGCAAT	CGGGATACGAATGGGGGTTT
<i>kasA</i>	TCCGTGCTGCTGTTTACCAA	ATCTCCGGGTTACCAATGC
<i>kasB</i>	AAGATTGAGTCGGAGAACCC	CCGTCATTGGTCTTGCGAAC

Quadro 6. *Primers* internos desenhados para a amplificação dos genes de interesse.

Gene	Iniciador Senso (F2)	Iniciador Antissenso (F2)
<i>mmaA2</i>	ACCATCTGCTGCCTGGTC	-
<i>mmaA4</i>	CTTCTCGCCGTGTTTCGAC	ACCTGGACAAGCTGGACCTC
<i>kasB</i>	GAATTTCGACCACCAGCTGAC	GTGCGCATTGACGTGGTC

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Para padronizar as reações de amplificação dos sete genes de interesse, foram feitos protocolos variando a concentração de MgCl₂ (1, 2 e 3 mM), adição de 1% de DMSO (com e sem), quantidade de DNA (2,0 e 2,5 µL), número de ciclos (35 e 40), tempo de extensão da fita (1 e 2 minutos) e a temperatura de hibridização dos *primers* (variação de 1°C para mais ou menos de acordo com a temperatura indicada para a sequência do *primer*). O quadro 7 mostra as modificações que foram realizadas para a padronização das reações de amplificação dos genes de interesse.

Quadro 7. Modificações realizadas para a padronização das reações de amplificação.

Genes	[] mM de MgCl ₂	DMSO (1%)	Temperatura de hibridização (°C)	Número de ciclos	Tempo de extensão da fita (min)	Quantidade de DNA (µL)
<i>fbpA</i> , <i>fbpC</i> , <i>mmaA2</i> , <i>mmaA4</i> , <i>otsB2</i> e <i>kasB</i>	1, 2 e 3	Com e Sem	58°-60°-62°	35 e 40	1 e 2	2,0 e 2,5
<i>kasA</i>	1, 2 e 3	Com e Sem	57°-59°-61°	35 e 40	1 e 2	2,0 e 2,5

3.5 ELETROFORESE EM GEL

Para a visualização dos fragmentos amplificados, foram feitos géis de agarose na concentração de 1,5%, utilizando-se tris-borato-EDTA (TBE) como tampão para a corrida eletroforética.

O preparo do gel foi feito da seguinte forma:

- Pesou-se 0,45 gramas de agarose em um béquer (100 mL);
- Mediu-se 30 mL de TBE 1x em uma proveta (50mL), que foi adicionado ao béquer contendo a agarose;
- A mistura foi colocada no micro-ondas até obter-se um líquido homogêneo;
- Dentro da capela, adicionou-se 1 µl de brometo de etídio a esta mistura, que é uma substância que permite a visualização do DNA;
- Colocou-se o pente de modo que não formasse bolhas e aguardou-se a polimerização do gel;
- Após polimerização do gel, retirou-se o pente e o gel foi colocado na cuba de eletroforese, cobrindo com o tampão TBE10X;
- Adicionou-se 4 µl de padrão 100 pb no primeiro e no último poço e 5 µl dos fragmentos amplificados nos poços restantes.
- A corrida foi feita em 100 volts por 45 minutos.
- Após o término da corrida, os fragmentos amplificados de cada gene foram visualizados em luz UV (ImageQuant LAS 500 – GE Healthcare Life Sciences).

3.6 PURIFICAÇÃO DO DNA

Os fragmentos amplificados foram purificados pelo *kit* de purificação PureLink® em três etapas:

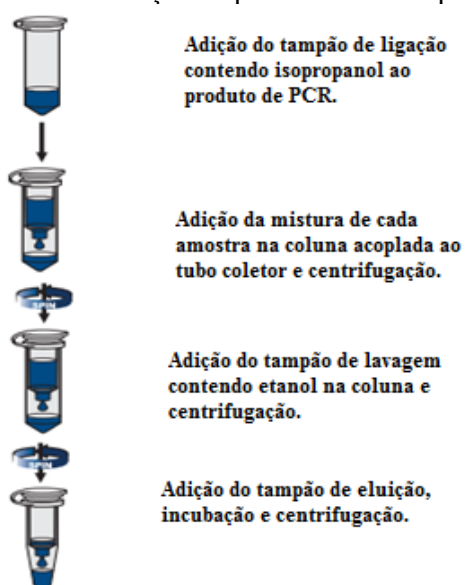
1º: Diluiu-se 1 volume do produto de PCR (45 µl) com 4 volumes (180 µl) do tampão de ligação (*Binding Buffer*) contendo isopropanol. As misturas de cada amostra foram adicionadas nas colunas que estão acopladas a tubos coletores e centrifugadas a 10.000 x g por 1 minuto. Em seguida, os sobrenadantes dos tubos coletores foram descartados e inseridos novamente nas colunas.

2º: Adicionou-se 650 µl do tampão de lavagem (*Wash Buffer*) com etanol nas colunas e centrifugou-se a 10,000 x g por 1 minuto. Os sobrenadantes foram descartados e as colunas

foram centrifugadas novamente na velocidade máxima por 2-3 minutos para remover qualquer resíduo que tenha ficado do tampão de lavagem.

3º: Os tubos coletores foram descartados e as colunas foram inseridas nos tubos de eluição contidos no *kit* de purificação. Adicionou-se 50 μ l do tampão de eluição (*Elution Buffer*) no centro das colunas e incubou-se a temperatura ambiente por 1 minuto. Após incubação, as colunas foram centrifugadas na velocidade máxima por 2 minutos e em seguida descartadas. Os tubos de eluição contendo os produtos de PCR purificados foram armazenados a -20°C . O procedimento realizado está ilustrado na figura 6.

Figura 6. Ilustração do procedimento de purificação.



Fonte: Adaptado de ThermoFisher Scientific (2011).

3.7 SEQUENCIAMENTO DOS GENES

O sequenciamento dos genes foi realizado pelo método de Sanger, pela empresa ACTGene Análises Moleculares – Ludwig Biotec. O produto de PCR purificado de cada amostra foi quantificado e diluído de forma a obter-se uma concentração de aproximadamente 24 ng/ μ l. Para a quantificação, utilizou-se o equipamento Nanovue e posteriormente utilizou-se o programa excel para calcular as quantidades de água e amostra necessárias para chegar na concentração aproximada de 24 ng/ μ l (quadro 8).

Quadro 8. Quantificação e diluição das amostras purificadas para sequenciamento.

Amostra	[<i>mmaA2</i>] ng/ μ L	Volume Amostra	Volume Eluente	[<i>mmaA4</i>] ng/ μ L	Volume Amostra	Volume Eluente	[<i>kasB</i>] ng/ μ L	Volume Amostra	Volume Eluente
1	64,5	4	16	113	2	18	63	4	16
2	68	4	16	79	3	17	39,5	6	14
3	69	3	17	58	4	16	72	3	17
4	67,5	4	16	57	4	16	83	3	17
5	68	4	16	67	4	16	57	4	16
6	67,5	4	16	57	4	16	71,5	3	17
7	42,5	6	14	56	4	16	72	3	17
8	68	4	16	54,5	4	16	58,5	4	16
9	70,5	3	17	62	4	16	79	3	17
10	71,5	3	17	55	4	16	60,5	4	16
11	65	4	16	58	4	16	34,5	7	13
12	74,5	3	17	41,5	6	14	43,5	6	14
13	61,5	4	16	61	4	16	60,5	4	16
14	73,5	3	17	57	4	16	67,5	4	16
15	79,5	3	17	69	3	17	60,5	4	16
16	77,5	3	17	61	4	16	58,5	4	16
17	92,5	3	17	60	4	16	50	5	15
18	50,5	5	15	48,5	5	15	55,5	4	16
19	72	3	17	24	10	10	64	4	16
20	57	4	16	62,5	4	16	58	4	16
21	66,5	4	16	61,5	4	16	54,5	4	16
22	73	3	17	68	4	16	52	5	15
23	75,5	3	17	53,5	4	16	54,5	4	16
24	80	3	17	49,5	5	15	22,5	11	9
25	75	3	17	61	4	16	40,5	6	14
26	93,5	3	17	62,5	4	16	55	4	16
27	85,5	3	17	52,5	5	15	58	4	16
28	76,5	3	17	60	4	16	54,5	4	16
29	87	3	17	56,5	4	16	52,5	5	15
30	83,5	3	17	62,5	4	16	64,5	4	16

A placa de sequenciamento é composta por 96 poços, como ilustra a figura 7. Para a montagem, foi adicionado 2 μ l da amostra e 1 μ l do *primer* em cada poço. Para os genes *mmaA4* e *kasB*, foram adicionados os *primers* F e R e os *primers* internos F2 e R2. Para o gene *mmaA2*, foram adicionados os *primers* F, R e F2.

Figura 7. Montagem da placa de sequenciamento para os genes *mmaA2*, *mmaA4* e *kasB*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2
B	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8
	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2	<i>mmaA2</i> F	<i>mmaA2</i> R	<i>mmaA2</i> F2
C	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2
D	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	6
	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2
E	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9
	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA4</i> R2	<i>mmaA4</i> F	<i>mmaA4</i> R	<i>mmaA4</i> F2	<i>mmaA2</i> R2
F	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2
G	4	4	4	4	5	5	5	5	6	6	6	6
	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2
H	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9
	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2	<i>kasB</i> F	<i>kasB</i> R	<i>kasB</i> F2	<i>kasB</i> R2

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.8 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram analisadas no programa Chromas (Technelysium – DNA Sequencing Software). Neste programa, a qualidade de *Phred* de cada sequência é analisada, sendo considerada uma boa qualidade quando o valor da base está acima de 30, que representa 99,9% de precisão no sequenciamento de determinada base. Após analisar a qualidade, os arquivos de cada sequência foram convertidos para o formato FASTA, o qual permite que as sequências de nucleotídeos sejam utilizadas por *softwares*. Em seguida, foi feita a montagem dos *contigs* (união das sequências senso e antissenso) pelo *software* PRABI, disponível em: <http://doua.prabi.fr/software/cap3>. Por último, as sequências foram comparadas com a sequência da cepa padrão de referência *M. tuberculosis* H37Rv disponível no GenBank (GenBank: AL123456.3), utilizando o programa MEGA 7.0.26 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE REAÇÃO DAS PCRs

Após fazer modificações em alguns parâmetros da PCR, foi possível estabelecer a padronização para os sete genes envolvidos no metabolismo de AMs. O quadro 9 mostra as condições que foram testadas inicialmente e que resultaram na não amplificação dos genes. Após fazer estas modificações foi possível estabelecer a padronização para cada gene, que pode ser observada no quadro 10.

Quadro 9. Condições de reação das PCRs testadas inicialmente.

Gene	[] mM de MgCl ₂	DMSO (1%)	Temperatura de hibridização (°C)	Número de ciclos	Tempo de extensão da fita (min)	Quantidade de DNA (µL)
<i>fbpA</i>	1	Com	62°	40	1	2,0
<i>fbpC</i>	1	Sem	58°	40	1	2,0
<i>mmaA2</i>	1	Sem	62°	40	1	2,0
<i>mmaA4</i>	1	Com	62°	40	1	2,0
<i>otsB2</i>	1	Sem	60°	40	1	2,0
<i>kasA</i>	2	Sem	59°	40	1	2,0
<i>kasB</i>	2	Com	62°	40	1	2,0

Quadro 10. Padronização das condições de reação das PCRs para cada gene.

Gene	[] mM de MgCl ₂	DMSO (1%)	Temperatura de hibridização (°C)	Número de ciclos	Tempo de extensão da fita (min)	Quantidade de DNA (µL)
<i>fbpA</i>	3	Com	60°	35	1	2,0
<i>fbpC</i>	3	Com	58°	35	1	2,0
<i>mmaA2</i>	2	Com	62°	35	1	2,0
<i>mmaA4</i>	2	Com	62°	35	1	2,0
<i>otsB2</i>	3	Com	60°	35	1	2,0
<i>kasA</i>	3	Com	59°	35	2	2,0
<i>kasB</i>	3	Com	62°	35	1	2,0

A quantidade de DNA padronizada para cada reação de PCR foi 2,0 µl. Com relação ao número de ciclos para amplificação das sequências de DNA, não se recomenda realizar mais do que 40 ciclos, pois um aumento excessivo do número de ciclos leva à formação de produtos inespecíficos, além do desequilíbrio na proporção dos componentes de reação por exaustão, como por exemplo de nucleotídeos e da enzima (RODRIGUES; SILVA; SIQUEIRA, 2009). Neste estudo, os genes foram testados inicialmente com 40 ciclos, porém observou-se uma baixa qualidade da amplificação onde não houve a amplificação de todos os genes, logo, o número de ciclos foi diminuído para 35, resultando em uma melhor amplificação de todos os genes.

Sabe-se que o magnésio é um cofator essencial para a atividade da enzima, e nos testes realizados não houve amplificação dos genes na concentração de 1 mM, apenas nas concentrações de 2 a 3 mM. O tempo de extensão padronizado foi de 1 minuto, com exceção do gene *kasA* (2 minutos).

O DMSO é um composto organossulfurado que auxilia na desnaturação das fitas, sendo útil para quando se deseja amplificar sequências ricas em guanina e citosina (G + C), pois nestas sequências tem-se um aumento das ligações de hidrogênio, dificultando a desnaturação do DNA (HARDSAJA et al., 2010). Todos os sete genes tiveram uma melhor amplificação na presença de DMSO, já que os genes envolvidos no metabolismo de AMs em estirpes de *M. tuberculosis* possuem sequências ricas em G + C (COLE et al., 1998).

A partir da padronização das condições de reação das PCRs para cada gene, também foram padronizados os protocolos para a realização das PCRs, que estão descritos no quadro 11. As condições de PCR programadas no termociclador para a amplificação dos sete genes foram 94°C/5 minutos e 35 ciclos de 95°/1 minuto para desnaturação das fitas de DNA. Em seguida, foi realizado 35 ciclos de 58°-62°C/1 minuto para a hibridização dos *primers*, e, para a extensão das fitas, realizou-se 35 ciclos de 72°C/1-2 minutos e de 72°C/10 minutos para a extensão final.

Quadro 11. Protocolos de reação de PCR para os sete genes envolvidos no metabolismo de AMs.

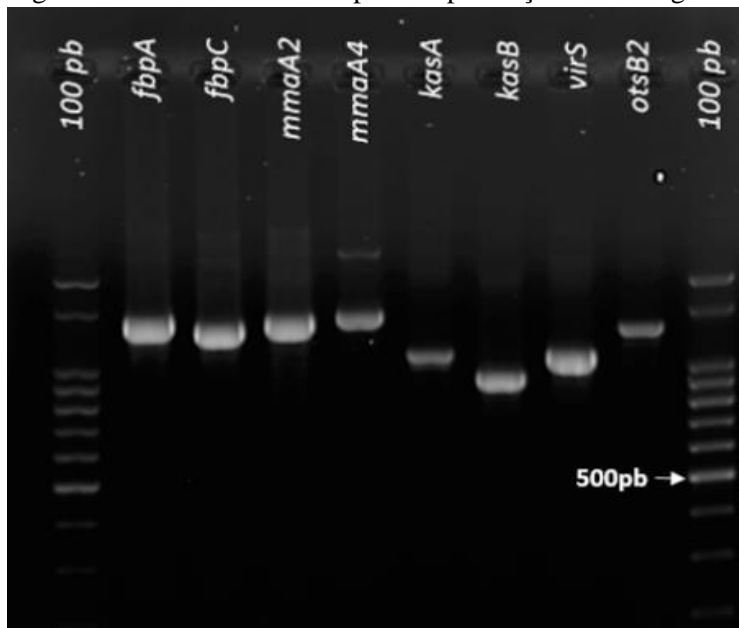
Protocolo de PCR	Genes: <i>fbpA</i> , <i>otsB2</i> , <i>mmaA2</i> , <i>mmaA4</i> , <i>kasA</i>	Genes: <i>fbpC</i> , <i>kasB</i>
H2O	28, 25 µl	30, 25 µl
Tampão 5x	10,00 µl	10,00 µl
MgCl ₂ (2 mM)	6,0 µl	4,0 µl
<i>Primer F</i> (20 pmoles)	1,0 µl	1,0 µl
<i>Primer R</i> (20 pmoles)	1,0 µl	1,0 µl
dNTP (0,5 mM)	1,0 µl	1,0 µl
DMSO (1%)	0,5 µl	0,5 µl
Taq (1 U)	0, 25 µl	0, 25 µl
DNA (50 ng/ µL)	2,0 µl	2,0 µl

4.2 ELETROFORESE EM GEL

A figura 8 ilustra os fragmentos amplificados para os sete genes envolvidos no metabolismo de AMs.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram purificados, quantificados e diluídos para serem sequenciados pela empresa ACTGene Análises Moleculares.

Figura 8. Produtos das PCRs para amplificação dos sete genes envolvidos no metabolismo lipídico.



Legenda: 100pb: Marcador de tamanho molecular 100 pb. Gene *fbpA* (produto de 1071 pb); gene *fbpC* (produto de 1023 pb); gene *mmaA2* (produto de 864 pb); gene *mmaA4* (produto de 906 pb); gene *kasA* (produto de 1251 pb); gene *kasB* (produto de 1317 pb); gene *virS* (produto de 1023 pb); gene *otsB2* (produto de 1176 pb). Fonte: LBMMS (2018).

4.3 SEQUENCIAMENTO DOS GENES

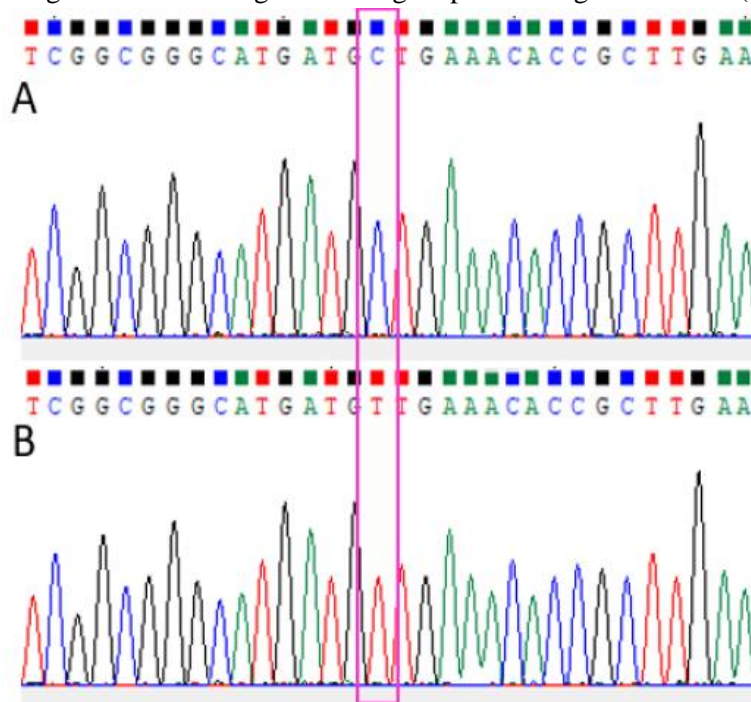
Neste estudo, apenas as sequências com bases com qualidade acima de 30 foram consideradas, em seguida foi realizada comparação por alinhamento com a sequência da estirpe selvagem de referência *M. tuberculosis* H37Rv disponível no GenBank (GenBank: AL123456.3), considerando a sequência de cada gene em específico.

Dos 30 isolados que foram sequenciados para o gene *mmaA2*, 28 sequências apresentaram uma boa qualidade *Phred* e puderam ser analisadas. Nenhuma mutação foi encontrada nas sequências do gene *mmaA2* dos isolados clínicos.

Para o gene *mmaA4*, 27 sequências foram analisadas e 25 apresentaram mutação sinônima na posição 322 do gene, apresentando uma troca de base T para C (L322L) (Figura 9). Esta mutação não confere troca de aminoácido, pois tanto a sequência ‘TTG’ como a ‘CTG’ codificam o aminoácido Leucina. Com relação ao gene *kasB*, 24 sequências foram analisadas, porém nenhuma mutação foi encontrada.

Dessa forma, com a ausência de mutações significativas, não foi possível fazer correlação dos resultados obtidos nas estirpes de *M. tuberculosis* com diferentes perfis clínicos.

Figura 9. Eletroferograma da região parcial do gene *mmaA4* (códon 307 ao 338).



Legenda: A) sequência com a mutação L322L e B) sequência cepa-padrão H37Rv. A ordem e a cor dos picos indicam a sequência das bases nitrogenadas: verde: adenina, vermelho: timina, azul: citosina e preto: guanina. O retângulo rosa indica a base nitrogenada substituída.

Fonte: LBMMS (2018).

Sabendo-se que os AMs estão associados a virulência de *M. tuberculosis* e que os genes envolvidos no metabolismo lipídico ao sofrer deleções ou mutações podem alterar a composição lipídica, torna-se necessário realizar estudos que contemplem abordagens genômicas e lipidômicas para analisar o perfil dos genes envolvidos no metabolismo de AMs, pois irá contribuir para a identificação de polimorfismos presentes nos genes, além de auxiliar no desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento da TB que atuem sobre a síntese de AMs (EHRT; SCHNAPPINGER, 2007; FORRELAD et al., 2013).

4.4 CARACTERÍSTICAS DOS ISOLADOS INCLUÍDOS NO ESTUDO

Neste estudo foram selecionadas amostras pertencentes à família LAM em virtude de ser a prevalente no Brasil e em Santa Catarina, tanto na população em geral, em isolados multirresistentes e em isolados provenientes das unidades prisionais do Estado (GOMES et al., 2012; PRIM et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2017). O quadro 13 refere-se ao desfecho para as 30 amostras incluídas no presente estudo.

Quadro 12. Características dos isolados incluídos no estudo.

Amostra	Baciloscopia no 2º mês	Desfecho
1	Positiva	Cura
2	Positiva	Cura
3	Positiva	Cura
4	Positiva	Cura
5	Positiva	Cura
6	Positiva	Cura
7	Positiva	Cura
8	Positiva	Cura
9	Positiva	Cura
10	Positiva	Cura
11	Positiva	Cura
12	Positiva	Cura
13	Positiva	Cura – 9 meses de tratamento
14	Positiva	Óbito
15	Positiva	Cura
16	Negativa	Cura
17	Negativa	Cura - Resistência a INH e STR
18	Negativa	Cura
19	Negativa	Cura
20	Negativa	Cura
21	Negativa	Cura
22	Negativa	Cura
23	Negativa	Cura
24	Negativa	Cura
25	Negativa	Abandono
26	Negativa	Cura
27	Negativa	Óbito
28	Negativa	Cura
29	Negativa	Cura
30	Negativa	Cura

É possível perceber que para a maior parte das amostras o desfecho foi de cura, com exceção das amostras 14 e 27, as quais resultaram em óbito e da amostra 25, que teve como desfecho abandono de tratamento.

5 CONCLUSÃO

Os AMs estão relacionados com a virulência da TB e os genes que codificam os AMs podem sofrer deleções ou mutações, alterando a composição lipídica, que por sua vez pode interferir no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos utilizados no tratamento da TB. O estudo sobre o perfil de AMs auxilia no desenvolvimento de novos antimicrobianos, tendo em vista que alguns antimicrobianos utilizados no tratamento da TB possuem mecanismos de ação relacionados com o envelope celular de *M. tuberculosis*.

A padronização dos protocolos de PCR para os sete genes envolvidos no metabolismo de AMs foi obtida após realizar modificações em alguns parâmetros, como na concentração de MgCl₂, adição de DMSO, número de ciclos e temperatura de hibridização e extensão dos *primers*. Todos os genes tiveram uma melhor amplificação com a realização de 35 ciclos e na presença de DMSO. A quantidade de magnésio variou de 2 a 3 mM e o tempo de extensão padronizado foi de 1 minuto, com exceção do gene *kasA* (2 minutos).

Os genes *mmaA2*, *mmaA4* e *kasB* foram sequenciados pelo método Sanger, sendo que nenhum dos isolados avaliados apresentou mutação significativa.

É necessário realizar estudos que contemplem um maior número de genes envolvidos no metabolismo de AMs para se obter resultados mais significativos, bem como associar abordagens lipodômicas para analisar o perfil de AMs pertencentes à mesma linhagem filogenética. Além disso, a utilização de abordagens genômicas e lipidômicas em conjunto auxilia na caracterização de estirpes de *M. tuberculosis* que apresentam diferentes perfis clínicos e no desenvolvimento de novos antimicrobianos para o tratamento da TB.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, Katherine A. et al. Identification of KasA as the cellular target of an anti-tubercular scaffold. **Nature Communications**, [s.l.], v. 7, p.1-13, 1 set. 2016.
- ALEXANDER, Kathleen A. et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Pathogen, *M. mungi*. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.1296-1299, ago. 2010.
- ARMITIGE, Lisa Y. et al. Disruption of the Genes Encoding Antigen 85A and Antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: Effect on Growth in Culture and in Macrophages. **Infection and Immunity**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.767-778, fev. 2000.
- BARRERA, Lucía. The Basics of Clinical Bacteriology: The tubercle bacillus: a continuous taxon. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana. **Tuberculosis 2007: From basic science to patient care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: BourcillierKamps, 2007. Cap.3. p. 93-112.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Vigilância epidemiológica. **Tuberculose: Guia de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, v..1, n.1, 2002. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br>>. Acesso em: out. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v.48, n.8, 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: fev. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, Brasília, v49, n11, 2018. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: mai.2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. **Informativo Epidemiológico**, Santa Catarina, 2017. Disponível em: <www.dive.sc.gov.br/tuberculose>. Acesso em: mai. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. **Nota técnica sobre as mudanças no tratamento da tuberculose no Brasil para adultos e adolescentes**. [s.l.], 2011. 2 p.
- BROWN, Timothy et al. Associations between *Mycobacterium tuberculosis* Strains and Phenotypes. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.272-280, fev. 2010.
- BRUDEY, Karine et al. *Mycobacterium tuberculosis* complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-17, mar. 2006.
- CAMPOS, Hisbello S. Diagnóstico da tuberculose. Rev. Pulmão. Rio de Janeiro, v.15, n.2, p.92-99, mai. 2006b.

CAMPOS, Hisbello S. Etiopatogenia da tuberculose e formas clínicas. **Rev. Pulmão**, Rio de Janeiro, v. 15, n. 1, p. 29-35, mar. 2006a.

CAMPOS, Hisbello S. Tratamento da tuberculose. **Rev. Pulmão**, Rio de Janeiro, v.16, n.1, p.21-31, 2007.

CAMUS, Jean-christophe et al. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Microbiology**, [s.l.], v. 148, n. 10, p.2967-2973, 1 out. 2002.

CDC - Centers for disease control and prevention. Tuberculosis Genotyping Laboratory Procedures. Guide to the Application of Genotyping to Tuberculosis Prevention and Control, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/tb/programs/genotyping/chap3/3_cdclab_2description.htm>. Acesso em: nov. 2018.

CDC - Centers for disease control and prevention. Core Curriculum on Tuberculosis, Chapter 2: Transmission and Pathogenesis of Tuberculosis. Sixth edition, 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/pdf/chapter2.pdf>>. Acesso em: fev.2018.

COLE, Stewart. T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

COMAS, Iñaki et al. Out-of-Africa migration and Neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans. **Nature Genetics**, [s.l.], v. 45, n. 10, p.1176-1182, set. 2013.

COSCOLLA, Mireia; GAGNEUX, Sebastien. Does *M. tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, Basileia, v. 7, n. 1, p.43-59, mar. 2010.

COSCOLLA, Mireia et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* Complex Isolate from a Wild Chimpanzee. **Emerging Infectious Diseases**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.969-976, jun. 2013.

COSTA, Milce; TAVARES, Viviane R.; SILVA, Andréia C. Tuberculose: Uma Revisão de Literatura. **Refacer**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1-19, dez. 2013.

CUBILLOS-RUIZ, Andrés; MORALES, Juan; ZAMBRANO, María. Analysis of the genetic variation in *Mycobacterium tuberculosis* strains by multiple genome alignments. **BMC Research Notes**, Bogotá, v. 1, n. 1, p.1-10, nov. 2008.

DAFFÉ, Mamadou. The cell envelope of tubercle bacilli. **Elsevier**, Toulouse, p. 155-158. mar. 2015.

DALLA COSTA, Elis R. et al. Correlations of mutations in *katG*, *oxyR-ahpC* and *inhA* genes and in vitro susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains segregated by spoligotype families from tuberculosis prevalent countries in South America. **BMC Microbiology**, [s.l.], v. 9, n. 39, 11 p., fev 2009.

DELL PORTILLO, Patricia et al. Genomics and Proteomics. In: PALOMINO, Juan Carlos; LEÃO, Sylvia Cardoso; RITACCO, Viviana. **Tuberculosis 2007: From Basic Science to Patient Care**. Antuérpia, São Paulo, Buenos Aires: BourcillierKamps, 2007. Cap. 4. p. 113-146.

DROBNIIEWSKI, Francis et al. Rapid diagnostics of tuberculosis and drug resistance in the industrialized world: clinical and public health benefits and barriers to implementation. **Bmc Medicine**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.1-11, 29 ago. 2013.

DUBNAU, Eugenie et al. *Mycobacterium bovis* BCG genes involved in the biosynthesis of cyclopropyl keto- and hydroxy-mycolic acids. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.313-322, jan. 1997.

DUBNAU, Eugenie et al. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Molecular Microbiology**, Nova York, v. 36, n. 3, p.630-637, jan. 2002.

DUCATI, Rodrigo.G. *et al.* Micobactérias. In: TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. Capítulo 56, p.423-436.

ECA – European Concerted Action on New Generation Genetic Markers and Techniques for the Epidemiology and Control of Tuberculosis. Beijing/W Genotype *Mycobacterium tuberculosis* and Drug Resistance. **Emerging Infectious Diseases**, V. 12, N. 5, p. 736-743, mai 2006.

EHRT, Sabine; SCHNAPPINGER, Dirk. *Mycobacterium tuberculosis* virulence: lipids inside and out. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.284-285, mar. 2007.

FERRI, Anise Osório et al. Diagnóstico da tuberculose: uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 15, n. 24, p.105-212, maio 2014.

FORRELLAD, Marina A. et al. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Virulence**, Buenos Aires, v. 4, n. 1, p.3-66, jan. 2013.

FURLANETO, Ismari Perini. **Uso do spoligotyping para genotipagem de Mycobacterium tuberculosis obtidos a partir de lâminas coradas pela técnica de ziehl-neelsen pertencentes a pacientes com tuberculose pulmonar residentes nos municípios paraenses de Belém e Ananindeua, Pará, Brasil**. 2010. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

GAO, Lian-yong et al. Requirement for kasB in Mycobacterium mycolic acid biosynthesis, cell wall impermeability and intracellular survival: implications for therapy. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 6, p.1547-1563, 2 set. 2003.

GLICKMAN, Michael. S.; COX, Jeffery. S.; JACOBS, William. R. A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Cell**, v. 5, p. 717–727, 2000.

GLICKMAN, Michael S. The *mmaA2* Gene of *Mycobacterium tuberculosis* Encodes the Distal Cyclopropane Synthase of the α -Mycolic Acid. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 10, p.7844-7849, 26 dez. 2002.

GOMES, Harrison M. et al. Spoligotypes of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from patients residents of 11 states of Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 12, n. 4, p.649-656, jun. 2012.

GROENEN, Peter M. A. et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 10, n. 5, p.1057-1065, dez. 1993.

GROENEWALD, Wilma et al. Differential spontaneous folding of mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 180, p. 15–22, 2014.

HARDJASA, Amelia et al. Investigating the Effects of DMSO on PCR Fidelity Using a Restriction Digest-Based Method. **Journal of Experimental Microbiology and Immunology**. Vancouver, p. 161-164. abr. 2010.

JACKSON, Mary et al. Inactivation of the antigen 85C gene profoundly affects the mycolate content and alters the permeability of the *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope. **Molecular Microbiology**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1573-1587, mar. 1999.

JHINGAN, Gagan D. et al. Comparative Proteomic Analyses of Avirulent, Virulent, and Clinical Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Identify Strain-specific Patterns. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 291, n. 27, p.14257-14273, maio 2016.

KLEINNIJENHUIS, Johanneke et al. Innate Immune Recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical and Developmental Immunology**, [s.l.], v. 2011, p.1-12, 29 jan. 2011.

KOZAKEVICH, Gabriel V.; SILVA, Rosemeri M. Tuberculose: Revisão de Literatura. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Florianópolis, v. 4, n. 44, p.34-47, dez. 2015.

KREMER, Laurent et al. Mycolic acid biosynthesis and enzymic characterization of the β -ketoacyl-ACP synthase A-condensing enzyme from *Mycobacterium tuberculosis*. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 364, n. 2, p.423-430, 1 jun. 2002.

LEW, Jocelyne M. et al. TubercuList – 10 years after. **Tuberculosis**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.1-7, jan. 2011.

MACENTE, Sara. Diagnóstico Molecular de *M. tuberculosis*: Uma Revisão de Técnicas. **Revista Saúde e Pesquisa**, [s.l.], v. 2, n. 2, p. 225-231, ago. 2009.

MARAIS, Ben J. et al. Beijing and Haarlem Genotypes Are Overrepresented among Children with Drug-Resistant Tuberculosis in the Western Cape Province of South Africa. **Journal of Clinical Microbiology**, Tygerberg, v. 44, n. 10, p.3539-3543, ago. 2006.

MATHEMA, Barun. et al. Molecular Epidemiology of Tuberculosis: Current Insights. **Clinical Microbiology Reviews**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.658-685, 1 out. 2006.

MEDEIROS, Taiane. F. et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* strains from prison populations in Santa Catarina, Southern Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, Florianópolis, v. 15, n. 58, p. 34-39, 2017.

MELO, Fernando A. F. et al. Tuberculose, In: VERONESI, R.F. et al. **Tratado de Infectologia**. 4 ed. Volume 1. São Paulo: Atheneu, 2009. Cap. 68. p.1263–1333.

MINNIKIN, David E. et al. The Methyl-Branched Fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. **Chemistry & Biology**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.545-553, mai. 2002.

MURPHY, Helen N. et al. The OtsAB Pathway Is Essential for Trehalose Biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal Of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, n. 15, p.14524-14529, 9 fev. 2005.

NOGUEIRA, Christiane L. et al. First insight into the molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in Santa Catarina, southern Brazil. *Tuberculosis*, v. 97, p. 57-64, 2016.

PANDOLFI, José R. et al. Tuberculose e o estudo molecular da sua epidemiologia. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p.251-257, nov. 2007.

PORTEVIN, Damien et al. Lipidomics and genomics of *Mycobacterium tuberculosis* reveal lineage-specific trends in mycolic acid biosynthesis. **MicrobiologyOpen**, Singapura, v. 3, n. 6, p.823-835, set. 2014.

PRIM, Rodrigo. I. et al. Molecular profiling of drug resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 5, p. 618-23, 2016.

RABAHI, Marcelo F. et al. Tuberculosis treatment. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [s.l.], v. 43, n. 6, p.472-486, dez. 2017.

ROCHA, Viviane C. M. **Discriminação de isolados de *Mycobacterium bovis* pela técnicas de *Spoligotyping*, MIRU e ETR e suas aplicações epidemiológicas**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Veterinária e Zootecnia, Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRIGUES, Jaqueline J. S.; SILVA, Rosângela C.; SIQUEIRA, Marilda M. Técnicas de Biologia Molecular Aplicadas ao Diagnóstico. In: RODRIGUES, Jaqueline J. S.; SILVA, Cláudia Maria D.; ROSSETTI, Maria L. **Doenças Infeciosas: Diagnóstico Molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 2. p. 17-38.

RYE, Connie et al. DNA Structure and Sequencing. In: RYE, Connie et al. **Biology**. Houston: Openstax, 2013. Cap. 14. p. 366-373.

SAMBANDAN, Dhinakaran. et al. Keto-Mycolic Acid-Dependent Pellicle Formation Confers Tolerance to Drug-Sensitive *Mycobacterium tuberculosis*. **Mbio**, [s.l.], v. 4, n. 3, p.1-13, 7 mai. 2013.

SANGER, Frederick; NICKLEN, Steve; COULSON, Andrew. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 74, n. 12, p.5463-5467, 1 dez. 1977.

SLAYDEN, Richard A.; BARRY, Clifton E. The role of KasA and KasB in the biosynthesis of meromycolic acids and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, [s.l.], v. 82, n. 4-5, p.149-160, ago. 2002.

SILVA, Paulo V.C.; GHIRALDI, Luciana D. Tratamento Farmacológico da Tuberculose e seus Efeitos Adversos. **Uningá Review**, Maringá, v. 1, n. 4, p.65-74, out. 2010.

TAKAYAMA, Kuni; WANG, Cindy; BESRA, Gurdyal S. Pathway to Synthesis and Processing of Mycolic Acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.81-101, jan. 2005.

VAN BELKUM, Alex. The role of short sequence repeats in epidemiologic typing. **Current Opinion in Microbiology**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.306-311, jun. 1999.

VAN INGEN, Jakko et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* Complex Subspecies. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, p. 653-655. abr. 2012.

VERSCHOOR, Jan A.; BAIRD, Mark S.; GROOTEN, Johan. Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis*. **Progress in Lipid Research**, v. 51, p. 325–339, 2012.

WATANABE, Motoko et al. Separation and characterization of individual mycolic acids in representative mycobacteria. **Microbiology**, [s.l.], v. 147, n. 7, p.1825-1837, 1 jul. 2001.

WHO – World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2017. Disponível em: <www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: fev.2018.

WHO – World Health Organization. Global Tuberculosis Report, 2018. Disponível em: <http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/>. Acesso em: nov. 2018.

YUAN, Ying et al. The effect of oxygenated mycolic acid composition on cell wall function and macrophage growth in *Mycobacterium tuberculosis*. **Molecular Microbiology**, Montana, v. 29, n. 6, p.1449-1458, set. 1996.