

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

Livia Harumi Yamashiro

**Investigação do mecanismo micobactericida da isoniazida
em modelo de granuloma humano**

**Florianópolis
2015**

Lívia Harumi Yamashiro

**Investigação do mecanismo micobactericida da isoniazida
em modelo de granuloma humano.**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de
Doutor em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. André Báfica

Florianópolis

2015

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

Yamashiro, Livia Harumi

Investigação do mecanismo micobactericida da isoniazida em modelo de granuloma humano. / Livia Harumi Yamashiro ; orientador, André Báfica - Florianópolis, SC, 2015.
163 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Mycobacterium tuberculosis. 3. isoniazida. 4. granuloma. I. Báfica, André. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

“Investigação do mecanismo micobactericida da isoniazida em modelo de granuloma humano”

Por

Livia Harumi Yamashiro

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (014/FMC/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – UFSC, composta pelos doutores:

Orientador:



Dr(a) André Luiz Barbosa Báfica (MIP/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



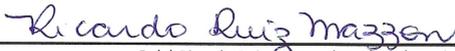
Dr(a) Antônio Gigliotti Rothfuchs (Karolinska Institutet/Suécia)



Dr(a) Sérgio Costa Oliveira (Depto de Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG)



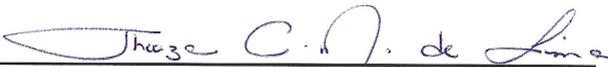
Dr(a) Maria Regina D'Império Lima (Depto de Imunologia/ICB/USP)



Dr(a) Ricardo Ruiz Mazzon (MIP/CCB/UFSC)



Dr(a) Juliano Ferreira (FMC/CCB/UFSC)



Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Farmacologia

Florianópolis, 24 de abril de 2015.

DEDICO ESTE TRABALHO

À minha querida mãe pelo amor e exemplo,
incentivo e apoio incondicional,
pelos sacrifícios para me proporcionar
a melhor vida possível e por
fazer da sua felicidade a minha.

Aos meus queridos irmãos Rafael e Evelin,
à Juliana e ao periquitinho do meu coração, Heitor,
pelo amor à distância e por me
ajudarem sempre.

Agradecimentos

À Deus, meu Pai Celestial, por sempre me mostrar o caminho a seguir e por me ajudar a trilhá-lo.

Ao Professor André Báfica (papito), pelos ensinamentos científicos e pessoais, por seu exemplo quanto ao amor à ciência e à ética, pelo incentivo, apoio e por nos forçar a sempre fazer o melhor.

Aos membros da banca Professores Sérgio Oliveira, Antônio Rothfuchs, Ricardo Mazzon, Maria Regina Lima, Juliano Ferreira e Elizabeth Linder pela disposição em avaliar meu trabalho e contribuir para meu aperfeiçoamento profissional.

À querida família LiDI e todos os que um dia fizeram parte dela por me acolherem e terem se tornado a minha família manézinha, fazendo com que o trabalho fosse sempre melhor e mais alegre! Pela amizade, alegria, apoio em todos os momentos e pelas discussões científicas. Pelos inúmeros happy hours, churrascos no mangue, SBIs, SSIs, LiDI Xmas, LiDI beach, LiDI camping, LiDI beans, etc etc etc... “A felicidade somente é plena quando compartilhada”. Carol Eto, Cris Lorenzini, Renata Fleith, Stefanny (Puka) Morales, Paula Fernandes, Mariana Maraschin, Daniel (Filho) Patrício, Adara Áurea, Anaclara Celli, Murilo Delgobo, Rafael Bezerra, Jéssica Copetti, Flávia Cardoso, Fernanda Morgana, Gabriela Mathias, Magno Garcia, Marina

Soncini, Andrezinho Junkes, Lorena Ramos, Fernanda Soares, Álvaro Menin, Cássia Sacchet, Ana Hillesheim, Jonatas Lindner, Éverton Mezzomo.

Ao Professor Daniel Mansur pelos ensinamentos, exemplo e conversas enriquecedoras.

Aos Professores Mário Steindel, Edmundo Grisard, Oscar Romero, Fabricio Neves e Anicleto Poli pelos ensinamentos e conversas enriquecedoras.

À Darcita Rovaris do LACEN por conceder-nos as amostras clínicas de cepas resistentes à INH.

Às velhas amigas e companheiras de laboratório e da vida Nicole (Niniii) de Souza, Nicoli (Nika) Heck e Verônica (Veee) Horewicz pela amizade e apoio.

Aos amigos Giovana e Eduardo Zahn e às belezinhas Raphaela, Betina e Luiza, e à Sílvia Schiavo pela amizade e por sempre se preocuparem comigo.

À amiga de sempre Helen Soares pelo amor e apoio, conselhos e amizade eterna.

Aos amigos que a Suécia me proporcionou Carina Olivera, Yu Gao, Xiaogang Feng, Berit Olsson e especialmente à Vishnu

Bollampalli pela amizade, ajuda e convivência tão agradável. Também à Benedetta Polsinelli, Irene Micheletti, Ninon Rouchossé, Germán López e Sanna Storing por aquecerem meus dias longe de casa.

Aos Professores Susanne Nylén e Martin Rottenberg pelos ensinamentos e conversas enriquecedoras. Novamente, ao Professor Antônio (Tony) Rothfuchs por me receber em seu laboratório, pelos ensinamentos e conversas agradáveis.

À todos os docentes do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela contribuição na minha formação científica;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro e às demais agências de fomento CAPES, NIH e HHMI pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa;

À todos os amigos e colegas que torceram por mim e que, de alguma forma, contribuíram direta ou indiretamente para que este trabalho fosse concluído.

Decisions determine destiny.

Thomas S. Monson

RESUMO

Após a infecção com o bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), causador da tuberculose (TB), observa-se a formação de uma estrutura celular característica denominada granuloma. Esse agregado celular é responsável por restringir a infecção e manter a doença em estado latente. Porém, quando a forma ativa da doença se desenvolve, o infiltrado de células apresenta necrose caseosa e as bactérias entram em intenso estado replicativo. Diante deste quadro, faz-se uso de antibióticos como a isoniazida (INH), um dos pilares da quimioterapia da TB. A INH é uma pró-droga que requer ativação por uma catalase peroxidase bacteriana codificada pelo gene *katG*, a fim de inibir a síntese de ácidos micólicos, importantes componentes estruturais da bactéria. Entretanto, dados recentes indicam que a INH pode também ser ativada por enzimas presentes em células do hospedeiro. É possível que este fármaco aja diretamente em células que abrigam o Mtb, contribuindo para o controle do seu crescimento intracelular. Entretanto, estudos que avaliam os efeitos da INH em sistemas biológicos complexos como o granuloma são escassos. Dessa forma, a partir de um modelo de granuloma humano *in vitro* investigamos os mecanismos iniciais do tratamento com INH que promovem a morte micobacteriana nesse sistema. Nossos resultados demonstram que o modelo utilizado mimetiza a fase ativa da infecção, com populações celulares semelhante às encontradas na infecção *in vivo*, como macrófagos, células dendríticas, linfócitos e granulócitos. Ainda mais, o granuloma apresenta intensa replicação bacteriana associada à necrose celular. Verificamos ainda que a INH possui capacidade bactericida nesse sistema celular, mas que, ao menos nas fases iniciais de tratamento *in vitro*, esse efeito não está relacionado com ativação de células T ou monócitos e independe de importantes citocinas, como IL-1 β ou TNF. Utilizando cepas clínicas resistentes à INH, bem como experimentos de coinfeção do granuloma com cepas sensível e resistente à INH, constatamos que o fármaco age diretamente sobre a bactéria, e sua forma ativa não age diretamente nas células do granuloma para promover a morte bacteriana. O desenvolvimento desta tese, em conjunto com outros dados presentes na literatura, confirmou a necessidade de ativação do

fármaco pelo patógeno para a atividade inicial bactericida da INH localmente no granuloma.

Palavras-chave: Tuberculose, isoniazida, granuloma, *Mycobacterium tuberculosis*.

ABSTRACT

Following infection with the bacilli *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), causative agent for tuberculosis (TB), there is formation of a characteristic cellular structure named granuloma. This cellular aggregate is responsible for restricting infection and keeping disease in its latent form. However, when the active disease manifests, the cellular infiltrate undergoes caseous necrosis and bacteria start intense replication. In this scenario, it is initiated the use of antibiotics such as isoniazid (INH), one of the pillars for TB chemotherapy. INH is a pro drug that needs activation by a bacterial catalase peroxidase encoded by *katG* gene, in order to inhibit mycolic acids synthesis, important bacteria structural components. Nevertheless, recent data indicate that INH can also be activated by cell host enzymes. It is possible that the drug acts directly on host cells infected with Mtb, contributing to the control of intracellular growth. However, studies that evaluate INH's effect in complex biologic systems such as the granuloma are scarce. Therefore, using an *in vitro* human granuloma model we investigated the early mechanisms by which treatment with INH promotes mycobacterial killing in this system. Our results show that the model mimics the active phase of infection, with the same cellular population seen in *in vivo* infection, such as macrophages, dendritic cells, lymphocytes and granulocytes. Moreover, the granuloma presents intense bacterial replication associated to cellular necrosis. We could also confirm INH's bactericidal activity in this cellular system, though at least during early *in vitro* treatment, this effect was not related to T cells or monocytes activation and does not depend on important cytokines, such as IL-1 β or TNF. By using INH resistant clinical strains, as well as performing coinfection experiments with sensible and resistant INH strains, we could confirm the drug's direct action over bacteria, and that its active form does not act directly upon granuloma cells to promote bacterial killing. These thesis conclusions, together with literature data, confirmed the need of pathogen drug activation for early bactericidal activity of INH locally in the granuloma.

Key words: Tuberculosis, isoniazid, granuloma, *Mycobacterium tuberculosis*.

Lista de figuras

Figura 1 Incidência de novos casos de TB no mundo por 100.000 habitantes em 2013..	18
Figura 2. Modelo proposto da parede celular micobacteriana. . .	21
Figura 3. Estrutura do granuloma.....	25
Figura 4. Esquema proposto do mecanismo de ação da INH....	39
Figura 5 Concentração inibitória mínima de INH em cepa virulenta de laboratório H37Rv..	66
Figura 6. Caracterização de MMO (macrófagos derivados de medula óssea) de camundongos.....	68
Figura 7. Pré ou pós tratamento de Mtb H37Rv com baixas doses de INH não altera o crescimento da bactéria em macrófagos murinos.	70
Figura 8. Pré tratamento de macrófagos com baixas doses de INH não altera o crescimento da bactéria.....	72
Figura 9. A estrutura celular granulomatosa assemelha-se ao granuloma na fase ativa da infecção..	76
Figura 10. O tratamento com INH reduz o crescimento de Mtb no granuloma	78
Figura 11. O granuloma de doadores PPD positivo apresenta maior capacidade em controlar a infecção e não são influenciados pelo tratamento com INH.....	81
Figura 12. O granuloma de células T primadas controla melhor a infecção, mas não sofre influência do tratamento com baixas doses de INH.....	84
Figura 13. O granuloma com células T primadas possui maior frequência de células T efetora de memória e menor de células T de memória, não influenciando o tratamento com INH.....	86
Figura 14. A frequência de células T- $\gamma\delta$ é mantida após o tratamento de INH no granuloma.....	88

Figura 15. Granulomas com redução de linfócitos CD3+ apresentam controle da infecção semelhante aos granulomas intactos.....	91
Figura 16. A adição de monócitos ao granuloma, tratados ou não com INH não interfere na atividade bactericida da INH.....	94
Figura 17. O tratamento com INH não influencia a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF.....	96
Figura 18. A adição exógena ou o bloqueio da ação das citocinas TNF ou IL-1 β não interfere no tratamento com INH.....	97
Figura 19. O tratamento com INH reduz IL-8 e IL-6 no sobrenadante dos granulomas infectados com Mtb.....	98
Figura 20. O tratamento com INH promove redução parcial do crescimento de cepas clínicas resistentes à INH em granulomas infectados.....	101
Figura 21. Níveis semelhantes de TNF e IL-1 β em granulomas infectados com cepas sensível ou resistente à INH após o tratamento com INH.....	103
Figura 22. A INH age diretamente na bactéria para promover seu efeito bactericida. Coinfecção de granulomas com cepas sensível e resistente à INH 255R.....	107
Figura 23. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação inicial da INH proposto em modelo <i>in vitro</i> de granuloma humano.	124

Índice

1. Introdução	17
1.1 <i>A tuberculose como problema de saúde pública</i>	17
1.2 <i>A biologia do Mycobacterium tuberculosis</i>	19
1.3 <i>Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro: formação do granuloma</i>	22
1.4 <i>Quimioterapia da TB: isoniazida</i>	34
2 Objetivos	48
2.1 <i>Geral</i>	48
2.2 <i>Específicos</i>	48
3 Metodologia Experimental	49
3.1 <i>Animais de experimentação e considerações éticas</i>	49
3.2 <i>Amostra de sangue humano e considerações éticas</i>	49
3.3 <i>Cultivo Celular</i>	49
3.3.1 <i>Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (MMO)</i> 49	
3.3.2 <i>Obtenção de leucócitos totais a partir de sangue periférico humano</i>	51
3.3.3 <i>Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano</i>	52
3.3.4 <i>Cultivo de Mtb H37Rv e cepas clínicas resistentes</i> ... 53	
3.4 <i>Preparação das suspensões bacterianas para infecção</i> .. 53	
3.5 <i>Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)</i> 54	
3.6 <i>Formação do granuloma humano</i>	55
3.7 <i>Coinfecção de granulomas com cepas sensível e resistente à INH</i> 55	
3.8 <i>Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)</i> 56	
3.9 <i>Dosagem de citocinas por CBA</i>	57
3.10 <i>Ensaio de priming in vitro</i>	58
3.11 <i>Enriquecimento por separação magnética da fração CD19-</i> 58	
3.12 <i>Adição de monócitos ao granuloma</i>	59
3.13 <i>Ensaio colorimétrico de MTT</i>	60
3.14 <i>Citometria de fluxo</i>	61
3.15 <i>Marcação para viabilidade celular com FVS</i>	61
3.16 <i>Avaliação de doadores quanto à resposta ao PPD</i>	62
3.17 <i>Análise Estatística</i>	63
4 Resultados	64

4.1	<i>Concentração inibitória mínima de INH em cepa virulenta de laboratório H37Rv</i>	64
4.2	<i>A pré exposição de bactérias Mtb H37Rv ou o pós tratamento de macrófagos infectados com baixas doses de isoniazida não interfere no crescimento de Mtb</i>	67
4.3	<i>A estrutura celular semelhante ao granuloma assemelha-se ao granuloma na fase ativa da infecção</i>	73
4.4	<i>O tratamento com INH reduz o crescimento de Mtb no granuloma em altas concentrações</i>	77
4.5	<i>O granuloma de doadores PPD positivo apresenta maior capacidade em controlar a infecção quando comparado ao granuloma de doadores PPD negativo, mas não são influenciados pelo tratamento com INH</i>	80
4.6	<i>O granuloma com células T primadas controla melhor a infecção</i>	82
4.7	<i>A frequência de células T-$\gamma\delta$ é mantida após o tratamento com INH</i>	87
4.8	<i>Granulomas com redução de linfócitos CD3+ apresentam controle da infecção semelhante aos granulomas intactos</i>	90
4.9	<i>A adição de monócitos ao granuloma, tratados ou não com INH não interfere na atividade bactericida da INH</i>	93
4.10	<i>O tratamento com INH não influencia a produção de citocinas pró-inflamatórias no granuloma</i>	95
4.11	<i>O tratamento com INH promove redução parcial do crescimento de cepas clínicas resistentes à INH em granulomas infectados</i>	100
4.12	<i>A INH age diretamente na bactéria para promover seu efeito bactericida</i>	104
5	Discussão	108
6	Conclusões	129
7	Referências Bibliográficas	130

1. Introdução

1.1 A tuberculose como problema de saúde pública

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa causada principalmente pelo patógeno *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), uma bactéria patogênica aeróbia que estabelece a infecção principalmente nos pulmões (RILEY, 1957).

A TB foi responsável por milhões de mortes no passado, quando não haviam métodos de tratamento adequados para os pacientes e, ainda hoje, é reconhecida como a responsável pelo maior número de mortes causado por um único agente infeccioso (LAWSON et al., 2012; MINION et al., 2013).

A Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês '*World Health Organization*') estima que mais de 2 bilhões de pessoas possuam a forma latente da doença. Deste grande reservatório de assintomáticos, 8 a 10 milhões de casos de TB ativa emergiriam todos os anos, resultando na morte de 1,7 milhão de pessoas. De fato, em 2013 a TB foi a causa da morte de 1,5 milhão de pessoas (WHO, 2014).

Existem 22 países que em conjunto perfazem cerca de 80% dos casos globais de TB, sendo a maioria destes com taxas de 150-300 casos por 100.000 habitantes. Nove dentre os dez países com as maiores taxas de incidência no mundo se encontram no continente africano, sendo que na África do Sul e Suazilândia estima-se que pelo menos um em cem habitantes desenvolva TB a cada ano (WHO, 2014). A taxa de incidência de

TB varia entre países, com as menores taxas vistas principalmente em países de alta renda, incluindo a maior parte da Europa Ocidental, Canadá, Estados Unidos, Japão, Austrália e Nova Zelândia. Nestes países a incidência é de menos de 10 casos por 100.000 habitantes. A região das Américas apresenta a menor média de carga de TB e a maior parte dos países desta região apresenta taxas menores que 50 novos casos por 100.000 habitantes (Figura 1) (WHO, 2014).

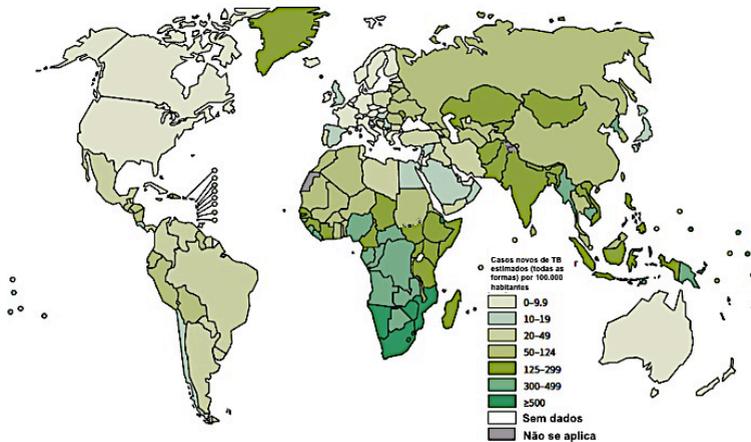


Figura 1 Incidência de novos casos de TB no mundo por 100,000 habitantes em 2013. Adaptado de WHO, 2014.

No Brasil, estimativas recentes indicam 92 mil casos incidentes e 115 mil casos prevalentes com mortalidade de 4,4 mil pessoas por ano (WHO, 2014). Embora Santa Catarina tenha sido o estado com a menor incidência de TB no ano de 2010 (27 em 100.000 habitantes), alguns de seus municípios apresentaram taxas de incidência iguais ou até maiores que o

observado no país (BRASIL, 2009; SINAN, 2011). A permanência de casos de TB tem sido atribuída a três principais fatores: a pandemia de HIV, o surgimento de cepas multirresistente a drogas e a falha na principal vacina usada até hoje, a BCG, em prevenir a forma pulmonar da doença (KAUFMANN, 2001; DYE e WILLIAMS, 2010; BEHAR et al., 2011). Diante destes fatos, é evidente a necessidade do melhor entendimento dessa doença para a saúde pública.

1.2 A biologia do *Mycobacterium tuberculosis*

O Mtb, também conhecido como bacilo de Koch, pertence à classe Actinobacteria, ordem Actinomycetales, família Mycobacteriaceae e gênero Mycobacterium. Espécies pertencentes a este gênero são amplamente distribuídas no ambiente, dentre as quais existem parasitas obrigatórios, saprófitos e patógenos oportunistas (RASTOGI, LEGRAND e SOLA, 2001; COOK et al., 2009). Os organismos deste táxon são separados em dois grupos: as micobactérias não causadoras de TB e o Complexo M. tuberculosis (CMTB), formado por Mtb, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* e *M. canettii*, espécies que podem causar a doença (BROSCH et al., 2002).

A bactéria Mtb foi descoberta em 1882 por Robert Koch (KOCH, 1882) e teve seu genoma sequenciado em 1998, possuindo 4 milhões de pares de base e 3959 genes (COLE et al., 1998). O Mtb tem formato bastonete, não possui flagelo, não forma esporos e possui alto metabolismo aeróbio (BRENNAN e NIKAIDO, 1995). O bacilo apresenta crescimento lento, com

tempo de replicação de aproximadamente 20 horas (COOK et al., 2009; NIEDERWEIS et al., 2010). Além disso, o patógeno é álcool-ácido resistente, característica conferida pela composição de sua parede celular, rica em lipídeos (WINDER e COLLINS, 1970) e não é marcado pela coloração de Gram. Para fins de visualização e identificação, dispõe-se de outra metodologia, a coloração pelo método de Ziehl Neelsen (BRANDT e LLOYD, 1954), no qual as bactérias são coradas a quente com fucsina, resistindo à descoloração por solução álcool-ácido, que remove o corante apenas de células desprovidas de camada lipídica. O elevado teor de lipídeos estruturais na parede celular das bactérias provoca uma grande hidrofobicidade, dificultando a ação dos mordentes e diferenciadores de corantes aquosos (BRANDT e LLOYD, 1954).

A parede celular de *Mtb* é composta de 3 componentes principais: i) a membrana plasmática, ii) um complexo covalente de ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptidoglicanos e iii) um material rico em polissacarídeos (COLE et al., 1998) (Figura 2). Os ácidos micólicos são ácidos graxos de cadeia longa, elucidados pela primeira vez por Asselineau em 1950 e são o principal componente da parede da bactéria. São formados por uma longa cadeia β -hidroxil e uma ramificação curta α -alquil. Cada molécula contém de 60 a 90 átomos de carbono, constituindo uma forte barreira hidrofóbica. Acredita-se que essa barreira impermeável possa afetar a captação de nutrientes e saída de metabólitos. Assim, para compensar esse obstáculo, pequenos poros denominados porinas permitiriam a difusão de

moléculas hidrofílicas, inclusive de antibióticos (SCIOR et al., 2002).

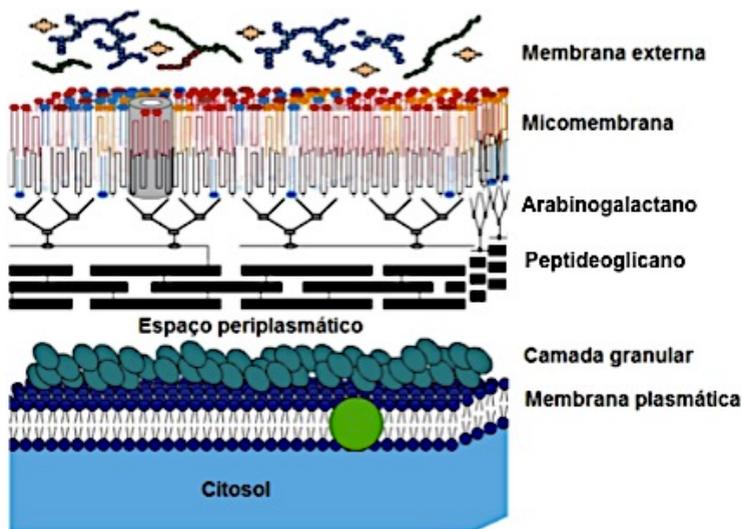


Figura 2. Modelo proposto da parede celular micobacteriana. A camada externa é composta de proteínas e glucanos (polissacarídeos de glucose), com uma pequena porção lipídica. A micomembrana corresponde ao arranjo de ácidos micólicos, arabinogalactanos e peptideoglicanos. A camada granular sobre a membrana plasmática é composta de proteínas que conferem aparência mais robusta à porção externa da membrana plasmática. Adaptado de MARRAKCHI et al., 2014.

Durante o crescimento *in vivo*, mudanças substanciais ocorrem na parede celular de Mtb. A proliferação ativa durante a infecção e o uso de fontes de carbono do hospedeiro durante o crescimento em macrófagos levam a um aumento na produção de ácidos micólicos e lipídeos que promovem a sobrevivência no hospedeiro (GRIFFIN et al., 2012; LEE et al., 2013). Além disso, durante o crescimento lento e em estados não-replicativos, a

parede celular torna-se mais grossa, provavelmente pela síntese de múltiplas camadas de parede celular (JAIN et al., 2007), restringindo o trânsito de moléculas tóxicas (como antibióticos) através da membrana e absorvendo radicais oxidativos e tóxicos (DUBNAU et al., 2000). Ainda mais, em meios de hipóxia o Mtb diminui a produção de ácidos micólicos e aumenta as forças de ligação entre as moléculas de peptidoglicanos, provocando rigidez da parede, sobrevivência bacteriana e, conseqüentemente, escape do reconhecimento imune do hospedeiro (GUPTA et al., 2010). Dessa forma, percebe-se que os elementos que compõem a membrana da bactéria são importantes para a sobrevivência e patogênese de Mtb. No entanto, sua estrutura celular não difere muito de outras bactérias não patogênicas, como *M. phlei* e *M. smegmatis* (COLE et al., 1998), sugerindo que ela não é fator exclusivo da patogenicidade da bactéria.

1.3 Aspectos gerais da resposta imune do hospedeiro: formação do granuloma

A TB é uma doença transmitida quase exclusivamente por gotículas contendo o bacilo, geradas pela tosse de pessoas infectadas e inaladas por pessoas não infectadas (GLICKMAN e JACOBS, 2001), demonstrando a facilidade de disseminação da doença. Os bacilos liberados são exalados dos pulmões infectados para o ar, sendo capazes de permanecer em suspensão por horas. Experimentos em modelos animais demonstraram que partículas em suspensão contendo de 1 a 10

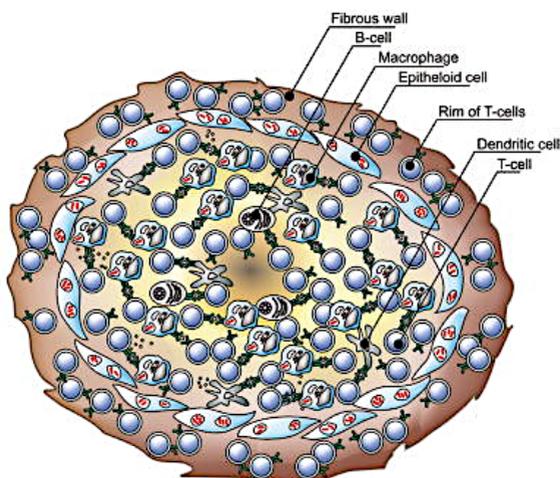
bacilos são suficientes para causar a infecção (BLOOM e MURRAY, 1992). O patógeno age intracelularmente, inicialmente em macrófagos alveolares (LEE et al., 1996), mas já se sabe que ele infecta diversos subtipos de fagócitos mononucleares, como monócitos, macrófagos intersticiais, células dendríticas e neutrófilos (TAILLEUX et al., 2003; ERUSLANOV et al., 2005; WOLF et al., 2007). Embora seja possível observar a formação de um fagossomo circundando o bacilo após sua entrada na célula (ARMSTRONG e HART, 1971), foi demonstrado que cepas virulentas de *Mtb* são capazes de impedir a fusão destas vesículas com lisossomos, o que previne a sua acidificação e, conseqüentemente, leva à persistência bacteriana no meio intracelular (STURGILL-KOSZYCKI et al., 1994; VERGNE et al., 2005). Existem outros mecanismos de escape que possibilitam a permanência do bacilo no hospedeiro, como a inibição de MHC II reduzindo a apresentação de antígenos e a ativação de células T (NOSS, HARDING e BOOM, 2000); ainda, a ativação atenuada de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) após o reconhecimento de antígenos bacterianos, comprometendo as respostas contra o patógeno (TOBIAN et al., 2003; FORTUNE et al., 2004; KIEMER et al., 2009).

Após a infecção, os bacilos inalados são ingeridos por macrófagos alveolares e células dendríticas, iniciando uma potente resposta imune. Uma vez ativadas, as células dendríticas migram para os linfonodos locais para iniciar a apresentação de antígenos para células T (ITANO et al., 2003). Esses linfócitos primados retornam ao local da infecção atraídos

por quimiocinas liberadas por macrófagos alveolares, células dendríticas e células epiteliais, que serão posteriormente circundadas por linfócitos, formando a estrutura celular característica da doença denominada granuloma (Figura 3A). Essa resposta celular contém a infecção e determina o fim do período de intensa replicação bacteriana (GUIRADO e SCHLESINGER, 2003; ULRICH e KAUFMANN, 2006; SHALER et al., 2013).

Conforme o granuloma amadurece, ele desenvolve uma cápsula fibrosa externa que reveste as células infectadas e mantém a infecção em estado latente/dormente, sendo denominado granuloma fibrótico. Se mantido nessa forma, a infecção pode manter-se por anos e não surgem sintomas clínicos. No entanto, 10% das pessoas com a forma latente podem progredir para o estado ativo da doença, no qual o centro do granuloma fibrótico liquefaz, as bactérias tornam a replicar-se intensamente, causando necrose nas células que o compõem e liberando milhares de bactérias viáveis nas vias aéreas, completando o ciclo de infecção da bactéria no hospedeiro, estado denominado granuloma caseoso e que caracteriza a fase ativa da doença (FLYNN e CHAN, 2003; ULRICH e KAUFMANN, 2006; SAUNDERS e BRITTON, 2007) (Figura 3B).

A



B

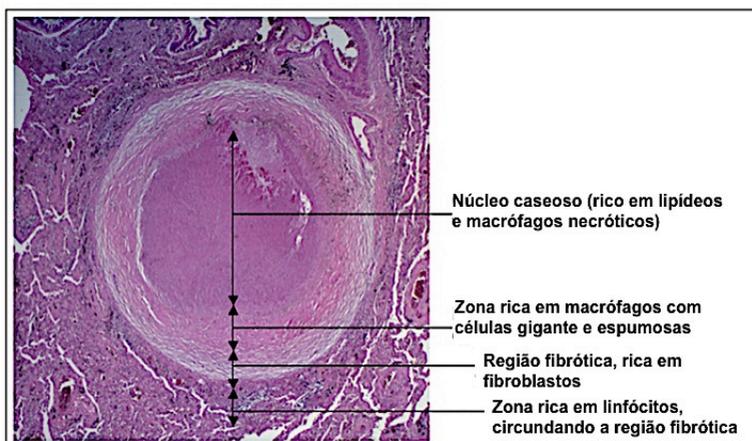


Figura 3. Estrutura do granuloma. (A) Esquema ilustrativo da estrutura e constituintes celulares do granuloma de tuberculose. O granuloma é composto basicamente de um agregado organizado de células como macrófagos, células gigantes multinucleadas, macrófagos epitelioides, células espumosas (macrófagos diferenciados ricos em lipídeos), neutrófilos, células dendríticas, células T e B, células *natural killer* e fibroblastos. (GENGENBACHER e KAUFMANN, 2012). (B) Imagem de corte histológico de granuloma pulmonar humano. O centro

do granuloma caseoso é rico em lipídeos e circundado por uma camada de macrófagos necróticos, gigantes e espumosos. Essa estrutura é circundada por cápsula fibrótica e outras proteínas. Os linfócitos tendem a ficar na periferia do granuloma. (Adaptado de RUSSELL et al., 2010).

O granuloma tem sido considerado um mecanismo de defesa do hospedeiro formado para conter a micobactéria em uma área localizada e restrita, prevenindo a propagação bacteriana para tecidos saudáveis e outros órgãos (revisado em ADAMS, 1976; GUIRADO e SCHLESINGER, 2003; EGEN et al., 2008). A completa erradicação da bactéria não ocorre porque a micobactéria desenvolveu estratégias para escapar da resposta imune e persistir no granuloma em estado latente por décadas enquanto o fluxo contínuo de leucócitos mantém essa estrutura (SANDOR et al., 2003). De fato, um particular aspecto da patogenicidade da bactéria é a capacidade de existir em estado dormente, o que contribui para o longo período de tratamento e também representa um obstáculo para a eficiência de antibióticos (COLE et al., 1998).

Se a imunidade do hospedeiro enfraquece e/ou é suprimida (por infecção com HIV, diabetes, câncer, desnutrição, envelhecimento ou fatores genéticos) (YOSHIKAWA, 1992; TURNER et al., 2003) a bactéria dormente pode ser reativada, voltar a se multiplicar, formando lesões teciduais e disseminando-se para outras áreas (TUFARIELLO et al., 2003). No entanto, o estado metabólico e replicativo da bactéria nas lesões granulomatosas de pessoas assintomáticas permanece um ponto controverso. Apesar da formação do granuloma

parecer ser um processo dirigido pelo hospedeiro para conter a infecção, estudos têm mostrado que essa estrutura celular contribui para o crescimento inicial da bactéria e que cepas patogênicas usam o granuloma como um local de expansão e disseminação sistêmica (BALASUBRAMANIAN et al., 1994; DAVIS e RAMAKRISHNAN, 2009).

Diante desse cenário, a produção de citocinas e quimiocinas é elemento essencial na resposta imune inicial contra a infecção e nas etapas iniciais de formação do granuloma (ALGOOD et al., 2003). Após a internalização da micobactéria, macrófagos ativados secretam IL-8, potente quimioatraente de linfócitos T que circundarão a estrutura (ORME e COOPER, 1999). Os linfócitos ativados e recrutados produzem interferon (IFN)- γ , que por sua vez ativam os macrófagos que são recrutados ao local da infecção (LAZAREVIC et al., 2005).

Outra importante citocina envolvida na infecção por Mtb é o fator de necrose tumoral (TNF, do inglês '*tumor necrosis factor*'). Foi demonstrado que o TNF advindo de células hematopoiéticas é essencial para o controle da infecção por BCG (JACOBS et al., 2000). Além disso, experimentos de transferência celular sugerem que o TNF de células T é essencial para a defesa contra Mtb (SAUNDERS, BRISCOE e BRITTON, 2004). O TNF produzido por macrófagos infectados tem importante papel no acúmulo e diferenciação de macrófagos em células epitelióides de grande poder bactericida presente nos granulomas (BOURIGAULT et al., 2013), apoptose (KEANE et

al., 1997; KEANE et al., 2002), expressão de quimiocinas (SAUNDERS et al., 1999; ALGOOD et al., 2004) e de moléculas de adesão (LOPEZ RAMÍREZ et al., 1994; SCHREIBER et al., 2006).

Já foi demonstrado que a utilização de agentes anti-TNF, comum no tratamento de algumas doenças inflamatórias (FELDMANN e MAINI, 2001), está correlacionada com a reativação de TB latente (KEANE et al., 2001; WALLIS, 2005). Foi demonstrado, por exemplo, que a neutralização de TNF leva a exacerbação da infecção primária e reativação de TB latente com aumento na carga bacteriana, patologia e disseminação extrapulmonar em modelo de infecção em macacos (LIN et al., 2010). Além disso, os autores mostraram que a estrutura granulomatosa manteve-se similar entre animais com TB ativa e tratados com anti-TNF. Esses dados corroboram um modelo de granuloma (composto de um agregado de macrófagos infectados) em zebrafish e infecção com *M. marinum*, no qual a formação dessa estrutura manteve-se normal na ausência de TNF apesar do aumento no crescimento bacteriano, sugerindo que a formação inicial dessa estrutura é independente da sinalização por TNF (CLAY et al., 2008). Tais resultados vão contra o principal papel atribuído ao TNF, de formação e manutenção da estrutura do granuloma, mas reforçam que o papel primário dessa citocina é de ativação de macrófagos e estímulo à produção de quimiocinas (RAY et al., 2009).

No entanto, alguns estudos *in vitro* mostraram que essa citocina possui papéis distintos e contraditórios na patogênese

micobacteriana. Engele e colaboradores (2002) demonstraram que o TNF produzido por macrófagos alveolares humanos infectados com Mtb é prejudicial aos indivíduos infectados por contribuir na imunopatologia da TB (BEUTLER et al., 1985; ROOK et al., 1987; BEKKER et al., 1998) e também apoia diretamente a sobrevivência intracelular do patógeno. A infecção de macrófagos com cepas virulentas libera produtos bacterianos, que por sua vez ativam outras células para perpetuar a produção de TNF. Essa cadeia de eventos permitiria a proliferação acelerada de bacilos e poderia servir como mecanismo de evasão para o Mtb (ENGELE et al., 2002). No entanto, durante o curso da infecção *in vivo* células T são atraídas e ativadas por células apresentadoras de antígenos (APCs) (células dendríticas, linfócitos B e macrófagos) e contribuem para a resposta protetora, seja pela produção de citocinas (SCHAIBLE et al., 1999) ou moléculas antibacterianas como granulinas (STENGER et al., 1998), contrabalanceando o estado favorável de crescimento dos macrófagos alveolares. Dessa forma, torna-se ainda mais evidente a necessidade de investigarmos os eventos que permeiam o curso da infecção por Mtb num contexto celular amplo e não apenas limitado à conclusões por observação em único tipo celular.

Outra citocina produzida por macrófagos é a interleucina (IL)-1 β . Estudos *in vivo* utilizando animais IL-1 α/β , IL-1R e IL-18 nocautes mostraram que essas citocinas possuem um papel em limitar a carga bacteriana, regular outras citocinas, produzir óxido nítrico e formar granulomas organizados (SUGAWARA et al.,

1999; 2001; JUFFERMANS et al., 2000). A atividade biológica da IL-1 β é altamente regulada por expressão gênica, ativação pós-transcricional por clivagem proteolítica e competição com antagonistas de receptores solúveis (DINARELLO, 2009). Apesar da produção *in vitro* de IL-1 β por macrófagos geralmente precisar de sinalização por receptores do tipo toll (TLR) e da plataforma proteica inflamassoma/caspase-1, a produção de IL-1 β durante a resposta inicial à infecção parece ser independente desses dois fatores (DINARELLO, 2009; MAYER-BARBER et al., 2010). Foi descrito recentemente a atividade antimicrobiana da IL-1 β em macrófagos murinos e humanos através do aumento da produção de TNF e da expressão de seus receptores e ativação de caspase-3 (JAYARAMAN et al., 2013).

Além de citocinas pró-inflamatórias, células apresentadoras de antígenos (APCs, do inglês '*antigen presenting cells*') e linfócitos podem produzir IL-10, que regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias através da inibição do processo de apresentação de antígeno por macrófagos e células dendríticas. Sob sua atividade, a eliminação de bactérias intracelulares por macrófagos é afetada, uma vez que a produção de óxido nítrico (NO, do inglês '*nitric oxide*') e TNF é impedida (BOGDAN, VODOVOTZ e NATHAN, 1991; SARAIVA e O'GARRA, 2010).

Durante a infecção por Mtb, diversos PRRs estão envolvidos na sinalização via APCs, levando à produção de citocinas e estímulo da imunidade adaptativa. Nesse contexto, foi demonstrado que receptores do tipo toll (TLR), especificamente

TLR2, TLR4 e TLR9, possuem papel no reconhecimento de antígenos micobacterianos *in vivo*, interferindo na resposta imune à Mtb (MEANS et al., 1999; ABEL et al., 2002; BAFICA et al., 2005).

O TLR2 pode formar heterodímeros com TLR1 e TLR6. Esses heterodímeros estão envolvidos no reconhecimento de glicolipídeos da parede celular micobacteriana, como lipoarabinomanana, lipomanana, glicoproteínas micobacterianas de 38 e 19 kDa, entre outros (PICARD et al., 2003; BULUT et al., 2005). Acredita-se que o TLR2 seja importante para o início da resposta imune inata contra Mtb (BULUT et al., 2005). Além disso, animais TLR2^{-/-} apresentam comprometimento na formação do granuloma, grande suscetibilidade à infecção e são incapazes de controlar a infecção crônica por Mtb (POMPEI et al., 2007). Camundongos nocaute para TLR9 também morrem mais rapidamente à infecção por Mtb (BULUT et al., 2005; KLEINNIJENHUIS et al., 2009). De fato, foi demonstrado que esses receptores cooperam entre si no controle micobacteriano. Camundongos TLR2/9^{-/-} apresentam maior suscetibilidade à infecção quando comparado aos animais nocaute para apenas um dos receptores, além de terem diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e nas respostas *recall ex vivo* de IFN- γ e patologia pulmonar alterada (BAFICA et al., 2005).

Estudos demonstraram que o TLR4 é essencial para a sobrevivência contra infecções micobacterianas (REILING et al., 2002) e sua importância pode depender da dose de estímulo (KAMATH et al., 2003) e ainda da cepa utilizada (KRUTZIK et al.,

2003). Estudos em humanos mostraram que polimorfismos em TLR2 e TLR4 estão associados ao aumento da suscetibilidade à infecções microbianas possivelmente por mudanças na resposta Th1/Th2 (ALEXOPOULOU et al., 2002; KANG et al., 2002).

Outros PRRs também foram descritos por seu papel no reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados à patógenos) micobacterianos, como os receptores de lectinas do tipo C (CLRs) (NIGOU et al., 2001; ROTHFUCHS et al., 2007), o receptor de manose (SCHLESINGER, et al., 1996) e DC-SIGN (GEIJTENBEEK et al., 2003), receptores do tipo NOD (NLRs) (SCHAFER et al., 2009; TANNE et al., 2009; KLEINNIJENHUIS et al., 2011) e receptores *scavenger* (HAWKES et al., 2010). A atuação destas moléculas em conjunto determina a resistência do hospedeiro frente à infecção pelo bacilo e, além de promover a produção de citocinas e quimiocinas (RUSSELL, 2007; COOPER, MAYER-BARBER e SHER, 2011; BAFICA et al., 2005; FABRI et al., 2011), são essenciais para a ativação de células T (MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997; SCANGA et al., 2004; DIVANGAHI et al., 2008; COURT et al., 2010).

Além disso, apesar da resposta inata do hospedeiro ser crítica para a defesa inicial contra a bactéria, a resposta adaptativa é fundamentalmente necessária para a contenção da infecção na fase crônica da doença. A resposta adaptativa é caracterizada pelo aparecimento de células T CD4 antígeno-específicas que secretam IFN- γ , responsável por ativar macrófagos para matar a bactéria intracelular (SRIVASTAVA e

ERNST, 2013) induzindo a maturação de endossomos (RUSSELL et al., 2010), bem como a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ambos importantes mecanismos bactericidas (HERBST *et al.*, 2011).

Células T CD8 também são importantes para o controle da infecção na fase crônica, ativando macrófagos e/ou secretando produtos que matam diretamente o Mtb (NORTH e JUNG, 2004). Estudos demonstraram que a mensuração da frequência de células T CD4 e CD8 que produzem TNF e/ou IFN- γ pode servir de marcador para a fase ativa da doença (HARARI et al., 2011; POLLOCK et al., 2013).

Ainda mais, antígenos lipídicos de Mtb podem ser processados e apresentados a células T não convencionais, como as células T- $\gamma\delta$ e células *natural killer*, mas seu papel na resposta imune a Mtb permanece não totalmente esclarecido (TANAKA et al., 1995; DE LIBERO et al., 2008). Foi demonstrado que células T- $\gamma\delta$ produzem TNF e IFN- γ em resposta a antígenos micobacterianos (CASSETTI e MARTINO, 2008) e que após a inoculação de BCG ocorre expansão celular, indicando desenvolvimento de resposta primária desse subtipo de células T. Além disso, a expansão manteve-se persistente após um segundo desafio com BCG meses depois, mostrando que a infecção micobacteriana primária é capaz de induzir a resposta de memória (SHEN et al., 2002).

Alguns estudos têm se concentrado no desenvolvimento de vacinas que aumentem as respostas celulares de células T (BEGUM et al., 2009; ELVANG et al., 2009; BALDWIN et al.,

2013) induzindo maior proteção contra Mtb. Além disso, novas drogas estão em desenvolvimento e sendo testadas com o intuito de aprimorar a quimioterapia da doença (GROSSET et al., 2012; ZUMLA et al., 2013; LING et al., 2015). Recentemente foi aprovado pela agência FDA (do inglês '*Food and Drug Administration*') o uso clínico da bedaquilina (US FDA, 2013), após um hiato de 40 anos desde a última aprovação para fármacos anti-TB.

O mecanismo de ação da bedaquilina deriva da inibição da bomba de prótons da enzima ATP sintase bacteriana, inibindo a síntese de ATP e, subsequentemente, levando à morte do bacilo (MATTEELLI, et al., 2010). No entanto, a elevada taxa de morte devido ao seu efeito inespecífico sobre a atividade elétrica cardíaca mantém a bedaquilina como última opção para pacientes com as formas resistentes da doença e sem outra alternativa disponível. Logo, ainda hoje não existem novas abordagens terapêuticas eficientes a ponto de substituir o tratamento utilizado atualmente.

1.4 Quimioterapia da TB: isoniazida

Embora um grande avanço tenha sido alcançado desde a implementação do Tratamento Diretamente Observado (DOT, do inglês '*direct observed therapy*') na década de 90, o controle da epidemia de TB é comprometido pela ausência de uma vacina efetiva, pelo surgimento de cepas resistentes às drogas usadas no tratamento e pela falta de métodos diagnósticos rápidos e

sensíveis (YOUNG et al., 2008; MCSHANE et al., 2012; WHO, 2014).

Atualmente, o regime terapêutico da doença tem uma duração de seis meses e é dividido em duas fases; a intensiva, para a eliminação de Mtb replicando ativamente, e a fase de manutenção, de forma a assegurar que bacilos persistentes sejam também atingidos. O tratamento é realizado através da administração em conjunto de etambutol, rifampicina, isoniazida (INH) e pirazinamida na forma de um único comprimido com doses fixas combinadas, o que simplifica o regime terapêutico, melhora a adesão, e conseqüentemente, diminui o risco de persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência (SIQUEIRA et al., 2010; WHO, 2014). No entanto, mesmo com todas as precauções ainda pode-se desenvolver casos de resistência medicamentosa. Estima-se que a TB multirresistente a drogas (MDR-TB, do inglês '*multi drug resistant tuberculosis*') represente 3,5% dos novos casos e 20,5% de casos reincidentes da doença (WHO, 2014). Além disso, cerca de 9% dos casos de MDR-TB são classificados como TB extensivamente resistente a drogas (XDR-TB, do inglês '*extensively drug resistant tuberculosis*') (WHO, 2014) .

Para casos de MDR-TB, aqueles com resistência a pelo menos dois fármacos de primeira linha (INH e rifampicina), utilizam-se fármacos de segunda linha, como tioamidas, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e peptídeos cíclicos, e para casos de XDR-TB, com resistência a pelo menos dois fármacos de primeira linha e três ou mais dos de segunda linha, utilizam-se

canamicina, capreomicina e amicacina (WHO, 2014). O período de tratamento dos casos de TB resistente pode chegar até a 2 anos, com eficiência do tratamento consideravelmente menor e com efeitos adversos aos fármacos ainda mais desgastantes (SHENOI et al., 2009).

Fatores complicadores do tratamento estão relacionados diretamente à biologia do patógeno. Isto se dá pela sua localização no meio intracelular, divisão lenta e à presença de uma parede celular que fornece uma barreira de permeabilidade eficiente para compostos nocivos, tornando o *Mtb* intrinsecamente resistente a várias drogas (NIKAIDO, 1994; BRENNAN e NIKAIDO, 1995; NGUYEN e PIETERS, 2009).

Um dos fármacos pioneiros na terapia da TB é a isoniazida (INH) (Figura 4A), cuja ação micobactericida foi descoberta em 1952 (BERSTEIN et al., 1952; FOX, 1952). Estudos demonstraram evidências sugerindo que o mecanismo de ação da INH era relacionado com a construção da parede celular (WINDER e COLLINS, 1970). O seu mecanismo de ação, elucidado décadas depois (TAKAYAMA et al., 1972) e aceito até hoje, é baseado na inibição da síntese de ácidos micólicos (ácidos graxos de cadeia longa), importante componente da parede bacteriana (WINDER e COLLINS, 1970; TAKAYAMA et al., 1972) (Figura 4B). Tal proposição foi baseada na perda da resistência álcool-ácido da bactéria, na facilidade de extração de compostos de alto peso molecular em bactérias tratadas com INH e na diminuição da natureza hidrofóbica coincidente à rápida diminuição de ácidos micólicos da fração

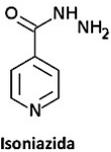
lipídica da bactéria (WINDER e COLLINS, 1970). Foi também proposto que a INH entra na bactéria por difusão passiva através da parede celular (BARDOU et al., 1998) e é ativa apenas contra bactérias em divisão, afirmação ainda controversa (MAGLIOZZO e MARCINKEVICIENE, 1996; GUMBO et al., 2007; AHMAD et al., 2009; WAKAMOTO et al., 2013; RAFFETSEDER et al., 2014). No entanto, considerando a estrutura molecular do fármaco, bem como a complexidade da parede bacteriana, deve ser revisto a sua forma de entrada na bactéria.

A INH precisa ser ativada pela enzima multifuncional catalase-peroxidase, KatG (ZHANG et al., 1992; HEYM et al., 1993) antes de se tornar ativa contra Mtb. A enzima catalase-peroxidase é uma proteína heme bifuncional pertencente à classe I da super família das peroxidases e exibe tanto atividade de catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \frac{1}{2} \text{O}_2$) quanto de peroxidase ($2 \text{AH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{A}^* + 2 \text{H}_2\text{O}$) (WELINDER, 1992). A catalase-peroxidase normalmente é necessária para catabolizar peróxidos exógenos gerados pelo estresse oxidativo do fagócito, ou peroxinitritos (ONOO^-) produzidos pela interação entre O_2^- e NO. Além disso, também é importante para detoxificar peróxidos endógenos gerados pela respiração bacteriana de substratos não fermentáveis como ácidos graxos, que de outra forma acumular-se-iam na bactéria levando-a à morte (MANCA et al., 1999; McKINNEY et al., 2000).

A ativação da INH pela KatG dá origem a espécies ativas como superóxidos, peróxidos, radicais hidroxil e espécies orgânicas reativas, como o radical isonicotinoil acil. Os radicais

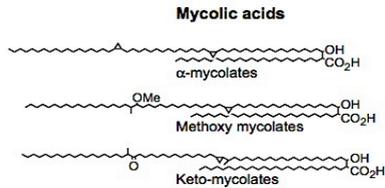
produzidos por essa ativação conjugam-se a moléculas de NAD^+ , formando o aducto INH-NAD (Figura 4C), que por sua vez inibe a InhA, uma enzima redutase envolvida no sistema de síntese de ácidos graxos II (FASII), que sintetiza ácidos micólicos (WILMING e JOHNSON, 1999) (Figura 4D). Essa reação resulta na inibição da síntese de ácidos micólicos, acúmulo de ácidos graxos de cadeia longa e, finalmente, na morte celular (TAKAYAMA et al., 1972). Ainda nesse contexto, a INH também parece induzir mudanças morfológicas estruturais na micobactéria, tais como perda da estrutura interna e o aparecimento de rugas e depressões na superfície bacteriana (BRIEGER et al., 1953; GUPTA et al., 1956; TAKAYAMA et al., 1973).

A



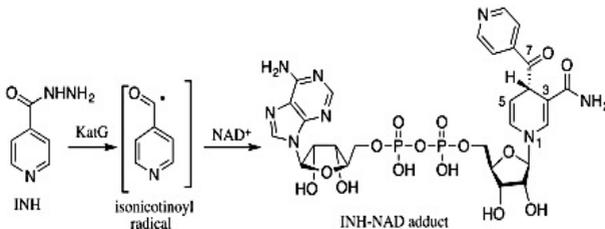
Isoniazida

B



(VILCHEZÉ e JACOBS, 2007)

C



(BERNARDES-GÉNISSON et al., 2013)

Nesse contexto, alguns estudos demonstraram que a falta de ácidos micólicos não parece ser um evento crucial para a sobrevivência da bactéria. Estudo de Liu e colaboradores (1999) mostrou que uma bactéria *M. smegmatis* deficiente na produção de ácidos micólicos era capaz de crescer de maneira semelhante à cepa *M. smegmatis* selvagem. Outro estudo com *M. avium* capaz de sobreviver a concentrações de INH que inibem a síntese de ácidos graxos (MDLULI, et al., 1998) sugere que, ao menos *in vitro*, a síntese da parede celular não é essencial para a viabilidade do patógeno. Vale ressaltar que condições *in vivo* podem requerer maior integridade celular e a síntese de componentes estruturais pode afetar diretamente a sobrevivência intracelular. Interessantemente, Takayama e colaboradores (1978) demonstraram que muitos efeitos do tratamento com INH, como a perda da viabilidade, poderiam ser mimetizados apenas através da diminuição da temperatura de incubação das culturas para 20°C. O perfil lipídico gerado entre as bactérias sob tratamento com INH e em culturas em menor temperatura era idêntico, sugerindo que a mesma etapa do complexo FASII estava sendo inibida. Assim, a causa da morte do organismo pode estar relacionada não apenas à produção da parede celular, mas também à desregulação de proteínas envolvidas nesse processo.

Ao longo dos anos, o uso inapropriado de fármacos tem progressivamente selecionado cepas resistentes aos antibióticos utilizados na quimioterapia da TB. Logo após a introdução de INH, os primeiros casos de resistência micobacteriana a esse

agente anti-tubercular foram descritos (MIDDLEBROOK, 1954), evidenciando defeitos na atividade da enzima catalase. Subsequentemente, a correlação inversa entre a concentração inibitória mínima (CIM) da INH e as atividades da enzima catalase-peroxidase foi demonstrada em uma gama de isolados de Mtb. Nos anos 90, quando o gene micobacteriano *katG* foi clonado, sequenciado e identificado, a relação dessa enzima com a ativação da INH foi confirmada (ZHANG et al., 1992).

A maior ocorrência de mutações responsáveis pela resistência à INH em isolados clínicos de Mtb ocorrem no gene *katG* e a mutação mais frequente é uma mutação pontual presente no códon 315, no qual uma serina é substituída por uma treonina (S315T) (MARTTILA et al., 1996; MUSSER et al., 1996). Mutações no gene *katG* resultam em aumento da CIM em até 200 vezes mais em cepas resistentes quando comparadas às sensíveis ao fármaco. A CIM da INH para cepas de Mtb encontra-se na faixa de 0,025 a 0,05 µg/ml. Para fins terapêuticos, a concentração sérica de 3 a 5 µg/ml após a administração de doses orais de 300 a 450 mg tem sido considerado o ideal para o tratamento de TB (PELOQUIN, 1996).

Vários estudos demonstraram que mutações nesse gene são responsáveis por cerca de 50-90% dos casos de resistência à INH entre as cepas MDR e XDR (HAZBÓN et al., 2006), enquanto a mutação S315T é a mais frequente, sendo encontrada em 40% de todas as cepas resistentes à INH (HAAS et al., 1997). Essa mutação resulta na incapacidade de ativação da INH, mas mantém níveis suficientes para detoxificação contra

radicais antibacterianos do hospedeiro (WEI et al., 2003). Estudos de cristalografia mostraram que o acesso ao canal heme encontra-se reduzido de 6 Å nas cepas sensíveis para 4,7 Å nas cepas S315T mutantes, impedindo que a INH alcance o sítio oxidativo da KatG. Além disso, Zhang e colaboradores (1993) mostraram que a introdução de um gene funcional de *katG* restaura a susceptibilidade à INH em isolados de *M. smegmatis* e *Mtb*, confirmando a participação da expressão de KatG na ação da INH.

A segunda mutação mais comum é encontrada no gene *inhA*, particularmente a substituição de cisteína por treonina na posição 15 (C15T) (GUO et al., 2006; ABE et al., 2008). Existem ainda mutações em outros genes (por exemplo *ndh*, *kasA* e *ahpC*) (VILCHÈZE e JACOBS, 2007) mas a correlação com resistência não é bem estabelecida. Ainda mais, as mutações aqui descritas não justificam todos os casos de resistência à INH. De fato, uma pequena parcela de cepas resistentes não apresenta mutação em nenhum dos genes citados (GUO et al., 2006; HAZBÓN et al., 2006), sugerindo que outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência à INH e que outros mecanismos de ação podem existir.

Outra explicação acerca da resistência à INH foi elucidada por Machado e colaboradores (2012), mostrando a relevância de bombas de efluxo da micobactéria, podendo expulsar a droga para o meio extracelular. Os autores também mostraram que a resistência induzida pela INH podia ser revertida por inibidores de efluxo, como verapamil. A análise de

sequências genômicas de fato mostrou que a micobactéria possui múltiplas bombas de efluxo. Esses resultados corroboram observações prévias de diferentes estudos demonstrando a rapidez da captação de INH por cepas sensíveis, enquanto cepas resistentes são deficientes nesse quesito, fazendo-nos supor que os baixos níveis de INH dentro da bactéria estejam associados à expressão de bombas de efluxo eficientes nessas cepas (BARCLAY et al., 1953; TSUKAMURA et al., 1963; WIMPENNEY, 1967).

Estudos demonstraram que a ação da INH poderia estar associada à formação de complexos de metais (CYMERMAN-CRAIG et al., 1955). Foi demonstrado que a INH possui alta afinidade por íons de cobre e sugerido que poderia agir no bacilo por restringir alguns metais necessários para o crescimento bacteriano (ALBERT, 1953). Uma vez que a INH pode interagir com cobre e ferro, Colemann (1954) também sugeriu que o fármaco poderia funcionar como um inibidor de metaloproteínas. No entanto, como esse mecanismo não foi específico para micobactérias ou para a INH, ele não poderia explicar a seletividade da INH por Mtb (ALBERT, 1953; MUAKKASSAH et al., 1981), nem o fato de que isômeros de hidrazida de ácido nicotínico e de ácido benzóico, ambos bons quelantes de metais, não possuem atividade micobactericida potente como a INH (BERNARDES-GÉNISSON et al., 2013).

Por outro lado, foi também observado que a ação desse fármaco contra Mtb *in vivo* estava aumentada na presença de cobre (SORKIN et al., 1952; YOUATT, 1962). Assim, sugeriu-se

na época, que a INH transportaria íons cobre para dentro da bactéria e que o aumento na concentração desse íon contribuiria para a sua atividade bactericida. À luz do que se sabe atualmente, pode-se hipotetizar que a interação de cobre com INH facilita a oxidação de INH para sua forma ativa. Tal fato explicaria porque o cobre aumenta a sensibilidade de cepas resistentes à INH e também sugere formas alternativas de ativação desse fármaco, independente de KatG micobacteriana.

Nesse contexto, foi demonstrado recentemente que enzimas do hospedeiro, também poderiam converter a INH para sua forma ativa (LI et al., 2011; MAHAPATRA et al., 2011), produzindo os mesmos metabólitos necessários para a inibição de ácidos micólicos. Dessa forma, assim como o sistema imune do hospedeiro é capaz de conter a infecção (fato corroborado pela estimativa de milhões de portadores com a forma latente da doença), a ativação enzimática via hospedeiro também poderia contribuir para a melhora da eficiência da INH, validando a atividade bactericida inicial descrita para INH (DONALD et al., 1997; SIRGEL et al., 2001).

Outra maneira pela qual o sistema imune poderia ser afetado pelo tratamento com antibióticos e estar relacionado com a atividade bactericida dos fármacos antituberculose foi proposto por Kim e colaboradores (2012). O tratamento com INH e pirazinamida, induziram a produção bacteriana de espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo para a indução de autofagia, um processo de controle de infecções intracelulares que leva constituintes citoplasmáticos para degradação

lisossomal (YOSHIMORI e NODA, 2008). Além disso, o processo de autofagia parece ser essencial para o efeito de *killing* promovido por esses fármacos, pois o uso de inibidores de autofagia reduz a capacidade bactericida dos fármacos e aumenta a produção de TNF, IL-1 β e IL-6 induzida pela combinação infecção-tratamento, sugerindo um papel modulatório negativo para a autofagia nas respostas inflamatórias induzidas por Mtb em macrófagos.

Algumas das conclusões mais aceitas até hoje com relação à eficácia de compostos antituberculose foram feitas há mais de 3 décadas (JINDANI et al., 1980). Os autores demonstraram que durante a terapia, a diminuição da carga bacilar no escarro de pacientes era bifásica. A primeira fase, mediada pela INH, é caracterizada pela rápida diminuição bacilar durante os 2 primeiros dias de terapia. A segunda fase, mediada pela rifampicina e pirazinamida é muito mais lenta, com redução bacilar entre os dias 3 e 14. A conclusão era que a INH possui eficiente atividade bactericida inicial (ABI) e seria responsável pela diminuição dos bacilos de crescimento acelerado.

No entanto, vários trabalhos refutam a constatação da limitação da ação da INH apenas em bactérias metabolicamente ativas. A falha da INH pode ser decorrente de vários fatores, como a ausência de oxigênio, afetando diretamente a eficácia da INH em ambientes de hipóxia (MAGLIOZZO e MARCINKEVICIENE, 1996), a morte de cepas sensíveis e emergência de cepas resistentes ao fármaco (GUMBO et al., 2007) ou seleção de cepas fenotipicamente tolerantes (AHMAD

et al., 2009; WAKAMOTO et al., 2013). Ainda, recentemente Raffetseder e colaboradores (2014) demonstraram que a morte bacteriana promovida pela INH não é dependente das taxas de replicação do bacilo, mostrando que uma população de macrófagos pode balancear o crescimento e a morte do patógeno metabolicamente ativo, sem gerar um aumento na carga bacteriana final, induzindo ao pressuposto de ineficiência da droga.

Vários estudos clínicos corroboraram a observação da eficiente ABI da INH, mostrando que o fármaco é capaz de reduzir em 90% a carga bacteriana presente no escarro de pacientes com apenas 2 dias de tratamento (SIRGEL, 2000; GILLESPIE et al., 2005; JOHNSON et al., 2006; KARAKOUSIS et al., 2008; GROSSET et al., 2012).

No entanto, dados da literatura já demonstraram que a INH alcança baixos níveis plasmáticos em pacientes, ainda que sob regime terapêutico controlado (TAPPERO et al., 2005; CHIDEYA et al., 2009; BURHAN et al., 2013). Além disso, estudo de Kjellsson e colaboradores (2011) utilizando modelo de farmacocinética em coelhos, demonstrou que a INH apresenta baixo coeficiente de penetração em pulmões saudáveis e lesões granulomatosas, alcançando concentrações aquém da necessária para o efeito bactericida da INH *in vitro*. Existem estudos publicados indicando que a concentração das drogas nesses locais pode ser substancialmente menor que a concentração plasmática e também ser diferente para cada tipo

de fármaco (BARCLAY et al., 1953; KISLITSYNA, 1985; BALDWIN et al., 1990; MURDOCH e PETERSON, 1991).

Dessa forma, essas observações **nos fizeram questionar como a INH pode apresentar uma ABI tão eficiente, alcançando concentrações que modelos *in vitro* demonstraram ser incapazes de proporcionar esse efeito bactericida.** Portanto, é possível que na TB, a interação entre as células do granuloma, o patógeno Mtb e o fármaco seja importante para a resolução da doença, aumentando a eficiência da droga e influenciando a manutenção de uma resposta imunoprotetora. Assim, **a hipótese do presente estudo é a de que a ação imediata da INH é dependente do sinergismo entre células do granuloma, permitindo a sua atuação mesmo em baixas concentrações intracelulares.** Neste trabalho investigamos o mecanismo de ação da INH nas etapas iniciais de tratamento em modelo de granuloma humano que mimetiza a fase ativa da infecção.

2 Objetivos

2.1 Geral

Avaliar a ação micobactericida imediata da isoniazida em sinergismo com as células do sistema imune, durante as fases iniciais de tratamento, no modelo *in vitro* de granuloma humano.

2.2 Específicos

- caracterizar perfis microbiológicos e imunológicos do modelo de granuloma humano *in vitro*;
- investigar as populações celulares (monócitos/macrófagos, linfócitos, células dendríticas, neutrófilos, etc) que podem estar alteradas nesse sistema;
- identificar os mediadores (citocinas como IL-1 β , TNF, IL-6, IL-8, entre outras) envolvidos no controle da infecção via INH no granuloma.

3 Metodologia Experimental

3.1 Animais de experimentação e considerações éticas

Camundongos machos e fêmeas, da linhagem C57BL/6, com idade entre 6 e 8 semanas, foram utilizados para obtenção de medula óssea e diferenciação em macrófagos. Os animais foram alimentados em regime *ad libitum* e mantidos no Biotério Setorial do MIP em ciclo claro/escuro de 12h a temperatura de 22°C ± 2. O uso de animais neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob o protocolo PP00880.

3.2 Amostra de sangue humano e considerações éticas

O sangue periférico de doadores saudáveis foi utilizado para obtenção de leucócitos totais ou células mononucleares. Doadores entre 20 e 40 anos foram recrutados para o estudo. Nenhum dos participantes tinha histórico médico de doença significativa e nenhum havia feito uso de medicamentos até 2 semanas antes da coleta do sangue. O protocolo para utilização de amostras de sangue humano foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos 283/08.

3.3 Cultivo Celular

3.3.1 Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (MMO)

Camundongos C57/BL6 foram eutanasiados através de deslocamento cervical e tiveram seus membros posteriores

dissecados para o isolamento do fêmur e da tíbia em câmara de fluxo laminar. Para evitar o ressecamento, os ossos foram mantidos em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Invitrogen) até o momento da sua lavagem. De maneira asséptica, as epífises dos ossos foram cortadas com uma lâmina de bisturi e, usando uma seringa com agulha de insulina, o interior do osso foi lavado com meio DMEM para coleta de medula óssea.

A suspensão de células obtida foi centrifugada a 453 x g, o sobrenadante foi descartado e as células foram suspensas em DMEM (Gibco) suplementado com 20% de sobrenadante de L929, 10% de soro bovino fetal (SBF) (Hyclone), 1% de piruvato de sódio 1 mM (Sigma), 2,5% de HEPES 25 mM (Gibco), 1% de L-glutamina 2 mM (Gibco) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). O volume de meio usado foi determinado de forma a se obter uma suspensão em 36 ml por animal usado e as células foram plaqueadas em duas placas de seis poços, resultando em 3 ml da suspensão por poço. As placas foram mantidas durante cinco dias em incubadora a 37°C, 5% de CO₂. No quinto dia, adicionou-se 2 ml de meio DMEM suplementado a cada poço e as placas foram devolvidas à incubadora, onde ficaram até o sétimo dia de cultivo.

Após sete dias em cultura, os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) para retirada de células não aderentes. As células aderentes, agora macrófagos diferenciados, foram removidas através do uso de Tripsina/ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) 0,05% (Invitrogen) e

jateamento vigoroso da monocamada com micropipeta de 1 ml. Estas células foram coletadas e transferidas para um tubo falcon de 50 ml, onde se adicionou DMEM com 10% de SBF a fim de inativar a tripsina. A suspensão foi centrifugada a 453 x g, o sobrenadante descartado e as células foram ressuspensas em 5 ml de DMEM suplementado com SBF, piruvato de sódio, HEPES e L-glutamina nas mesmas concentrações mencionadas anteriormente. As células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer com o uso de Azul de Tripán (Invitrogen) e a concentração foi ajustada de acordo com o experimento.

3.3.2 Obtenção de leucócitos totais a partir de sangue periférico humano

Sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado em tubos de coleta de sangue heparinizados (BD Vacutainer) com o auxílio de agulha vacutainer (BD Vacutainer PrecisionGlide 21Gx1" (0,8 x 25 mm)).

O volume de sangue foi transferido para falcons de 50 ml, diluído na razão de 1:1 em tampão de lise de hemácias (4,01 g de cloreto de amônio (Sigma), 0,18 g de EDTA (Amresco), 0,42 g de bicarbonato de sódio (Sigma) e 500 ml de água Milli-Q, solução filtrada em membrana 0,22 µm) e homogeneizado por 10 minutos. A solução foi centrifugada a 453 x g à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com auxílio de uma pipeta de 25 ml e o pellet de células foi novamente diluído em 40 ml de tampão de lise de hemácias e centrifugado.

Essa etapa foi repetida até a obtenção de pellet celular branco, indicativo de ausência de hemácias e não mais do que 3 vezes.

O pellet foi lavado em 40 ml de PBS e centrifugado a 453 x g. Depois, o pellet foi diluído em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco) com 10% SBF e o número de células viáveis foi contado em câmara de Neubauer com Azul de Tripán para posterior diluição na concentração desejada.

3.3.3 Obtenção de células mononucleares de sangue periférico humano

O sangue periférico de doadores saudáveis foi coletado em tubos de coleta de sangue heparinizados (BD Vacutainer) com o auxílio de agulha vacutainer (BD Vacutainer PrecisionGlide 21Gx1" (0,8 x 25 mm)).

As células mononucleares (PBMC) foram obtidas a partir de separação por gradiente de Ficoll, como descrito por Boyum (1968).

Brevemente, o sangue periférico coletado em tubos vacutainer heparinizados foi diluído em salina (razão 1:1) e à essa solução foi adicionado o Ficoll (GE Healthcare) a temperatura ambiente em baixa velocidade (15 ml de Ficoll a 35 ml de solução sangue-salina) com auxílio de pipetador automático para que eles não se misturem. Centrifugou-se a solução a 453 x g por 40 minutos, sem freio ou aceleração. Com uma pipeta Pasteur, recolheu-se o anel de células contendo o PBMC.

As células foram lavadas com PBS por 3 vezes, com centrifugações de 10 minutos a 453 x g. A seguir, as células foram ressuspensas em meio RPMI (Gibco) com 10% SBF (Hyclone), 2,5% de HEPES (Gibco), 1% de L-glutamina (Gibco), 1% de piruvato de sódio (Sigma) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco) para contagem em câmara de Neubauer.

3.3.4 Cultivo de Mtb H37Rv e cepas clínicas resistentes

Todos os procedimentos envolvendo Mtb foram realizados em fluxo laminar com nível de biossegurança 3 (BS3), utilizando como proteção individual máscaras N-95 (3M), luvas, toucas, propés e jalecos descartáveis.

As culturas de Mtb foram mantidas através de repiques semanais a partir de amostras congeladas da cepa laboratorial H37Rv e cepas clínicas resistentes à isoniazida 255R e 267R, contendo mutações nos genes *katG* e *inhA* (gentilmente cedidas pela Sra. Darcita Rovaris/LACEN-SC). As amostras foram diluídas dez vezes em PBS e 50 µl da suspensão de cada bactéria foram adicionados ao meio sólido Löwestein-Jensen (LJ – Laborclin). As culturas foram mantidas em incubadora a 37°C e usadas após 4-6 semanas de crescimento.

3.4 Preparação das suspensões bacterianas para infecção

Uma vez obtido o crescimento bacteriano, as colônias foram raspadas do meio sólido e transferidas para um tubo

contendo pérolas de vidro, que foi agitado em vórtex para a dissociação de agregados. Adicionou-se 1 ml de PBS ao tubo e ele foi novamente agitado em vórtex para obtenção da suspensão bacteriana. A suspensão foi recuperada e transferida para um novo tubo e a concentração de bactérias foi ajustada pela comparação entre a turbidez da suspensão e a turbidez do tubo n°1 da escala de McFarland, equivalente a 3×10^8 bactérias/ml. As escalas obtidas para cada experimento foram diluídas na ordem 10^{-6} e 100 μ l da suspensão foram plaqueados em meio ágar Middlebrook 7H10 (BD Biosciences) enriquecido com 10% OADC para confirmação da concentração de bactérias. Este procedimento é descrito em detalhe na seção 3.5.

3.5 Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC)

Os poços contendo bactérias foram diluídos em saponina 1% e jateados vigorosamente com o auxílio de uma pipeta para a liberação total de bactérias intracelulares. Após diluição seriada de ordem 10 da suspensão bacteriana, 50 μ l foram plaqueados em placas de Petri contendo meio ágar 7H10 (BD) enriquecido com 10% OADC estéril (albumina bovina fração V 10 g (Inlab), dextrose 4 g (Sigma), catalase 0,008 g (Sigma), cloreto de sódio 1,7 g, ácido oleico 0,1 g (Sigma), água Milli-Q qsp 200 ml). As placas foram vedadas e mantidas a 37°C até o momento de contagem das colônias, 30 a 40 dias após o plaqueamento. Após o período de crescimento as colônias foram contadas e o número de UFC/ml foi determinado multiplicando o valor obtido pelo fator de diluição e corrigido de acordo com o volume plaqueado.

3.6 Formação do granuloma humano

O seguinte protocolo foi adaptado de modelos utilizados por Seitzer et al. (2003), Puissegur et al. (2004) e Birkness et al. (2007). Após a contagem dos leucócitos totais do sangue periférico de doadores saudáveis (descrito na seção 3.3.2), realizou-se a diluição das células para a concentração de 6×10^6 células/ml em meio RPMI + 10% SBF. Plaqueou-se 100 μ l dessa solução em placas de 96 poços de fundo chato. Os poços dessas placas haviam sido previamente cobertos com 60-70 μ l da solução agarose + RPMI 1,5% estéril. A infecção com Mtb foi realizada com 100 μ l de solução bacteriana na concentração adequada de acordo com os MOIs requeridos (seção 3.4) e a placa foi mantida em incubadora a 5% de CO₂, 37°C. Os tratamentos com INH foram feitos nos dias 4 e 5 pós infecção com volumes de 10 μ l por poço de INH na concentração desejada.

3.7 Coinfecção de granulomas com cepas sensível e resistente à INH

Os leucócitos dos doadores foram obtidos conforme descrito em 3.3.2 e o granuloma como em 3.6. As células foram infectadas no MOI de 10 de uma solução bacteriana contendo proporção 1:1 de cepa sensível de Mtb H37Rv e cepa resistente à INH 255R. A fim de distinguirmos as bactérias crescidas no meio sólido 7H10, foi adicionado antibiótico INH nas placas com

o meio ainda líquido de modo que a concentração final fosse 10 μM . As placas com antibiótico promoveram a seleção da cepa resistente à INH 255R, impedindo o crescimento da cepa sensível H37Rv. Os granulomas infectados foram tratados com INH nas concentrações de 3, 30 e 100 μM nos dias 4 e 5. No dia 6 pós infecção, as células foram lisadas, plaqueadas em placas de 7H10 com e sem antibiótico e mantidas em incubadora a 37°C por 30-40 dias até a contagem de UFCs. No mesmo experimento foram realizadas as infecções apenas com H37Rv ou com 255R (MOI 10), como controle de crescimento e tratamento.

3.8 Dosagem de citocinas por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A dosagem das citocinas pró-inflamatórias TNF e IL-1 β foi realizada a partir do sobrenadante de infecção através de método de ELISA sanduíche, seguindo o protocolo do fabricante (eBioscience). Resumidamente, foi feita a sensibilização de placas Nunc Maxisorp com 100 μl de anticorpo de captura, previamente diluído em *Coating buffer*, por 16-18h a 4°C.

No dia seguinte, os poços foram lavados cinco vezes com 200 μl de tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween-20) usando uma lavadora de microplacas (DYNEX Ultrawash Plus). O bloqueio foi realizado com 200 μl de tampão de bloqueio (PBS com 0,05% de Tween-20 com 5% de leite em pó desnatado) durante 1 hora a temperatura ambiente. Os poços foram lavados como descrito anteriormente e 100 μl do

sobrenadante a ser testado, assim como 100 µl do padrão, foram adicionados aos poços para incubação de 16-18 horas a 4°C.

Após o período de incubação, as placas foram lavadas manualmente em fluxo laminar BSL3 e 100 µl do anticorpo de detecção biotinizado em *assay diluent* foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas por 2 horas a temperatura ambiente e lavadas novamente. Adicionou-se 100 µl de avidina conjugada com a enzima horseradish peroxidase (HRP) às placas e estas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Finalmente, após a lavagem dos poços, foi adicionado 100 µl do substrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfônico) (ABTS, KPL) para a reação colorimétrica ocorrer. Após o desenvolvimento da cor, 15 µl da solução de parada contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS, Sigma) foram adicionados aos poços e a leitura foi realizada em leitora de placa de ELISA (Biotek) a 405 nm.

3.9 Dosagem de citocinas por CBA

A dosagem de citocinas IL-12p70, IL-8, IL-6 e IL-10 foi realizada a partir do sobrenadante de infecção através do método de CBA (*Cytometric bead array*), com o kit de citocinas inflamatórias humano da BD Biosciences. O protocolo utilizado foi o descrito pelo fabricante, disponível em http://www.bdbiosciences.com/external_files/Doc_Recon_2.0/pm/others/23-11112.pdf. Após a preparação, as amostras foram

adquiridas em citômetro de fluxo FACSVerse, devidamente preparado segundo protocolo do fabricante.

3.10 Ensaio de *priming in vitro*

Para o ensaio de *priming in vitro* (adaptado de BRODSKYN et al., 2000) foram utilizadas células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de doadores saudáveis obtidas a partir de separação por gradiente de Ficoll, descrito na seção 3.3.3.

Após a contagem, as células foram plaqueadas em garrafas de cultura de 25 cm³ no volume final de 3 ml de meio com ou sem o estímulo (Mtb γ -irradiado 100 μ g/ml) e mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂ por 7 dias.

Após esse período, o sobrenadante das garrafas foi coletado (fração que contém os linfócitos primados) e realizou-se a separação magnética.

3.11 Enriquecimento por separação magnética da fração CD19-

Brevemente, os linfócitos obtidos do sobrenadante do ensaio de *priming in vitro* foram centrifugados a 300 x g por 10 minutos e lavados em PBS. As células foram ressuspensas em 1 ml de MACS buffer gelado (PBS + 2 mM EDTA + 0,5% BSA) para serem contadas em câmara de Neubauer. A seguir, 10⁷ células foram suspensas em 90 μ l de MACS buffer gelado e 10 μ l de *microbeads* anti-CD19 (Macs Miltenyi Biotec) e então

incubadas por 20 minutos a 4°C. Após o período de incubação, as células foram lavadas e suspensas em MACS buffer gelado para então serem enriquecidas através de separação em coluna magnética, do tipo LS (Macs Separator – Miltenyi Biotec), conforme protocolo do fabricante. As células retidas na coluna estão enriquecidas para CD19+ e as células que eluíram possuem menor quantidade de células CD19+. As células eluídas da coluna, ou seja, com menor quantidade de células CD19+ (linfócitos T) foram lavadas com PBS, centrifugadas a 300 x g e diluídas em RPMI com 10% SBF para serem contadas em câmara de Neubauer. Ambas as frações, retida e eluída, foram marcadas com anticorpo anti CD19 para avaliação do rendimento do enriquecimento por citometria de fluxo.

3.12 Adição de monócitos ao granuloma

A obtenção dos monócitos foi realizada a partir de PBMC de doadores saudáveis, conforme descrito em 3.3.3.

Após a contagem, as células foram marcadas com *microbeads* anti-CD14 (Macs Miltenyi Biotec) e realizada o enriquecimento por separação magnética da fração CD14+ de maneira semelhante a descrita em 3.11. As células retidas na coluna estão enriquecidas para CD14+ e as células que eluíram possuem menor quantidade de células CD14+. As células enriquecidas para CD14+ retidas na coluna foram retiradas após eluição de 5 ml de MACS buffer gelado na coluna desconectada do suporte magnético, com rapidez, com o auxílio do êmbolo da coluna. As células enriquecidas para CD14+ (monócitos) foram

lavadas com PBS, centrifugadas a 300 x g e diluídas em RPMI com 10% SBF para serem contadas em câmara de Neubauer. Os monócitos foram plaqueados em poços com agarose 3×10^4 células/50 μ l. Aos grupos tratados foi adicionado INH 1 μ M por 2 dias. Após o tratamento, as células foram coletadas, transferidas para eppendorfs de 1,5 ml, centrifugadas a 2,8 rpm em centrífuga minispin e então ressuspensas em meio RPMI + 10% SBF para serem adicionadas ao granuloma num volume de 20 μ l. O mesmo processo foi realizado para a segunda adição de células ao granuloma. A adição de monócitos foi realizada nos dias 4 e 5 do granuloma, concomitante ao tratamento com INH.

3.13 Ensaio colorimétrico de MTT

Bactérias foram plaqueadas (100 μ l) em placas de 96 poços (fundo redondo) na concentração de 3×10^7 bactérias/ml, em meio 7H9 (BD) com 10% de OADC e diluídas em diferentes concentrações de antibiótico (100 μ l). Foram mantidas em estufa a 37°C por 7 dias. Após esse período, adicionou-se 50 μ l de MTT (Amresco) 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo (1 mg/ml) diluído em PBS + 10% de Tween 80 (Amresco), mantendo por 4h na incubadora. Adicionou-se 50 μ l de SDS (Amresco) 20%/DMF (Amresco) 50% (1:1) *overnight* e a leitura da absorbância foi realizada no dia seguinte a 540nm.

3.14 Citometria de fluxo

Populações celulares foram analisadas por citometria de fluxo para caracterização de fenótipo. Brevemente, as células foram bloqueadas com Fc block (CD16/CD32) (para células murinas) ou soro AB humano (para amostras humanas) por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas com tampão de FACS (PBS 1X + 0,5% SBF), centrifugadas e ressuspensas em painéis de anticorpos monoclonais para incubação por 1h no gelo. Após lavagem com tampão de FACS, as células foram fixadas com paraformaldeído tamponado 2% *overnight* em geladeira e analisadas em equipamento FACSVerse (3 lasers, BD) no dia seguinte. Os seguintes anticorpos foram utilizados: Humanos- CD3 (clone UCHT1, BD Biosciences), CD11c (clone B-ly6, BD Biosciences), CD66 (clone G10F5, BD Pharmingen), CD19 (clone HIB19, Biolegend), CD62L (clone DREG-56, Biolegend), CD11b (clone ICRF44, Biolegend), CD14 (clone M5E2, BD Pharmingen), CD45RA (clone HI100, BD Pharmingen), CD3 (clone UCHT1, Biolegend), CD8 (clone UCHT4, Immunotools), HLA-DR (clone G46-6, BD Hoizon), CD45RO (clone UCHL1, BD Pharmingen), CD8 (clone EDU-2, Immunotools), TCR- $\gamma\delta$ (clone 11F2, BD Biosciences), CD27 (clone O323, Biolegend).

3.15 Marcação para viabilidade celular com FVS

O reagente BD HorizonTM Fixable Viability Stain é um corante de aminas que reage e liga-se covalentemente a aminas de superfície e intracelulares, resultando em células vivas pouco

marcadas e células necróticas com fluorescência alta. As células do granuloma foram retiradas dos poços com agarose, ressuspensas em seu próprio sobrenadante e transferidas para poços de fundo chato. Foram marcadas com FVS 0,25 µg/ml por 15 minutos, a temperatura ambiente protegido da luz. Após o período de marcação as células foram lavadas com PBS 1X + 10% SBF e centrifugadas a 430 x g. O pellet de células foi ressuspensão em PBS/SBF, fixado em 200 µl de paraformaldeído 2% *overnight* em geladeira e submetido ao ensaio de citometria de fluxo no dia seguinte. Como controle positivo foi utilizado DMSO 10% por 15 minutos e a marcação e fixação procederam-se da mesma maneira. A análise das células foi realizada pelo laser violeta, no canal V450, em aparelho de citometria de fluxo FACSVerse BD.

3.16 Avaliação de doadores quanto à resposta ao PPD

Os doadores foram avaliados quanto à resposta ao PPD (do inglês '*purified protein derivative*'), um derivado proteico purificado denominado tuberculina, no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, segundo o protocolo local. Brevemente, os doadores foram inoculados intradermicamente com 0,1 ml de tuberculina e a medida do maior diâmetro transversal do nódulo palpável que se formou no local de infiltração da tuberculina foi realizada após 72 horas. A classificação é baseada no diâmetro do nódulo, da seguinte maneira:

- 0 a 4 mm: não reativo – indivíduo não infectado pelo *M. tuberculosis* ou anérgico.
- 5 a 9 mm: reativo fraco – indivíduo infectado pelo *M. tuberculosis* ou por outras micobactérias ou vacinado com BCG.
- ≥ 10 mm: reativo forte – indivíduos infectados pelo *M. tuberculosis*, doente ou não, ou vacinado com BCG.

É importante ressaltar que um resultado positivo nunca deve ser considerado diagnóstico de tuberculose, sendo importante a avaliação de parâmetros clínicos, radiológicos e de história de contato com indivíduo portador de tuberculose, especialmente no Brasil, onde todos os recém-nascidos são vacinados com a vacina BCG e podem apresentar positividade por conta da vacina ou ainda por conta do contato com micobactérias presentes no ambiente.

3.17 Análise Estatística

Os resultados apresentados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e submetidos aos testes paramétricos ANOVA de uma via e pós teste de Tukey, ou teste t de Student e pós teste Mann-Whitney. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.).

4 Resultados

4.1 Concentração inibitória mínima de INH em cepa virulenta de laboratório H37Rv

Para confirmar a capacidade bactericida da isoniazida sobre a cepa de Mtb estudada, realizou-se o ensaio colorimétrico de MTT, baseado na capacidade de células vivas em reduzir o composto MTT a cristais de formazan. Portanto, a bactéria foi incubada em diferentes concentrações de isoniazida e depois exposta ao MTT. O resultado do ensaio foi demonstrado pela leitura da absorbância em um espectrofotômetro a 540 nm (figura 5A). Verificou-se que a partir da concentração de 1 μM de INH os valores de absorbância apresentam-se reduzidos, demonstrando a conversão do composto à forma de cor mais escura (roxa), como exemplificado na foto ilustrativa da figura 5B.

Além disso, conseguiu-se relacionar a quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC) presente após o período de incubação nas diferentes concentrações de INH (figura 5C). Verificou-se que concentrações a partir de 1 μM foram capazes de reduzir a taxa de replicação das bactérias significativamente. O número de bactérias restante nessas concentrações não foi suficiente para a conversão do MTT aos cristais de formazan ou as bactérias não estavam metabolicamente ativas para realizar tal conversão.

C

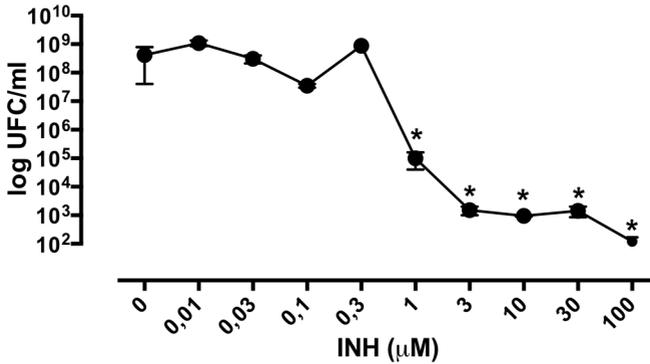
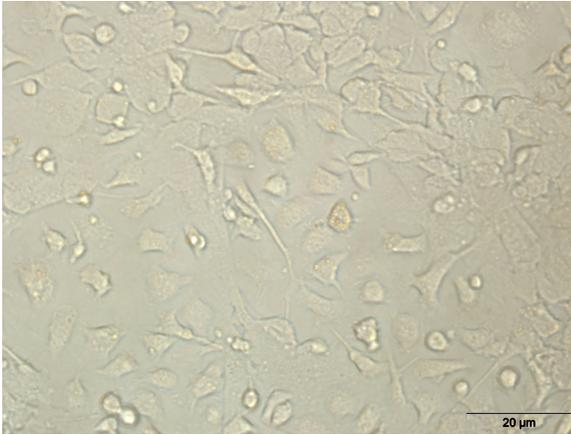


Figura 5 Concentração inibitória mínima de INH em cepa virulenta de laboratório H37Rv. A cepa de laboratório de Mtb H37Rv foi incubada em diferentes concentrações de INH por 7 dias. **(A)** Após esse período, adicionou-se o MTT e esperou-se a redução do composto a cristais de formazan. A leitura de absorbância foi realizada em aparelho espectrômetro a 540 nm. **(B)** Fotografia representativa de uma placa de MTT. Os poços em amarelo contêm MTT na sua forma não reduzida e não foram convertidos a cristais de formazan (poços roxos). **(C)** As bactérias foram plaqueadas em meio sólido 7H10 e incubadas a 37°C por 30 dias até a contagem de UFC. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata. * para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo 0 (não tratado), ANOVA de uma via, pós teste Tukey.

4.2 A pré exposição de bactérias Mtb H37Rv ou o pós tratamento de macrófagos infectados com baixas doses de isoniazida não interfere no crescimento de Mtb.

Os primeiros ensaios de infecção com Mtb foram realizados em macrófagos derivados de medula óssea (MMOs), uma vez que os macrófagos parecem ser a célula-alvo da micobactéria (CUNNINGHAM et al., 1925; SABIN e DOAN, 1927). Portanto, os macrófagos foram obtidos de camundongos a partir da diferenciação com sobrenadante de L929. Após o sétimo dia de cultivo, as células encontram-se espreiadas na placa, com aspecto aderido (figura 6A). Além disso, para confirmar o fenótipo dessa população, as células foram marcadas com marcadores clássicos de macrófagos (F4/80 e CD11b) e caracterizadas por ensaio de citometria de fluxo, mostrando que quase 94% das células são F4/80 e CD11b duplo positivas (figura 6B).

A



B

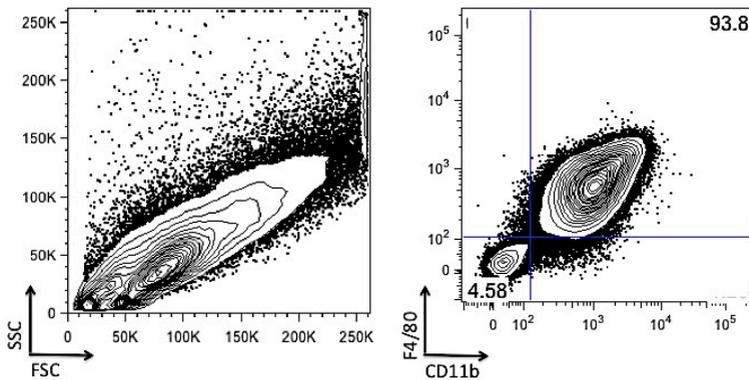


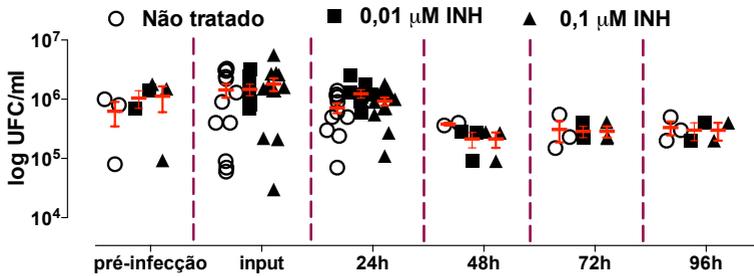
Figura 6. Caracterização de MMO (macrófagos derivados de medula óssea) de camundongos. (A) Fotografia representativa dos macrófagos após 7 dias de cultivo. Após a diferenciação das células por sobrenadante de L929, as células encontram-se aderidas à superfície da placa de cultura. **(B)** Fenotipagem dos macrófagos com marcadores de superfície F4/80 e CD11b por citometria de fluxo.

Inicialmente investigou-se se as baixas doses de INH, reportadas na literatura como as encontradas em lesões

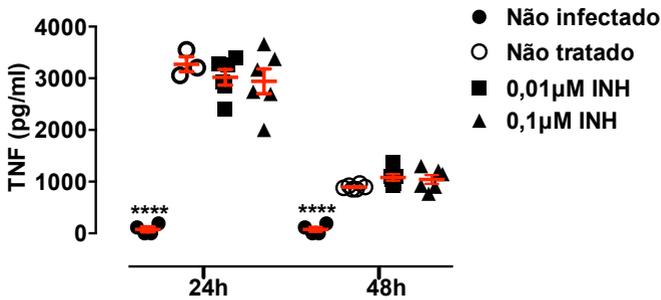
pulmonares causadas pela infecção com Mtb (O'BRIEN et al., 1998; CONTE et al., 2002; KJELLSSON et al., 2012), diminuiriam o crescimento do bacilo em MMOs. Verificou-se se a exposição de bactérias virulentas Mtb H37Rv à INH em baixas doses (representando bactérias extracelulares, presentes em lesões caseosas que entrariam em contato com o fármaco antes de serem fagocitadas) ou o pós-tratamento de macrófagos infectados (simulando a atuação do fármaco em células já infectadas pelo bacilo) diminuiriam o crescimento da bactéria.

Na figura 7A, representando as bactérias que foram pré-expostas ao antibiótico, verificou-se que não há diferença no crescimento das bactérias após a exposição (indicado como 'pré-infecção'), na quantidade de bactérias fagocitadas pelos macrófagos (indicado como '*input*') ou no crescimento das bactérias intracelulares (indicado nos *time points* de 24, 48, 72 e 96 h). Além disso, verificou-se os níveis de TNF no sobrenadante de macrófagos murinos 24h e 48h pós infecção (MOI 10). Não foi observado diferença na produção de TNF, sugerindo que as bactérias tratadas com INH induziram resposta semelhante às não tratadas (figura 7B). De maneira semelhante, também não se observou diferença no crescimento das bactérias intracelulares tratadas com antibiótico (figura 7C). Estes dados sugerem que as baixas concentrações de INH não interferem no crescimento das bactérias em macrófagos murinos derivados de medula óssea.

A



B



C

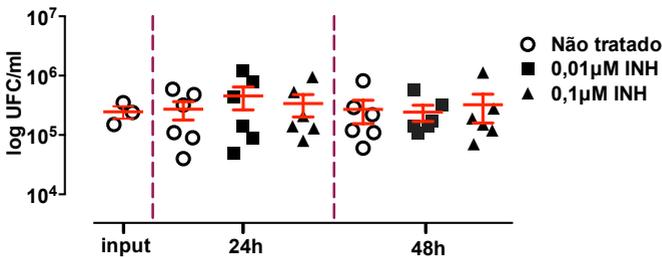


Figura 7. Pré ou pós tratamento de *Mtb* H37Rv com baixas doses de INH não altera o crescimento da bactéria em macrófagos murinos. (A) A bactéria *Mtb* H37Rv foi pré exposta a baixas concentrações de INH (0,01 ou 0,1 μ M) por 24h. Após esse período, as bactérias foram lavadas; parte delas foi plaqueada em meio sólido 7H10 (pré-infecção) para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC)

e outra parte foi utilizada na infecção de macrófagos murinos (MOI 10). Após 4h, as células foram lavadas, lisadas com saponina 1% e plaqueadas em meio 7H10 (*input*) ou mantidas em incubadora de CO₂, 37°C, 5% CO₂ até os devidos tempos, nos quais as células infectadas foram lisadas e plaqueadas para contagem de UFC. As placas de 7H10 foram mantidas em estufa a 37°C por 30 dias até aparecimento de colônias para contagem. **(B)** Bactéria Mtb H37Rv foi pré exposta a baixas concentrações de INH por 24h e utilizadas para infectar BMMs (MOI 10). Níveis de TNF foram medidos por ELISA no sobrenadante dos macrófagos 24h e 48h pós infecção. **(C)** Macrófagos murinos foram infectados com Mtb H37Rv (MOI 10) por 4h, lavados e reincubados até os devidos tempos; ou lavados, lisados e plaqueados (*input*) em meio 7H10 para contagem de UFC. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata de três experimentos independentes. *para $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

Além disso, verificou-se a possibilidade de macrófagos não infectados serem ativados pela INH circulante, apresentando aumento na capacidade de *killing* de bactérias. Dessa forma, as células foram tratadas com INH por 24h e depois infectadas com Mtb H37Rv (MOI 10). No entanto, o pré tratamento de macrófagos com INH não alterou a capacidade de controle de replicação bacteriana (figura 8).

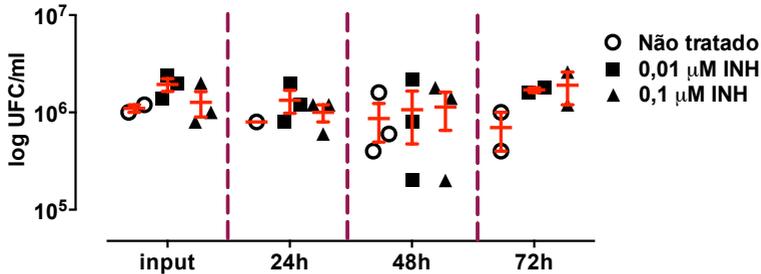


Figura 8. Pré tratamento de macrófagos com baixas doses de INH não altera o crescimento da bactéria. Macrófagos derivados de medula óssea de camundongos foram pré expostos a baixas concentrações de INH (0,01 ou 0,1 μM) por 24h. Após esse período, as células foram lavadas e infectadas com Mtb H37Rv num MOI de 10. Após 4h, as células foram lavadas, lisadas com saponina 1% e plaqueadas em meio 7H10 (*input*) ou mantidas em incubadora de CO₂, 37°C, 5% CO₂ até os devidos tempos, nos quais as células infectadas foram plaqueadas para contagem de UFC. As placas de 7H10 foram mantidas em estufa a 37°C por 30 dias até aparecimento de colônias para contagem. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata.

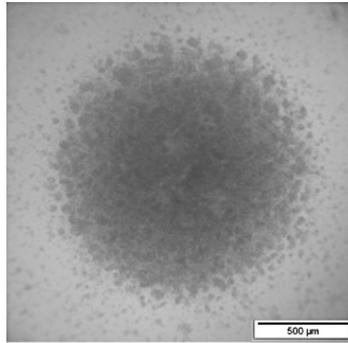
Em conjunto, esses dados demonstram que as baixas concentrações de INH parecem não modificar a propensão da bactéria em ser reconhecida por macrófagos murinos ou a ativação desses fagócitos, influenciando a sua capacidade em matar o patógeno Mtb. No entanto, o controle bacteriano *in vivo* compreende um ambiente celular muito mais complexo que o considerado apenas em macrófagos. Dessa forma, decidiu-se analisar os efeitos iniciais do antibiótico INH em um modelo celular que melhor mimetizasse o encontrado em infecções *in vivo*.

4.3 A estrutura celular semelhante ao granuloma assemelha-se ao granuloma na fase ativa da infecção.

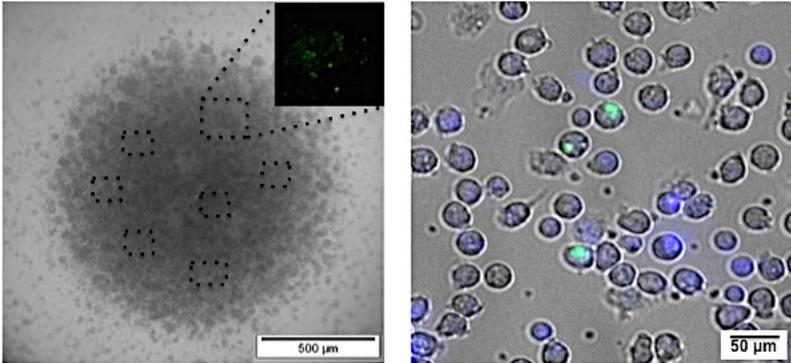
A fim de utilizar um sistema mais compatível com aquele em que a bactéria se encontra, empregou-se o modelo adaptado de agregado celular semelhante à estrutura granulomatosa, gerado a partir de leucócitos totais de doadores saudáveis (SEITZER et al., 2003; PUISSEGUR et al., 2004; BIRKNESS et al., 2007). Brevemente, o sangue dos doadores foi submetido à lise de hemácias com tampão de lise de hemácias e os leucócitos totais foram infectados com Mtb H37Rv (MOI 10) e plaqueados em poços cobertos com uma fina camada de agarose + RPMI 1,5%. As células infectadas formam um agregado semelhante ao granuloma (figura 9A). Através da marcação da bactéria com o corante fluorescente SYTO 24, pode-se verificar que nessa estrutura a bactéria encontra-se em aglomerados do granuloma e no interior de células (figura 9B). A fim de melhor caracterizar essa estrutura, realizou-se ensaio de citometria de fluxo e através de marcadores de superfície fez-se a fenotipagem geral dos principais tipos celulares presentes na infecção por Mtb, como linfócitos T (CD3+) e B (CD19+), fagócitos como monócitos (CD14+) e células dendríticas (CD11c+) e granulócitos (CD66+), ao longo da infecção (figura 9C). De maneira geral, percebeu-se que a frequência das células diminui ao longo da infecção, com exceção das células T que apresentam um pequeno aumento no 3º dia. Esse aumento deve-se provavelmente à proliferação das células após a sua ativação com o patógeno Mtb. Além disso, através do uso de um

marcador de viabilidade celular acompanhou-se a frequência de morte celular. O FVS, um corante de amins, reage e liga-se covalentemente a amins de superfície e intracelulares. Dessa forma, células vivas ficam pouco marcadas e células necróticas apresentam fluorescência alta. Verificou-se que a frequência de células positivamente marcadas, ou seja, em necrose, aumenta significativamente ao longo do tempo de infecção, chegando a pouco mais de 70% no 6° dia de infecção (figura 9D) e explicando a redução em todos os tipos celulares analisados. Além disso, o aumento da frequência de células necróticas é acompanhado pela multiplicação exponencial bacteriana nesse sistema (figura 9E). O conjunto de resultados mostra que o modelo de granuloma humano *in vitro* assemelha-se de maneira bem próxima ao encontrado na fase ativa da infecção *in vivo*, com presença dos principais tipos celulares, bactérias intracelulares, células necróticas e intensa replicação bacteriana.

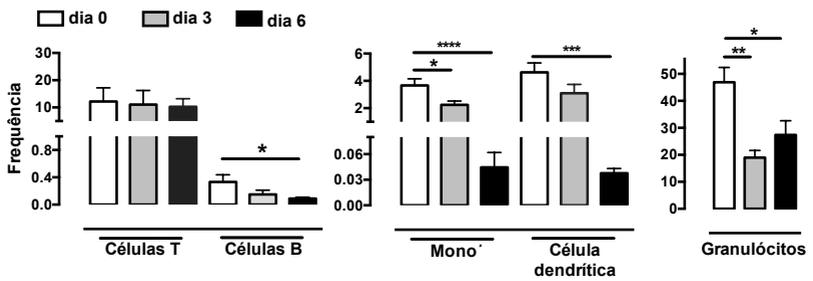
A



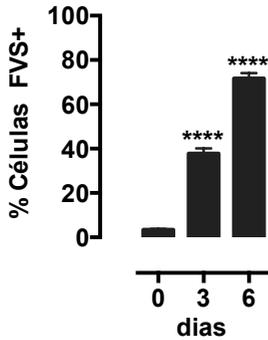
B



C



D



E

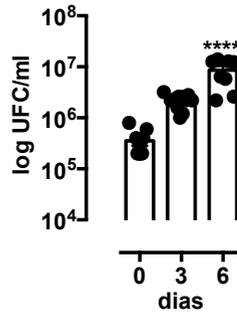
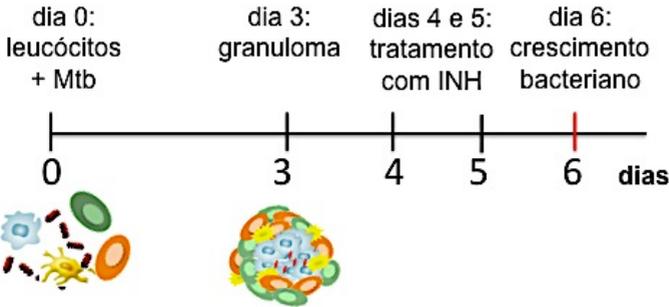


Figura 9. A estrutura celular granulomatosa assemelha-se ao granuloma na fase ativa da infecção. (A) Fotomicrografia do agregado celular semelhante ao granuloma. Os leucócitos totais do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados com Mtb H37Rv (MOI 10) e plaqueados em poços cobertos com agarose+RPMI 1,5% no dia 0. Imagem representativa do 6º dia pós infecção. **(B)** Fotomicrografias de aglomerados de bactérias marcadas com SYTO24 (1µM) no granuloma infectado. O granuloma foi desfeito da sua conformação 3D e as células foram plaqueadas em poços com fundo chato. As células foram marcadas com HOECHST 33342 a 1 µg/ml e analisadas em microscópio de fluorescência. **(C)** Frequência das populações celulares que compõem o granuloma: linfócitos T (CD3+), linfócitos B (CD19+), monócitos (CD14+), células dendríticas (CD11c+) e granulócitos (CD66+). **(D)** Frequência de células FVS positivas. O granuloma foi desfeito, as células plaqueadas em poços com fundo chato e marcadas com FVS (0,25 µg/µl) e analisadas por citometria de fluxo. **(E)** Cinética de crescimento de Mtb H37Rv em modelo *in vitro* de granuloma humano (MOI 10). Contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) representativa do 6º dia. No 6º dia pós infecção as células foram lisadas e plaqueadas em meio sólido 7H10 para contagem de UFC após 30 dias. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata. * para $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao dia 0, ANOVA de uma via, pós teste Tukey.

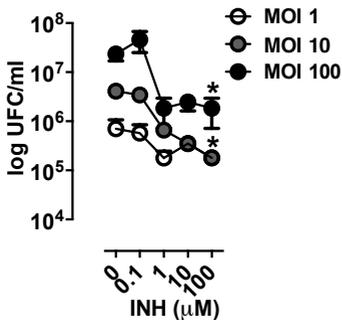
4.4 O tratamento com INH reduz o crescimento de Mtb no granuloma em altas concentrações.

A fim de verificar a cinética de crescimento da bactéria no granuloma em diversas condições, bem como a efetividade do tratamento com INH nesse sistema, realizou-se a infecção do granuloma em diferentes multiplicidades de infecção (MOIs). Após o estabelecimento dessa estrutura (dia 3), nos dias 4 e 5 foi adicionado INH nas concentrações indicadas e o crescimento bacteriano foi acompanhado até o 6º dia pós infecção (figura 10A). Verificou-se que em todas as multiplicidades de infecção a INH é capaz de reduzir o crescimento bacteriano a partir da concentração de 1 μM , com diferença estatística na concentração de 100 μM (figura 10B). Além disso, quando a eficiência do tratamento com INH é observada diretamente sobre a bactéria em comparação ao tratamento da bactéria inserida no granuloma, observou-se que o fármaco tem maior atividade bactericida sobre as bactérias presentes no granuloma (figura 10C), sugerindo que a atividade inicial da INH é estimulada na presença de células do granuloma. Assim, os experimentos posteriores foram realizados no MOI de 10 e utilizando as doses de 0,01 e 100 μM , mimetizando o estado de infecção ativa da doença e as doses que podem ser encontradas no granuloma (O'BRIEN et al., 1998; CONTE et al., 2002; KJELLSSON et al., 2012) e que apresentaram efeito bactericida nesse modelo, respectivamente.

A



B



C

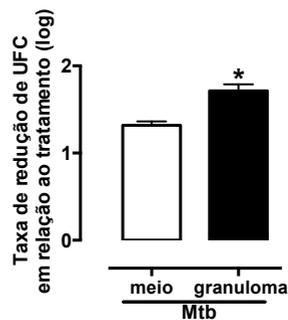


Figura 10. O tratamento com INH reduz o crescimento de Mtb no granuloma. (A) Esquema de tratamento do granuloma com INH. Os leucócitos totais do sangue periférico de doadores saudáveis foram infectados com Mtb (MOI 10) e plaqueados em poços cobertos com agarose + RPMI 1,5% no dia 0. O tratamento com INH foi realizado nos dias 4 e 5 e o crescimento bacteriano foi acompanhado até o 6º dia pós infecção. (B) Crescimento bacteriano após o tratamento com INH. As células foram lisadas e plaqueadas em meio sólido 7H10 para contagem de UFC após 30 dias. (C) Taxa de redução de UFC em relação ao tratamento com INH. O crescimento bacteriano de granulomas não tratados foi dividido pelo de granulomas tratados, MOI 10 e INH 100 μM. Paralelamente, a mesma quantidade de bactérias (6×10^6 UFC/ml) foi mantida em meio de cultura RPMI + 10% de SBF, tratadas ou não tratadas com INH 100 μM. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata. * para $p < 0,05$ quando

comparado ao grupo não tratado (B) ou meio (C). ANOVA de uma via, pós teste Tukey (B) ou teste t de Student (C).

4.5 O granuloma de doadores PPD positivo apresenta maior capacidade em controlar a infecção quando comparado ao granuloma de doadores PPD negativo, mas não são influenciados pelo tratamento com INH.

Por se tratar de uma estrutura celular de doadores com diferentes perfis imunológicos, avaliou-se a possibilidade de existir diferença na capacidade de controle da infecção dependente de prévio contato com antígenos micobacterianos. Para tanto, os doadores foram separados em grupos PPD positivo ou PPD negativo. A resposta ao PPD foi avaliada pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, conforme protocolo local. A presença de células previamente primadas com antígenos micobacterianos poderia influenciar na capacidade de controlar a infecção, uma vez que seria evocada uma resposta já conhecida.

Dessa forma, verificou-se que o granuloma de doadores PPD positivo apresenta maior tendência ($p < 0,05$, teste t de Student) em controlar a infecção quando comparado ao granuloma de doadores PPD negativo. No entanto, o tratamento com INH não promoveu alteração nesse perfil nos granuloma dos doadores (figura 11).

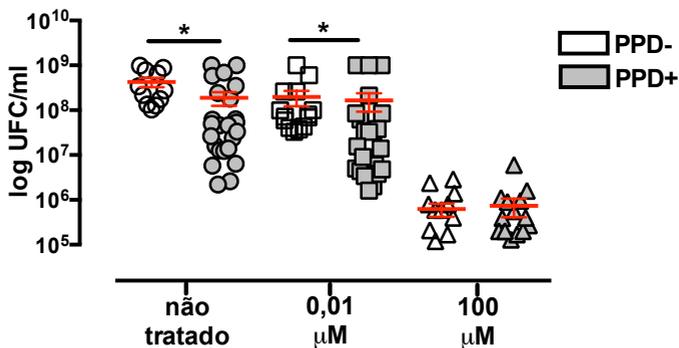


Figura 11. O granuloma de doadores PPD positivo apresenta maior capacidade em controlar a infecção e não são influenciados pelo tratamento com INH. Após serem separados quanto a resposta ao teste de PPD, os leucócitos totais dos doadores saudáveis foram infectados com Mtb (MOI 10) e plaqueados em poços cobertos com agarose + RPMI 1,5% no dia 0. O tratamento com INH foi realizado nos dias 4 e 5 e o crescimento bacteriano foi acompanhado no 6º dia pós infecção. As células foram lisadas e plaqueadas em meio sólido 7H10 para contagem de UFC após 30 dias. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata de ao menos 3 experimentos independentes. * para $p < 0,05$ quando comparado os grupos PPD positivo e negativo, teste t de Student, pós teste Mann-Whitney.

4.6 O granuloma com células T primadas controla melhor a infecção.

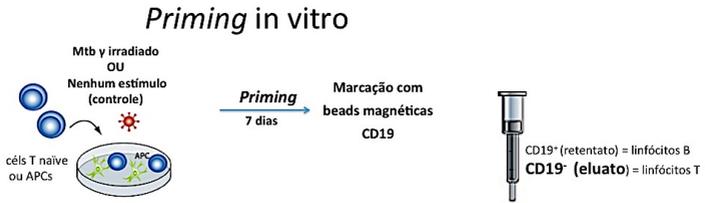
Assim, por ter sido verificado diferença no controle de granulomas de doadores PPD positivo e PPD negativo, levantou-se a hipótese de que granulomas com células T primadas especificamente com antígenos de Mtb têm maior controle da infecção e, ainda, são mais suscetíveis ao tratamento com INH.

Além disso, com o intuito de utilizar um granuloma com células que estariam presentes no pulmão durante a infecção em pacientes, realizou-se um ensaio de *priming in vitro* (adaptado de BRODSKYN et al., 2000) de células T naïve com antígenos provenientes de Mtb gama irradiado, a fim de se obter células T antígeno-específicas que compõem o granuloma de maneira controlada. As células de doadores PPD negativo foram primadas através da adição de Mtb gama irradiado 100 µg/ml ao meio e mantidas em cultura por 7 dias (descrito em Metodologia experimental). A fração eluída (CD19⁻, ou seja, enriquecidas para CD3⁺) foi coletada e utilizada para ser adicionada aos novos granulomas na proporção de 3 linfócitos primados para cada 1 monócito presente no granuloma (figura 12A e B). Dessa forma, após a obtenção dos linfócitos T primados, as células foram adicionadas aos leucócitos totais infectados com Mtb, logo no dia 0, conforme o protocolo descrito anteriormente (figura 10A).

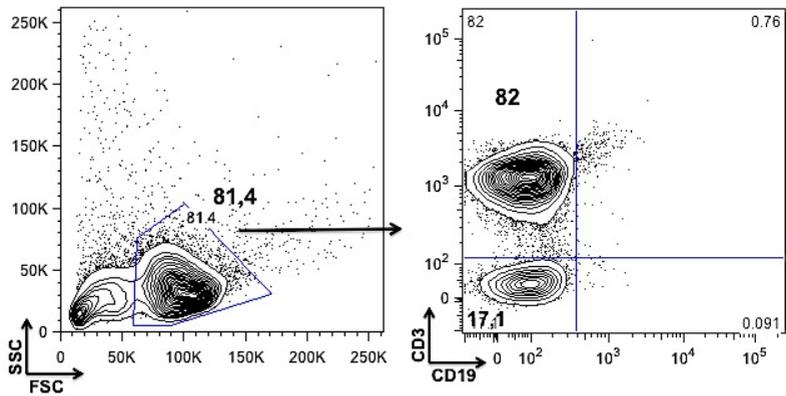
Verificou-se que o granuloma formado com células T primadas foi capaz de controlar melhor a infecção. No entanto, esse efeito não se mostrou pronunciado na presença de INH,

seja em baixa ($0,01 \mu\text{M}$) ou alta concentração ($100 \mu\text{M}$) (figura 12C).

A



B



C

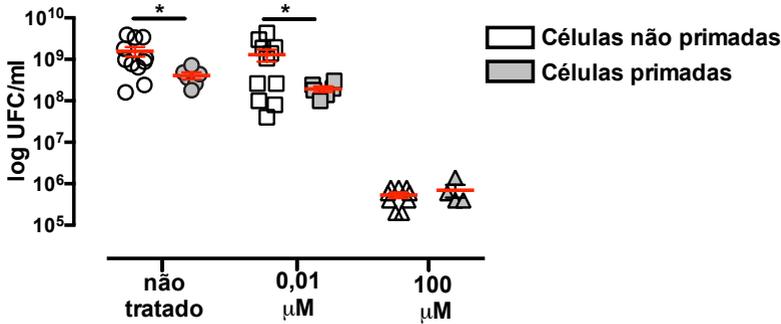
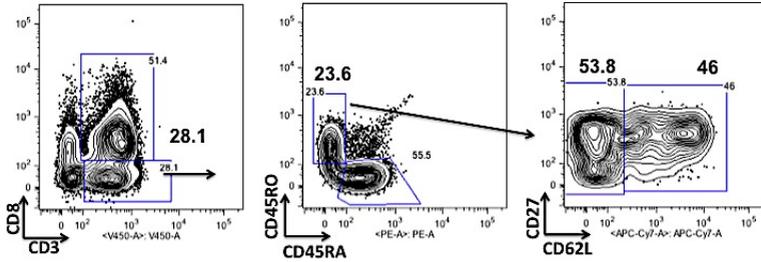


Figura 12. O granuloma de células T primadas controla melhor a infecção, mas não sofre influência do tratamento com baixas doses de INH. (A) O sangue de doadores saudáveis foi utilizado para obtenção de PBMC, que foi então plaqueado e estimulado com Mtb-gama irradiado (100 µg/ml) por 7 dias. As células do sobrenadante foram coletadas e marcadas com *microbeads* CD19, submetidas à separação por coluna magnética e adicionadas aos leucócitos totais para a formação do granuloma. **(B)** Rendimento da separação dos linfócitos T CD3+CD19- eluídos da coluna de separação magnética. **(C)** Os granulomas foram tratados nos dias 4 e 5 com INH e o crescimento bacteriano foi verificado no dia 6 pós infecção. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata de 4 doadores. *p<0,05 quando comparado o grupo de células não primadas ao grupo de células primadas, teste t de Student.

A seguir, verificou-se os tipos de células T de memória presentes nesses granulomas e que estariam influenciando a diminuição da carga bacteriana no granuloma com células T primadas. Para isso, foram feitas marcações com anticorpos específicos e a estratégia de *gating* é demonstrada na figura 13A. Foram analisadas as populações celulares de linfócitos T central de memória (T_{CM}) (CD3⁺CD8⁻CD45RO⁺CD62L⁺) e

efetora de memória (T_{EM}) ($CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^-$). Verificou-se que os granulomas expostos às células T primadas apresentaram menor frequência de células T_{CM} e maior frequência de células T_{EM} (figura 13B). Além disso, o tratamento com INH não acentuou a diferença na frequência dessas células nos granulomas, sugerindo que redução bacteriana causada pela INH na concentração maior não está relacionada a frequência desses tipos celulares.

A



B

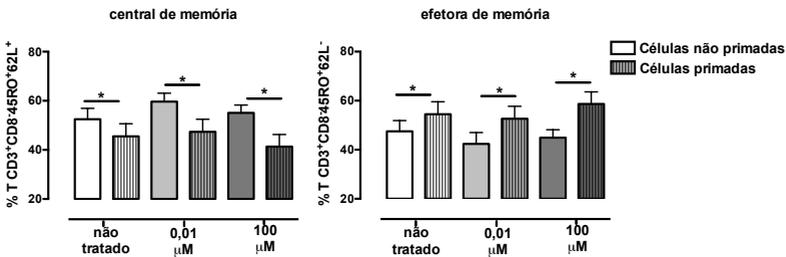


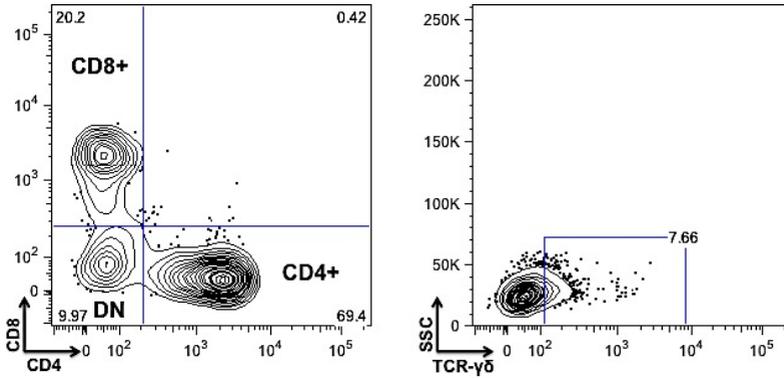
Figura 13. O granuloma com células T primadas possui maior frequência de células T efetora de memória e menor de células T de memória, não influenciando o tratamento com INH. (A) Estratégia de *gating* para células T de memória, central (T_{CM}) e efetora (T_{EM}). **(B)** Granuloma com células T primadas apresentam menor frequência de células T central de memória ($CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^+$) e maior frequência de células T efetora de memória ($CD3^+CD8^+CD45RO^+CD62L^-$). Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata. * para $p < 0,05$ quando comparado ao grupo não tratado, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

4.7 A frequência de células T- $\gamma\delta$ é mantida após o tratamento com INH.

Como após o ensaio de *priming* pode-se verificar que a presença de diferentes populações de células T é capaz de interferir no controle da infecção, analisou-se a frequência de células T- $\gamma\delta$, uma população celular que possui potencial inflamatório e regulatório na tuberculose em humanos (PINHEIRO et al., 2012) e que poderia alterar a resolução da infecção após o tratamento com INH.

Assim, a frequência de células T CD3+CD4+, CD8+ ou duplo negativas (DN) para CD4 e CD8, $\gamma\delta$ foi avaliada no 6° dia pós infecção (figura 14A). No entanto, verificou-se que a frequência dessas populações não é alterada após o tratamento com INH (figura 14B), nem mesmo na concentração mais alta, capaz de reduzir o número de UFC, sugerindo que elas não estão envolvidas no mecanismo de *killing* bacteriano resultante do tratamento quimioterápico.

A



B

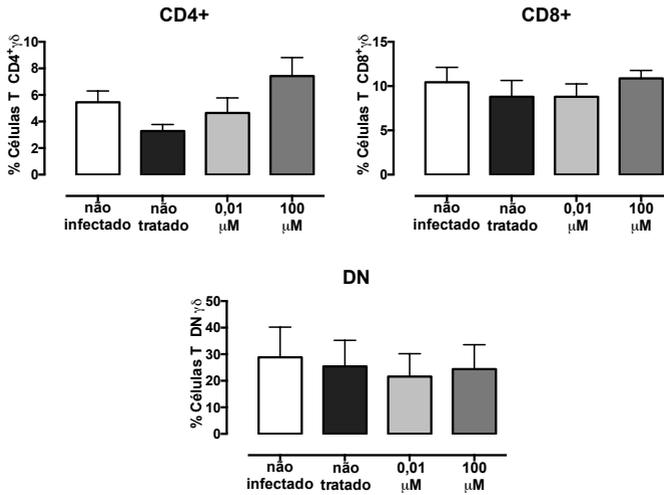


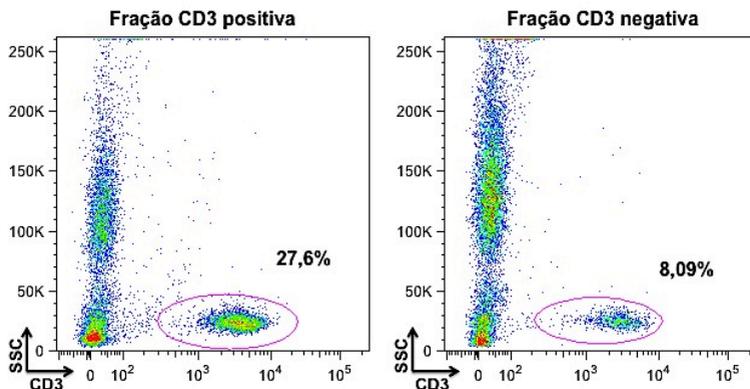
Figura 14. A frequência de células T- $\gamma\delta$ é mantida após o tratamento de INH no granuloma. **(A)** Estratégia de *gating* para células T- $\gamma\delta$ CD4+, CD8+ ou duplo negativas (DN) para CD4 e CD8. **(B)** Os granulomas foram tratados com INH nos dias 4 e 5 nas concentrações indicadas e a frequência das células T- $\gamma\delta$ foi verificada no dia 6 pós infecção. As células foram analisadas quanto à positividade para CD4+, CD8+ ou duplo negativas (DN) para CD4 e

CD8. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em quadruplicata.

4.8 Granulomas com redução de linfócitos CD3+ apresentam controle da infecção semelhante aos granulomas intactos.

A fim de continuar investigando se populações de células T possuem papel no controle do crescimento bacteriano exercido pelo tratamento com INH no modelo de granuloma humano, resolveu-se depletar células CD3+ do granuloma por separação magnética (vide Metodologia experimental). Após a separação na coluna, observou-se uma redução de aproximadamente 70% (passando de 27,6% para 8,09%) na quantidade de linfócitos CD3+ dos granulomas (Figuras 15A), que foram cultivados de acordo com o protocolo já descrito. No entanto, a redução de 70% dos linfócitos CD3+ nos granulomas não interferiu no resultado do tratamento com INH, sugerindo que essa população celular não está envolvida no mecanismo de ação bactericida do fármaco (figura 15B).

A



B

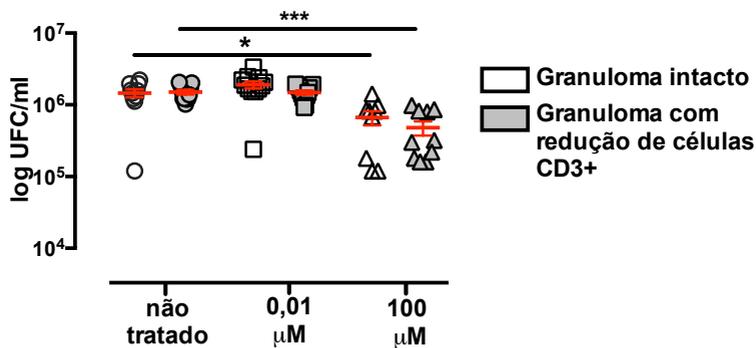


Figura 15. Granulomas com redução de linfócitos CD3+ apresentam controle da infecção semelhante aos granulomas intactos. As células foram marcadas com anticorpo anti-CD3 (PE) e depois com *microbeads* anti-PE e submetidas à separação na coluna magnética. **(A)** Dot plot representativo da porcentagem da fração CD3 positiva e negativa, após a separação magnética **(B)** A seguir, as células foram utilizadas para formação do granuloma segundo protocolo descrito na figura 10A. O tratamento com INH foi realizado nos dias 4 e 5 e o crescimento bacteriano verificado no dia 6. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata de 4 doadores.

* para $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Não tratado, ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

4.9 A adição de monócitos ao granuloma, tratados ou não com INH não interfere na atividade bactericida da INH.

Como os linfócitos parecem não agir em conjunto com a INH para contribuir com o efeito micobactericida da INH, investigamos uma outra população chave no controle do crescimento de Mtb (CUNNINGHAM et al., 1925; SABIN e DOAN, 1927; LEE et al., 1996), os macrófagos. Analisou-se se a presença de monócitos aumentaria a eficiência de *killing* proporcionada pelo tratamento com INH. Ainda mais, se monócitos circulantes, que entraram em contato com a INH interfeririam no granuloma, seja por encontrarem-se mais ativados ou ainda por carrearem antibiótico ao granuloma. Para tanto, duas condições foram analisadas: a adição de monócitos ao granuloma e a adição de monócitos pré-expostos à INH (1 μ M) por 2 dias. Ambas situações também foram analisadas concomitantemente ao tratamento com INH (0,01 μ M). Apesar da adição dessas células, não houve alteração no crescimento bacteriano no granuloma. Além disso, mesmo após o tratamento com INH, a adição das células, pré-expostas ou não ao antibiótico, não aumentou a eficiência micobactericida inicial do fármaco (figura 16), mostrando que essas células parecem não estar atuando de maneira sinérgica ao antibiótico para o controle da INH.

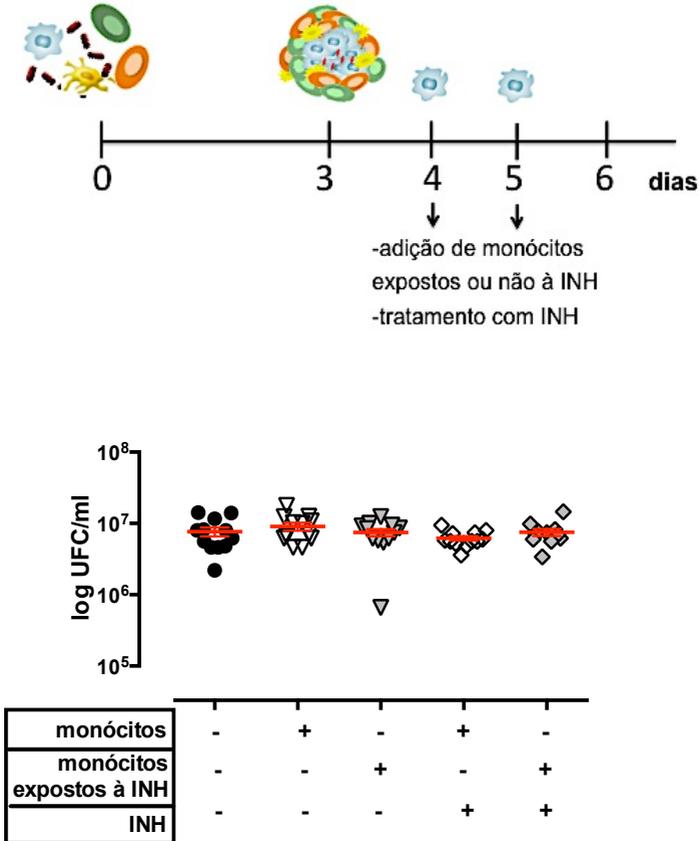
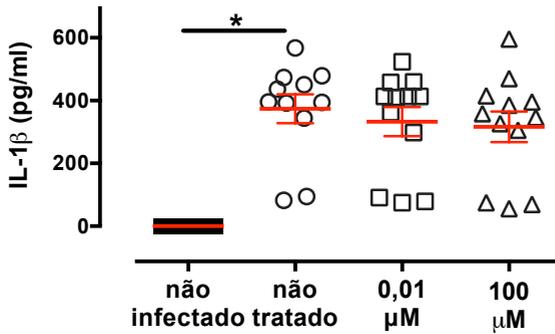


Figura 16. A adição de monócitos ao granuloma, tratados ou não com INH não interfere na atividade bactericida da INH. Os monócitos foram obtidos por separação em coluna magnética após marcação com *microbeads* anti-CD14 de leucócitos totais de sangue periférico de doadores saudáveis. Os monócitos foram mantidos em cultura e pré-expostos ou não à INH (1 μ M) por 2 dias, antes de serem adicionados ao granuloma no 4^o dia de cultivo, juntamente com o primeiro dia de tratamento com INH, quando o caso. O crescimento bacteriano foi avaliado no dia 6 pós infecção. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata de 4 doadores.

4.10 O tratamento com INH não influencia a produção de citocinas pró-inflamatórias no granuloma.

Verificou-se também a produção de citocinas inflamatórias após o tratamento com INH no modelo de granuloma humano. As citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF, reconhecidamente envolvidas no controle da infecção da TB, seja por possuírem atividade antimicrobiana em macrófagos infectados por Mtb (NOVIKOV et al., 2011; JAYARAMAN et al., 2013; MAYER-BARBER et al., 2014) ou por manter a integridade do granuloma (LIN et al., 2010; DAMBUZA et al., 2011; FALLAHI-SICHANI et al., 2012) poderiam estar relacionadas com o mecanismo bactericida da INH. Após o tratamento com INH, verificou-se os níveis destas citocinas no sobrenadante do granuloma (figuras 17A e B). Observou-se que ambas citocinas estavam elevadas após a infecção com Mtb, quando comparado à células não infectadas. No entanto, apesar de o tratamento com INH reduzir a replicação bacteriana nesse sistema na concentração de 100 μ M (figura 10B), não houve diferença na produção dessas citocinas após o tratamento com o fármaco, em nenhuma das concentrações avaliadas.

A



B

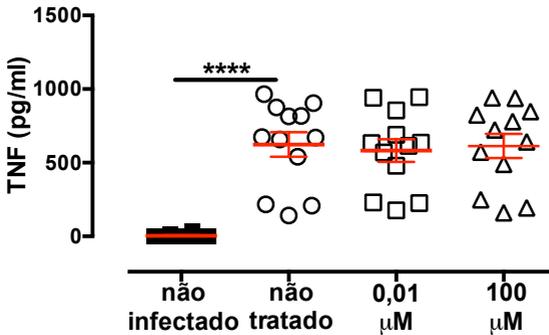


Figura 17. O tratamento com INH não influencia a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF. Níveis de (A) IL-1 β e (B) TNF foram medidos por ELISA no sobrenadante dos granulomas no 6^o dia (24 h pós tratamento) infectados com Mtb (MOI 10). Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

Investigou-se também se, concomitante ao tratamento com INH, a adição exógena de TNF ou IL-1 β (figuras 18A e B) ou o bloqueio da ação das mesmas, via anticorpo monoclonal anti-TNF ou antagonista de receptor IL-1ra (figuras 18C e D) interferiria no crescimento bacteriano. Os resultados mostram que não há diferença no crescimento bacteriano após a adição ou bloqueio da ação dessas citocinas, indicando que as citocinas IL-1 β ou TNF não estão envolvidas no mecanismo bactericida inicial da INH no modelo de granuloma.

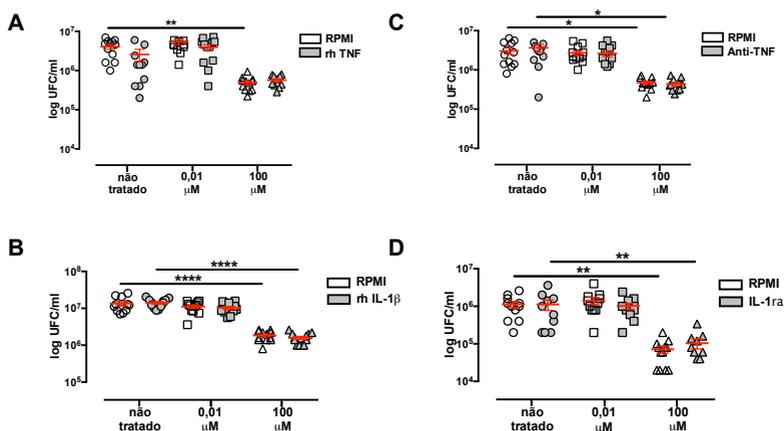


Figura 18. A adição exógena ou o bloqueio da ação das citocinas TNF ou IL-1 β não interfere no tratamento com INH. (A) Granulomas infectados com Mtb (MOI 10) foram tratados com rhTNF (10 ng/ml) ou **(B)** rhIL-1 beta (10 ng/ml) concomitante à infecção, no dia 0. O tratamento com INH foi feito nos dias 4 e 5 e o crescimento bacteriano avaliado no dia 6. **(C)** Granulomas foram tratados com anti-TNF (1 μ g/ml) ou **(D)** IL-1ra (500 ng/ml) *overnight*, antes da infecção com Mtb. No dia seguinte, os granulomas foram infectados com Mtb (MOI 10) e tratados com INH nas concentrações indicadas nos dias 4 e 5. O crescimento bacteriano foi avaliado no dia seguinte. Os resultados

representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

Além disso, avaliou-se outras citocinas presentes no sobrenadante dos granulomas, como IL-12p70, IL-10, IL-8 e IL-6 (figura 19). As duas primeiras citocinas apresentaram níveis muito baixos e não se mostraram alteradas com o tratamento de INH, enquanto IL-8 e IL-6 estavam diminuídas após o tratamento com INH, em ambas concentrações (figura 19C e D).

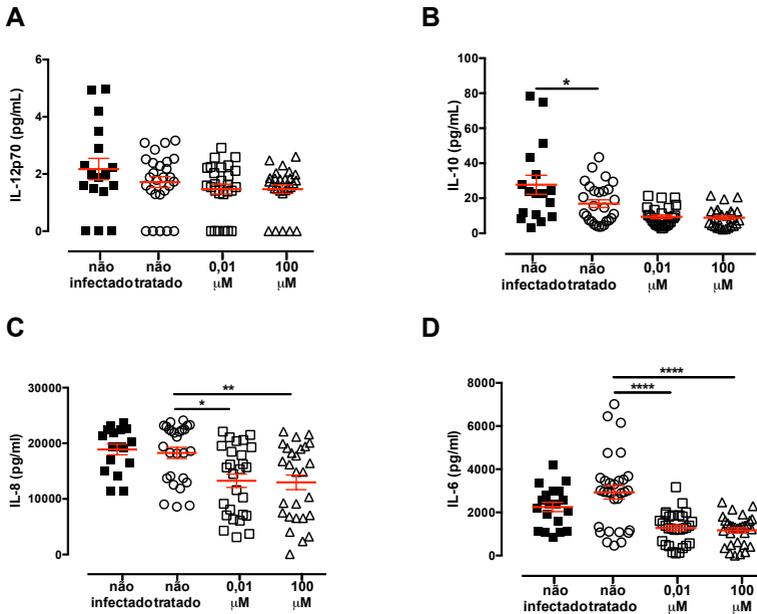


Figura 19. O tratamento com INH reduz IL-8 e IL-6 no sobrenadante dos granulomas infectados com *Mtb*. Níveis de (A) IL-12p70, (B) IL-10, (C) IL-8 e (D) IL-6 foram medidos por CBA no sobrenadante dos granulomas no 6º dia. Os leucócitos totais de doadores saudáveis foram infectados com *Mtb* (MOI 10) e mantidos em incubadora a 37°C, 5% CO₂. Nos dias 4 e 5 foram tratados com INH nas concentrações indicadas e o sobrenadante foi coletado no dia 6. Os resultados

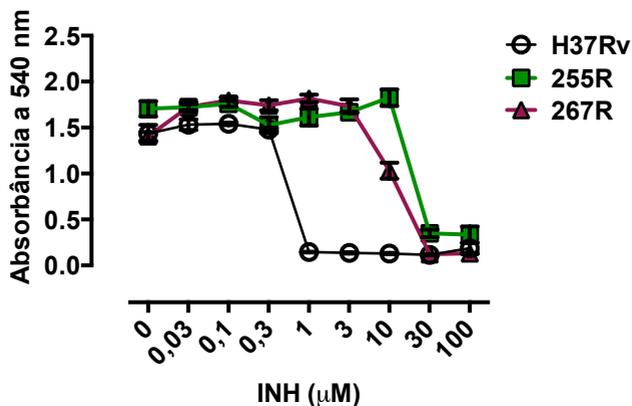
representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata de 4 doadores. *para $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

4.11 O tratamento com INH promove redução parcial do crescimento de cepas clínicas resistentes à INH em granulomas infectados.

O conjunto de resultados demonstrados até o momento confirmam que o efeito inicial bactericida da INH sobre a bactéria *Mtb* no granuloma não envolve a ação de linfócitos T e monócitos e, de maneira geral, as células do granuloma parecem não sofrer ativação em decorrência do tratamento, pois não há alteração nas quantidades de citocinas produzidas. Dessa forma, é provável que a INH aja de maneira direta sobre o bacilo a fim de promover a redução do crescimento bacteriano. Para investigar tal hipótese, avaliou-se o efeito do antibiótico sobre cepas clínicas resistentes à INH. Essas cepas possuem mutações no gene *katG*, que codifica a proteína responsável pela conversão do antibiótico à sua forma ativa.

Assim, os granulomas foram infectados com as cepas clínicas 255R ou 267R (que possuem CIM de 30 μ M) (figura 20A) e tratados com INH nos dias 4 e 5, como o protocolo descrito na figura 10A. Verificou-se portanto, que a concentração maior de INH (100 μ M) é capaz de reduzir de maneira significativa o crescimento das bactérias 255R e 267R nos granulomas. No entanto, essa redução mostrou-se apenas parcial quando comparada ao efeito bactericida na cepa sensível H37Rv (figura 20B), sugerindo que o efeito bactericida da INH no granuloma é mediado pela enzima *Katg*.

A



B

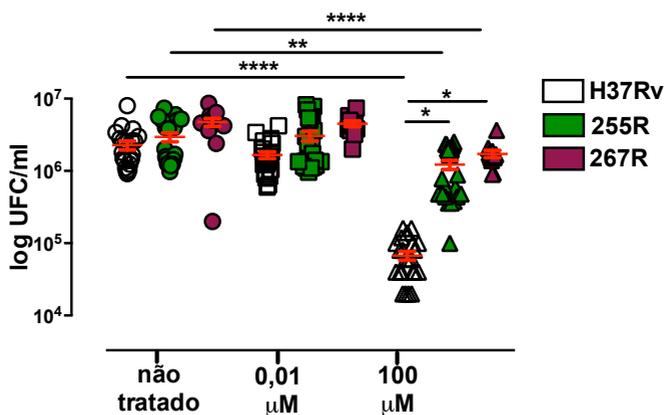
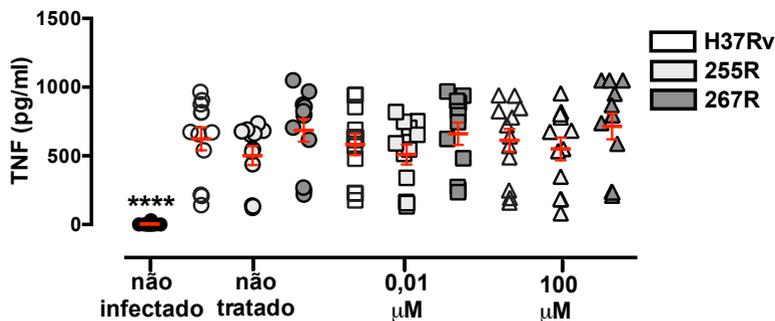


Figura 20. O tratamento com INH promove redução parcial do crescimento de cepas clínicas resistentes à INH em granulomas infectados. (A) A cepa sensível de laboratório Mtb H37Rv ou as cepas clínicas resistentes à INH 255R ou 267R foram incubadas em diferentes concentrações de INH por 7 dias. Após esse período, adicionou-se o MTT e esperou-se a redução do composto a cristais de formazan. A leitura de absorbância foi realizada em aparelho espectrômetro a 540 nm. (B) Os leucócitos totais de doadores saudáveis foram infectados com Mtb (MOI 10) H37Rv ou cepas clínicas resistentes à INH, 255R ou 267R e mantidos em incubadora a 37°C, 5% CO₂. Nos dias 4 e 5 foram

tratados com INH nas concentrações indicadas e o crescimento bacteriano foi observado no dia 6. Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata de 4 doadores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

Ainda mais, os níveis das citocinas TNF e IL-1 β do sobrenadante desses granulomas foi medido e verificou-se que a quantidade de citocinas produzidas pelos granulomas infectados com as cepas clínicas não difere da quantidade produzida pelo granuloma infectado com H37Rv. Esse resultado sugere que o efeito bactericida reduzido da INH nessas cepas não foi decorrente de uma possível ativação celular limitada (figura 21A e B).

A



B

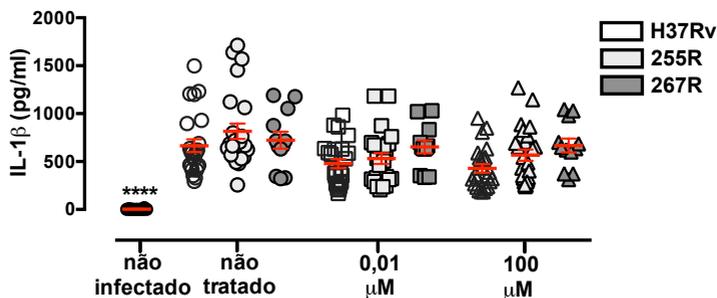


Figura 21. Níveis semelhantes de TNF e IL-1 β em granulomas infectados com cepas sensível ou resistente à INH após o tratamento com INH. Níveis de (A) TNF e (B) IL-1 β foram medidos por ELISA no sobrenadante dos granulomas no 6 $^{\circ}$ dia (24 h pós tratamento) infectados com cepas sensível H37Rv ou cepas clínicas resistentes à INH 255R e 267R (MOI 10). Os resultados representam a média \pm E.P.M. de medidas em triplicata. *para $p < 0,05$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

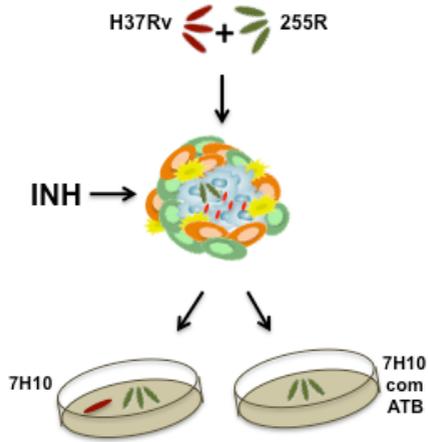
4.12 A INH age diretamente na bactéria para promover seu efeito bactericida

Para verificar se a INH age diretamente na bactéria presente no granuloma, realizou-se um experimento de coinfeção no qual o granuloma foi infectado com cepas sensível (H37Rv) e resistente à INH (255R) e submetido ao tratamento com INH. Dessa forma, na coinfeção poder-se-ia verificar se a INH metabolizada pela bactéria H37Rv tem efeito na cepa resistente 255R. A fim de distinguir as cepas crescidas em meio 7H10, realizou-se o plaqueamento das bactérias em meio com e sem antibiótico (ATB) (figura 22A). As placas com antibiótico possuíam INH a 10 μM e nelas crescem apenas as cepas resistentes à INH (figura 22B). Como controle do experimento, realizou-se a infecção dos granulomas apenas com a cepa H37Rv ou com a cepa resistente 255R e o tratamento com INH foi realizado nas concentrações de 3, 30 e 100 μM . Verificou-se que nas infecções com apenas uma das cepas no granuloma o tratamento com INH foi capaz de exercer seu efeito bactericida como demonstrado por todos os experimentos anteriores.

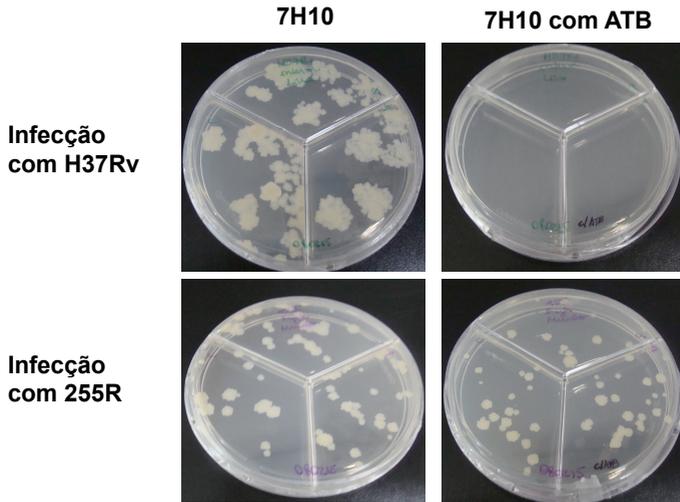
O tratamento com INH na coinfeção com H37Rv e 255R também promoveu redução no crescimento de bacilos. No entanto, a análise geral da taxa de redução (razão entre o número de colônias crescidas sem o tratamento pelo número de colônias crescidas após o tratamento) da coinfeção não é possível dizer quais bactérias foram efetivamente mortas pelo antibiótico, pois não há distinção visual entre as cepas H37Rv e 255R crescidas no meio 7H10. As placas com antibiótico,

entretanto, permitem apenas o crescimento das bactérias resistentes. Dessa forma, através da contagem de UFCs crescidas nas placas com antibiótico conseguiu-se verificar a quantidade de bactérias resistentes que sobreviveram após o tratamento com INH no granuloma coinfestado. Assim, verificou-se que a taxa de redução da bactéria 255R no granuloma coinfestado foi semelhante a redução na infecção apenas com a cepa 255R (figura 22C). Esses resultados sugerem que a ação da INH convertida ocorre apenas na bactéria H37Rv que a ativou.

A



B



C

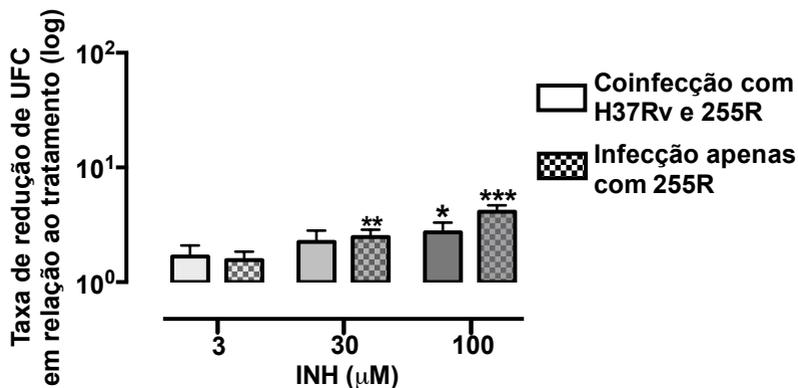


Figura 22. A INH age diretamente na bactéria para promover seu efeito bactericida. Coinfecção de granulomas com cepas sensível e resistente à INH 255R. **(A)** O granuloma foi infectado com as cepas sensível H37Rv e resistente à INH, 255R (MOI 10) e tratado com INH nas concentrações 3, 30 e 100 µM, nos dias 4 e 5. No dia 6, as bactérias foram plaqueadas em placas com e sem antibiótico (ATB). **(B)** A cepa sensível H37Rv cresce apenas em placas de 7H10 sem antibiótico (ATB) enquanto a cepa resistente 255R cresce de maneira similar em ambas as placas, em infecções com apenas uma das bactérias. Placas com ATB possuem INH a 10 µM. **(C)** Taxa de redução de crescimento bacteriano da cepa resistente a INH 255R em granulomas coinfetados com H37Rv e 255R ou granulomas infectados apenas com a cepa 255R, após o tratamento com INH por 2 dias. O crescimento da cepa 255R na coinfecção representa o número de UFCs em placas 7H10 com antibiótico (INH 10 µM). O número de UFCs é representativo do 6º dia após infecção. Os resultados representam a média ± E.P.M. de medidas em triplicata de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo não tratado; ANOVA de uma via, pós teste de Tukey.

5 Discussão

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa que mesmo tendo sido descoberta há muitos anos, permanece sendo a causa da morte de milhões de pessoas. Apesar de existirem fármacos disponíveis e uma vacina preventiva (para os primeiros anos de vida e para formas mais brandas da doença), a TB é de difícil e prolongado tratamento. Por conta da diversidade fisiológica bacteriana encontrada na forma ativa da doença, diferentes antibióticos são utilizados e o tratamento requer criteriosa adesão, sob o risco de desenvolvimento de cepas resistentes aos fármacos de primeira linha. Quando isto acontece há a necessidade de tratamento com fármacos de segunda linha, que é consideravelmente mais oneroso, desgastante e de menor eficácia.

Apesar de existir forte apelo clínico e social na demanda de novos antibióticos, a quimioterapia para a TB permanece a mesma há décadas e não existe uma perspectiva promissora para que isso mude. A pesquisa e o desenvolvimento de novos antibióticos para doenças antigas esbarra em entraves econômicos e regulatórios, desmotivando a busca por fármacos inovadores (HWANG et al., 2015). Logo, a melhor compreensão dos mecanismos de ação dos antibióticos já existentes e em uso torna-se ainda mais importante para aumentar a eficácia do tratamento e diminuir o surgimento de resistência.

Embora testes *in vitro* com cada um dos antibióticos utilizados na terapia anti-TB apresentarem eficiência bactericida

ou bacteriostática comprovada em curtos períodos de tempo, variando de dias a semanas (De STEENWINKEL et al., 2010; PICCARO et al., 2013), a necessidade de tratamento prolongado na clínica (de 6 a 9 meses) nos leva a examinar de maneira minuciosa tais resultados. Questões como a importância da interação entre as células do sistema imune, o bacilo Mtb e os fármacos, bem como a acessibilidade dos fármacos aos locais onde a bactéria reside, seja no interior de macrófagos, nas lesões caseosas do granuloma ou nas cavidades pulmonares, devem ser consideradas quando avaliado a eficiência do tratamento *in vivo*.

A isoniazida, principal fármaco utilizado na quimioterapia da TB, parece ser a responsável pela morte inicial do bacilo, apresentando eficiente atividade bactericida inicial (ABI), demonstrada pela diminuição de 90% da carga bacilar presente no escarro de pacientes em apenas 2 dias de tratamento (JINDANI et al., 1980; DONALD et al., 1997; JINDANI et al., 2003; DONALD et al., 2004). No entanto, estudos farmacocinéticos demonstraram que a INH alcança concentrações muito baixas nas lesões pulmonares, que seriam incapazes de exercer efeito bactericida tão instantâneo. Além disso, casos de resistência em cepas MDR estão entre os mais comuns, ilustrando a necessidade de melhor compreensão dos mecanismos de ação da INH. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar os mecanismos que fundamentam a eficácia inicial da INH, com o intuito de compreender os meios pelos quais ela apresenta ABI tão eficaz.

Inicialmente, verificou-se qual seria a concentração necessária para reduzir o crescimento bacteriano através do ensaio colorimétrico de MTT. Após um período de incubação de 7 dias em diferentes concentrações de INH, constatou-se que a partir da concentração de 1 μM as bactérias encontram-se incapazes de realizar a conversão do MTT, apesar de ainda existirem bactérias vivas (como confirmado pela medida de unidades formadoras de colônias).

Assim, acreditando que a INH age em sinergismo com as células do sistema imune para desempenhar efeito imediato em 2 dias, as bactérias foram pré expostas à baixas concentrações de INH, a fim de investigar a influência do contato de bactérias extracelulares presentes nas lesões caseosas com o fármaco, antes de serem propriamente fagocitadas pelas células-alvo primárias, os macrófagos. A hipótese era que o contato direto com a INH modificaria a estrutura física da bactéria, uma vez que seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da síntese de ácidos micólicos, componentes da parede celular da bactéria. O tratamento com INH tornaria o bacilo mais frágil e suscetível à morte por ação do macrófago. De fato, já foi demonstrado que a isoniazida leva a alteração da parede celular de BCG (WINDER et al., 1970) e diminuição da quantidade de ácidos micólicos com consequente redução no crescimento de Mtb (TAKAYAMA et al., 1972). No entanto, os resultados mostraram que as baixas concentrações de INH não foram capazes de reduzir o crescimento bacteriano após a exposição ao antibiótico (indicado como 'pré-infecção'). Além disso, a taxa de fagocitose dos

macrófagos murinos (indicado como '*input*') ou a carga bacteriana intracelular foi a mesma entre as bactérias não tratadas e as tratadas com INH. Verificou-se também que a indução de TNF, importante mediador produzido na infecção por Mtb apresentou níveis semelhantes entre os grupos de bactérias tratadas e não tratadas com INH, sugerindo que o fármaco não foi capaz de induzir mudanças significativas na estrutura da bactéria. Tais mudanças poderiam provocar um reconhecimento distinto pelos macrófagos, seja influenciando a capacidade de fagocitar o patógeno ou de controlar seu crescimento intracelular, eventos que não foram vistos nestas abordagens experimentais.

Investigou-se ainda a possibilidade de a INH potencializar os mecanismos de *killing* dos macrófagos, aumentando a eficiência celular de extermínio do bacilo. Para isso, realizou-se dois protocolos experimentais: i) os macrófagos murinos infectados foram tratados com baixas concentrações de INH, ou ii) os macrófagos foram pré expostos ao antibiótico por 24h antes da infecção com o bacilo. Dessa forma, buscou-se mimetizar as células infectadas tratadas com INH (primeiro protocolo) ou células circulantes que entram em contato com o fármaco e só então são recrutadas ao local da infecção (segundo protocolo). No entanto, os resultados mostraram que em ambos os casos as baixas concentrações de INH também não alteraram a capacidade de fagocitose ou de controle do crescimento bacteriano intracelular.

Existem inúmeros trabalhos que demonstram a participação de outras células no controle da infecção por Mtb.

Esses estudos demonstram que ao invés de residir apenas em macrófagos, como previamente se pensava, o Mtb infecta diversos subtipos de células mielóides nos pulmões e que a população celular predominantemente infectada varia em cada estágio específico da infecção (revisado em SRIVASTAVA et al., 2014). A micobactéria pode orquestrar uma resposta inflamatória que recruta tipos celulares distintos durante a infecção (MARTINEAU et al., 2007; WOLF et al., 2007; DESVIGNES et al., 2012), pode ser internalizada por qualquer fagócito (EUM et al., 2010; BLOMGRAN et al., 2012), além das células poderem cooperar entre si a fim de otimizar o controle do patógeno. Além disso, subtipos distintos de células mielóides variam na capacidade de ativar células T CD4+ e CD8+ e suas funções efetoras, como produção de citocinas e atividade citotóxica, interferindo na resolução da doença.

Levando em consideração a interação células do sistema imune-patógeno-fármaco e a complexidade da estrutura multi celular em que a bactéria normalmente se encontra, adaptou-se o modelo de alguns autores nos quais uma estrutura celular semelhante ao granuloma é utilizada para o estudo dessa interação. Nesse modelo, leucócitos totais de doadores saudáveis são infectados com Mtb (MOI 10) e então plaqueados em poços cobertos com agarose, o que impede as células de aderirem ao fundo da placa e permite com que fiquem bem próximas umas das outras, remetendo-nos a conformação de um granuloma. Após 3 dias, diz-se que esse aglomerado celular adquiriu a estrutura conformacional semelhante a um granuloma

na forma ativa da doença, com células em estado necrótico e intensa replicação bacteriana.

De fato, a análise da estrutura do granuloma mostra que neste estágio da infecção existem bactérias presentes em alguns aglomerados celulares e, ainda, no interior das células. Pode-se verificar que os tipos celulares presentes no granuloma são os mesmos de infecções *in vivo* e que a frequência dessas células diminui ao longo do período de infecção. Essa redução reflete o aumento temporal de morte celular por necrose, também verificado nesse sistema e novamente comprova a semelhança com a fase ativa da doença. Ainda mais, verificou-se que a bactéria multiplica-se de maneira exponencial nesse sistema, explicando o aumento da frequência de células necróticas e servindo como mais um parâmetro de similaridade com granulomas ativos. Dessa maneira, pode-se dizer que este modelo de granuloma humano é uma ferramenta apropriada para avaliação da eficiência de fármacos antituberculose na fase ativa da doença.

Nesse estágio iniciou-se o tratamento com INH por 2 dias e logo em seguida verificou-se a carga bacteriana e outros parâmetros inflamatórios, a fim de avaliar o potencial bactericida inicial da INH. Portanto, é possível que durante a infecção por Mtb não só os macrófagos, mas o contato e os mediadores produzidos por células dendríticas, linfócitos, neutrófilos, entre outras células, sejam igualmente críticos para o controle da infecção. De fato, os dados estatísticos de que um terço da população mundial possui a forma latente da doença mas

apenas 5-10% evoluem para a fase ativa (WHO, 2014) deixa claro que o sistema imune é capaz de conter a infecção.

Assim, a fim de caracterizar a eficácia do tratamento nesse sistema, realizou-se a infecção do granuloma com diferentes multiplicidades de infecção (MOI) e esses agregados celulares foram tratados com diferentes concentrações de INH. Pode-se verificar que o tratamento com o fármaco reduz o crescimento bacteriano a partir da concentração de 1 μ M em todos os MOIs, de maneira dose dependente, com diferença significativa na concentração de 100 μ M. Além disso, ao realizar o tratamento de bactérias cultivadas em meio de cultura, paralelamente ao tratamento de bactérias no granuloma, verificou-se que a INH é capaz de conter o crescimento bacteriano de maneira mais eficaz em bactérias presentes no granuloma, sugerindo que as células ajudam no *killing* micobacteriano inicial promovido pelo tratamento com a INH.

A utilização de leucócitos humanos pode trazer grande variação de resposta devido à heterogeneidade de amostras humanas. Assim, resolveu-se considerar a resposta dos doadores ao teste de PPD. O ensaio de reatividade ao derivado proteico purificado (do inglês '*protein purified derivative*' - PPD) de *Mtb* baseia-se na observação da formação de uma região de endureção após a aplicação desse concentrado proteico intradermicamente. A positividade ao teste sugere um contato prévio com micobactérias, com pacientes infectados ou, ainda, por resposta à vacina BCG. Assim, os doadores foram separados em PPD positivo ou PPD negativo e os granulomas

foram formados e tratados como descrito anteriormente. O granuloma de doadores PPD positivo possui maior controle da infecção, com menos bactérias. No entanto, o tratamento com INH não ampliou essa diferença.

Acredita-se que doadores PPD positivo possuam células T de memória a antígenos micobacterianos, capazes de aumentar a resposta e o controle à infecção por Mtb. No entanto, como a positividade ao teste de PPD não é específica a antígenos de Mtb, uma vez que a resposta pode ocorrer devido ao contato com outras micobactérias presentes no ambiente ou à vacina BCG, realizou-se o ensaio de *priming in vitro* para certificar-se que células T antígeno-específicas fizessem parte dessa estrutura. Dessa forma, linfócitos T de doadores PPD negativo foram primados por 7 dias com antígenos de Mtb gama irradiado, promovendo a obtenção de células T antígeno específicas. Ao adicionar-se os linfócitos primados ao granuloma, pode-se aumentar a eficiência de *killing* da bactéria, e esse aumento pode ser relacionado com a maior frequência de células T efectoras de memória presentes na cultura desses doadores. Conseqüentemente, o granuloma de doadores com células T primadas apresentou menor frequência de células T de memória central. Sabe-se que as células T de memória podem ser classificadas em 2 tipos: central (T_{CM}) e efectora (T_{EM}). Vários estudos demonstraram que esses tipos celulares possuem funções efectoras diferentes em resposta à estimulação antigênica (ELY et al., 2003; CHEN et al., 2005). Apesar de ambos os tipos de memória celular produzirem grande

quantidade de citocinas efetoras como IFN- γ e TNF após a estimulação antigênica, uma maior quantidade de células T_{CM} também produz IL-2, o que poderia aumentar a sua habilidade de proliferar em resposta ao antígeno. Em contraste, células T_{EM} têm maior atividade lítica comparada às T_{CM}, provavelmente pelo aumento da expressão de perforinas e pela capacidade de expressar proteínas citolíticas como granzima B, aumentando a sua habilidade em matar rapidamente células infectadas (WOODLAND & KOHLMEIER, 2009).

Assim, o balanço entre os dois subtipos de células de memória sugere o maior controle do crescimento micobacteriano no granuloma com células primadas. No entanto, o tratamento com INH não potencializou o efeito das células T primadas, sugerindo que a eficácia inicial de INH não está relacionada com os linfócitos T antígeno-específicos. A partir de então, nos experimentos subsequentes os doadores não foram separados quanto à resposta ao teste de PPD, mas invariavelmente havia doadores positivos e negativos entre as amostras.

Tais resultados mostram que populações distintas de células T possuem a capacidade de interferir no controle do crescimento bacteriano. Logo, resolveu-se investigar o papel da população de células T- $\gamma\delta$ nesse modelo, cujo efeito protetor em infecções micobacterianas já foi descrito (DERRICK et al., 2007). Nesse contexto, Pinheiro e colaboradores (2009) demonstraram que pacientes com a forma branda da doença apresentam maior frequência de células T- $\gamma\delta$ CD4⁺CD8⁻ (duplo-negativo) produtoras de IFN- γ , enquanto pacientes com quadro

mais grave de TB têm menor frequência dessa população, e são produtoras de IL-10, sugerindo uma diferença de respostas dependente da gravidade da infecção. Além disso, Yoshida (2001) demonstrou que a INH provoca redução no número de células T- $\gamma\delta$ produtoras de IFN- γ após o início do tratamento com INH em pacientes com TB pulmonar ativa, sugerindo uma ação anti-inflamatória do fármaco. Assim, analisou-se a frequência desse subtipo celular presente no granuloma após o tratamento com INH. Verificou-se, no entanto, que a frequência dessas células, seja CD4+, CD8+ ou DN- $\gamma\delta$ parece não ser influenciada nas fases iniciais de tratamento com INH.

Ainda, de maneira mais drástica, a fim de verificar o envolvimento das células T no efeito da INH durante as fases iniciais de tratamento, reduziu-se em 70% a frequência de células CD3+ do granuloma, a partir de separação magnética com *microbeads*, mas ainda assim não se observou alteração na carga bacteriana em decorrência do tratamento. O conjunto de resultados apresentados sugere que a INH não age diretamente em células T para exercer seu efeito micobactericida inicial.

A seguir, investigou-se a influência de monócitos nesse modelo. Por serem os precursores das células alvo primária de Mtb, considerou-se que o tratamento com INH poderia interferir no controle bacteriano promovido por essa população e poderia explicar como as baixas concentrações de INH apresentam resultado bactericida tão eficiente. Assim, realizou-se o tratamento de monócitos com INH, mimetizando as células circulantes que recebem o fármaco e são recrutadas para o local

da infecção. Investigou-se também o efeito do recrutamento dessas células em granulomas tratados com INH. Em ambas as condições, o tratamento com INH manteve o mesmo efeito bactericida visto em granulomas sem a adição de monócitos, pré-expostos ou não ao antibiótico, sugerindo novamente que a resposta bactericida inicial da INH não age diretamente nessa população celular para exercer seu efeito.

A seguir, verificou-se os níveis de importantes citocinas pró-inflamatórias envolvidas no controle da infecção por *Mtb*, IL-1 β e TNF. Ambas citocinas estão envolvidas na resposta do hospedeiro contra infecções micobacterianas, já tendo sido demonstrado que animais nocaute para essas citocinas ou seus receptores apresentam menor sobrevivência e maior carga bacteriana (FLYNN et al., 1995; MAYER-BARBER et al., 2010). Além disso, outras ações promovidas por essas citocinas que corroboram seu papel na infecção por *Mtb* incluem a ativação de macrófagos e estímulo à produção de quimiocinas (RAY et al., 2009; LIN et al., 2010) e atividade antimicrobiana em macrófagos murinos e humanos (JAYARAMAN et al., 2013). Outra evidência do papel do TNF no controle da TB é a reativação de casos de TB latente com o uso de terapia anti-TNF (GARDAM et al., 2003). No entanto, não existem relatos que demonstrem a participação dessas citocinas durante o tratamento com a INH. Dessa forma, verificou-se se elas estariam envolvidas no mecanismo inicial bactericida desse antibiótico.

Após a infecção com *Mtb*, a produção de ambas as citocinas mostrou-se aumentada em relação ao granuloma não

infectado, corroborando a participação das mesmas na infecção com a micobactéria. Mesmo após altas concentrações de INH, nas quais vê-se redução bacteriana nos granulomas, a concentração de IL-1 β e TNF manteve-se semelhante ao grupo não tratado, sugerindo que a diminuição da carga bacilar independe da ação do fármaco nas células do granuloma. Ainda, a fim de averiguar a influência dessas citocinas na resposta à terapia, bloqueou-se a ação das mesmas através do uso do antagonista de receptor de IL-1 β , IL-1ra, e anticorpo monoclonal anti-TNF, adalimumabe; ou ainda, realizou-se a adição exógena dessas citocinas ao granuloma. Em nenhuma das condições, seja no bloqueio ou na adição das referidas citocinas, houve mudança no controle do crescimento bacteriano após o tratamento com INH, sugerindo que o efeito inicial do fármaco não é influenciado por estas citocinas. Esses dados corroboram a observação de Urbaschek (1991) de que o efeito protetor da INH contra endotoxina letal de *E.coli* não é devido a resposta supressora da síntese/liberação de TNF em monócitos *in vitro*.

Outros mediadores também foram verificados, como IL-12p70, IL-10, IL-6 e IL-8. A IL-12 é uma citocina produzida por fagócitos e APCs, importante para a produção de IFN- γ por células T e *natural killer* e auxílio na diferenciação de células T CD4+. Já foi demonstrado a sua participação na resolução da TB em camundongos (FLYNN et al., 1995; COOPER et al., 1997). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória cuja ativação mostrou-se crítica para o balanço com IFN- γ na regulação de infecções micobacterianas (JAMIL et al., 2007). Além disso, a deficiência

de IL-10 em camundongos levou a diminuição da resposta anti-Mtb (MURRAY e YOUNG, 1999). No modelo de granuloma humano, os níveis detectados de IL-12p70 e IL-10 foram baixos, não possibilitando a inferência da participação dessas citocinas no mecanismo bactericida da INH. Tais concentrações corroboram as quantidades encontradas em pacientes com TB ativa (VERBON et al., 1999; HASAN et al., 2009). A IL-8 é uma citocina quimioatraente de neutrófilos cujo papel na infecção por Mtb não é bem conhecido e a IL-6 parece estar envolvida no *priming* de células T (LEAL et al., 2001) bem como na proteção de camundongos infectados via produção de IFN- γ (LADEL et al., 1997; SAUNDERS et al., 2000). Ambas citocinas apresentaram-se reduzidas quando comparadas ao grupo não tratado, nas duas concentrações de tratamento (0,01 e 100 μ M). Como não há diferença entre a quantidade de citocina produzida entre as concentrações de tratamento, mas há diferença na redução da carga bacteriana no granuloma promovida entre elas, pode-se supor que a diminuição nas quantidades de cada mediador não é fator determinante para o efeito bactericida do antibiótico. No entanto, o papel dessas citocinas no tratamento com INH ainda precisa ser melhor investigado.

Assim, com base nos experimentos controlados de nosso estudo não foi possível comprovar a hipótese original levantada no início da investigação do sinergismo entre as células do granuloma e o fármaco para promover o efeito bactericida inicial da INH.

Finalmente, como respostas celulares e de citocinas parecem não influenciar os efeitos iniciais do tratamento com INH, investigou-se se o fármaco estaria agindo de maneira direta na bactéria. Para tanto, usou-se cepas clínicas resistentes à INH, 255R e 267R, com mutações bem conhecidas desse fenótipo, como a mutação S315T no gene *katG* e realizou-se a infecção do granuloma. Pode-se observar que após o tratamento com INH, a concentração mais alta de INH reduziu o crescimento bacteriano de ambas as cepas resistentes, sugerindo um mecanismo independente de *katG*, uma vez que essas cepas possuem mutação nesse gene. Ainda mais, quando comparado à redução promovida na cepa H37Rv, verificou-se que a redução do crescimento das cepas resistentes foi menor do que a promovida sobre a cepa sensível H37Rv sugerindo que o efeito do fármaco, de maneira majoritária, ocorre dependentemente de *katG*. Além disso, os níveis de IL-1 β e TNF induzidos pela infecção com essas cepas não foi diferente do produzido pela cepa sensível H37Rv, mostrando que não há diferença na ativação da resposta celular induzida por elas.

Portanto, procurando ainda verificar a ação da INH em sinergia com as células do granuloma, realizou-se o ensaio de coinfeção com ambas as cepas, sensível (H37Rv) e resistente (255R) à INH. O complexo INH-metabólitos (INH-metab), proveniente da ativação do antibiótico pela KatG da bactéria H37Rv poderia agir sobre as células do granuloma, ativando-as e promovendo a morte da cepa resistente 255R, que não sofre redução via fármaco. Dessa forma, explicar-se-ia o mecanismo

independente de *katG* pelo qual o crescimento da cepa resistente 255R, incapaz de realizar a conversão do fármaco, é contido pela INH, como verificado na figura 20B. Se a hipótese fosse verdadeira, o crescimento da cepa resistente seria menor em granulomas coinfectedos com a cepa sensível quando comparado ao seu crescimento em granuloma infectado apenas pela cepa resistente. Ainda, a fim de garantir que os metabólitos (INH-metab) derivados da conversão da INH pela cepa sensível estivessem presentes no granuloma, a coinfecção foi realizada com proporção maior de cepas sensíveis, capazes de assegurar a conversão do fármaco. Vale ressaltar que a cepa 255R possui mutação no gene *inhA*, de maneira que a maior redução no seu crescimento em granulomas coinfectedos aconteceria via *killing* celular, uma vez que ambas as enzimas envolvidas na morte via fármaco são mutadas nessa cepa.

Assim, verificou-se que a taxa de redução da cepa 255R foi semelhante no granuloma coinfectedo quando comparado à redução ocorrida na infecção apenas com a cepa 255R, invalidando tal suposição. A possibilidade de complexos INH-metab agirem sobre cepas resistentes não pode ser verificada pois a bactéria 255R também possui mutação no gene *inhA*, o alvo seguinte da molécula INH-NAD para inibição da síntese de ácidos micólicos. Assim, é possível que a metabolização da INH pela cepa H37Rv não apresentou efeito bactericida na cepa 255R por encontrar a próxima enzima do ciclo também mutada nessa bactéria. Tal hipótese poderia ser avaliada com a utilização de uma cepa com mutação apenas no gene *katG*, mas

com o gene *inhA* funcional. Ainda mais, a capacidade dos metabólitos da conversão da INH agirem de modo mais abrangente e não apenas localmente à bactéria que ativou o antibiótico é puramente especulativa, uma vez que não existem dados que demonstrem tal efeito. Na realidade, Kim e colaboradores (2012) sugeriram que fatores liberados pela bactéria após o tratamento com INH são capazes de induzir autofagia na célula do hospedeiro, indicando que existem produtos derivados da ação de fármacos anti-Mtb liberados pela bactéria.

Finalmente, com a coinfeção pode-se ainda concluir que o complexo INH-metab não ativou as células do granuloma de maneira a aumentar a capacidade de *killing* das bactérias. Um modelo proposto do mecanismo de ação inicial da INH em modelo *in vitro* de granuloma humano encontra-se esquematizado na figura 23.

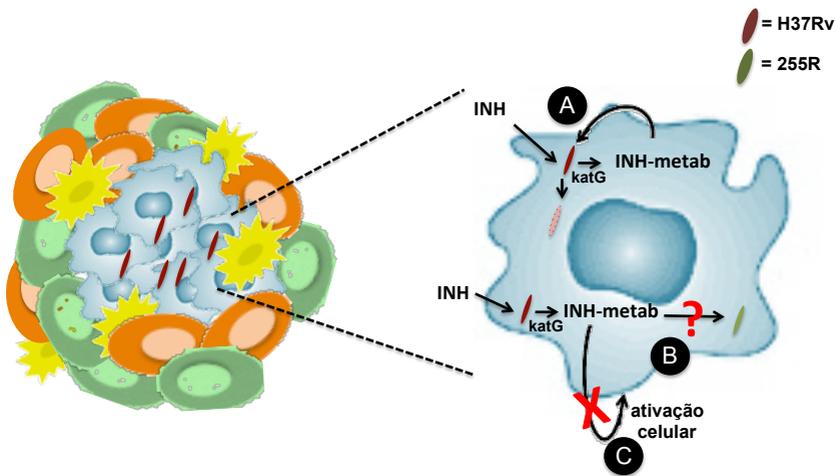


Figura 23. Esquema ilustrativo do mecanismo de ação inicial da INH proposto em modelo *in vitro* de granuloma humano. (A) O fármaco INH age diretamente na bactéria, sendo ativado à sua forma ativa via KatG, com formação do complexo INH-metab. Esse complexo age sobre a síntese de ácidos micólicos, levando à morte bacteriana. (B) O complexo INH-metab pode agir sobre bactérias que não ativaram o fármaco, (C) mas parece não agir sobre as células para promover ativação celular, interferindo no *killing* bacteriano.

Ainda mais, é possível que a INH module negativamente a resposta inflamatória no interior do granuloma. Tal alternativa vai diretamente contra os achados clínicos da potente ABI da INH, mas corrobora os resultados de ineficiência das baixas doses do fármaco no modelo de granuloma humano. Além disso, a quantificação da ABI da INH é uma medida indireta de sua eficiência, através da carga bacilar expelida no escarro dos pacientes, não avaliando a quantidade bacteriana presente nas cavidades pulmonares e, portanto, a real eficácia do fármaco no seu local de ação. Assim, um menor quadro inflamatório

localizado pode influenciar o número de células expelidas para a mensuração do número de bactérias no escarro dos pacientes.

O pressuposto de algumas hipóteses que permeiam a quimioterapia da TB estão baseados em dogmas há muito aceitos, mas fracamente provados. Um exemplo disso é a habitual aceitação de que o efeito da INH refere-se à depleção de bacilos em fase exponencial de crescimento. Alguns autores demonstraram que seu efeito pode ser limitado à morte de cepas sensíveis e emergência de cepas resistentes ao fármaco (GUMBO et al., 2006), bem como o desenvolvimento de cepas tolerantes, que adquirem momentaneamente o fenótipo resistente sem apresentar quaisquer mutações que validem tal resistência (AHMAD et al., 2009; WAKAMOTO et al., 2013).

A possibilidade de o tratamento com INH desencadear a diminuição do quadro inflamatório também pode correlacionar-se com o tipo de morte celular no granuloma. Acredita-se que a necrose é um mecanismo utilizado pela bactéria para escapar do macrófago e das respostas de defesa do hospedeiro e se disseminar; enquanto a apoptose está associada a diminuição da viabilidade do patógeno (DIVANGAHI et al., 2009; LEE et al., 2011). Nesse contexto, foi demonstrado que a INH promove a indução de apoptose de células T CD4+ ativadas, resultando em comprometimento da resposta imune contra Mtb (TOUSIF et al., 2014).

Também foi demonstrado que eicosanóides regulam o programa de morte celular em macrófagos humanos e murinos infectados por Mtb. Foi definido, por exemplo, que a

prostaglandina (PG)-E2 é um mediador lipídico pró-apoptótico que protege contra a necrose. Em contraste, a lipoxina (LX)-A4 é um mediador pró-necrótico que suprime a síntese de PGE2 resultando em dano mitocondrial e inibição de mecanismos de reparo da membrana plasmática; assim, levando à indução de necrose. Dessa forma, o balanço entre mediadores determina se a infecção tende para a morte celular via apoptose ou necrose, influenciando a resolução da doença (DIVANGAHI et al., 2013). Nessa linha de evidências, estudo de Parthé e Hagmann (1990) demonstrou que a INH inibe a oxidação de leucotrienos, prolongando os efeitos pró-inflamatórios e indução de necrose deste eicosanóide. Portanto, o balanço entre mediadores após o tratamento com a INH pode interferir nas vias de morte celular do granuloma, alterando diretamente a viabilidade do bacilo nesse sistema.

Além disso, a existência de DNA extracelular em infecções com Mtb poderia influenciar diretamente as respostas induzidas pelas células que compõem o granuloma. Nesse contexto, revisão recente de nosso grupo destacou a importância do reconhecimento de ácidos nucleicos de Mtb para a resolução da infecção, mostrando que o patógeno pode utilizar vias de escape da resposta imune devido ao reconhecimento desse antígeno (YAMASHIRO et al., 2014). Assim, no interior de granulomas onde há intensa replicação bacteriana, é possível imaginarmos que DNA citosólico pode ser encontrado. Esse material pode vir de três fontes: i) da quebra e digestão de bactérias mortas por enzimas lisossomais após a entrada em

macrófagos, ii) de bactérias vivas, saindo do fagossomo para o citosol e iii) de bactérias em divisão que expõem seu DNA ao se multiplicar. Já foi relatado que esse reconhecimento pode reduzir a ativação de macrófagos humanos, sugerindo que a ativação atenuada de TLR9 contribui para uma resposta insuficiente contra o patógeno (KIEMER et al., 2009). Dessa forma, o menor controle do patógeno devido a uma ativação celular atenuada pode contribuir para a ineficácia das baixas concentrações da INH no modelo de granuloma.

É importante ressaltar que, apesar de possuir características importantes para a avaliação da atividade bactericida de fármacos durante a fase ativa da doença, como a presença de diversos tipos celulares, processo necrótico em desenvolvimento e crescimento bacteriano exponencial, o modelo de granuloma humano *in vitro* é apenas uma ferramenta de estudo que possui muitas limitações. Assim, embora esse sistema possua diversos tipos celulares presentes em uma infecção *in vivo* e mimetize de maneira mais fidedigna o meio em que o bacilo se encontra, ele é restringido por ser um sistema fechado, sem trânsito e reposição constante de células, sem a comunicação bacteriana com outras células extra-granuloma e por não estar incluso no tecido pulmonar. Todas essas variáveis podem influenciar o efeito bactericida da INH sobre o patógeno.

Além disso, todos os parâmetros analisados nesse modelo foram avaliados nas fases iniciais do tratamento com INH, utilizada apenas por 2 dias e seu efeito observado logo no terceiro dia. Assim, como era intuito do trabalho verificar o efeito

bactericida inicial da INH, não é intenção extrapolar os achados deste trabalho para períodos de tratamento mais prolongados. Logo, o efeito de células T e monócitos bem como o de citocinas deve, de maneira bem provável, interferir na resolução da infecção e ainda no tratamento com antibióticos. Ainda, a suposição de baixas quantidades chegando nos locais onde a bactéria se encontra, como pulmões e lesões caseosas deve ser considerada com cuidado, uma vez que esses estudos farmacocinéticos são difíceis de serem realizados em amostras humanas e os modelos animais utilizados podem não refletir concentrações verdadeiras durante o tratamento clínico.

Diante dos resultados apresentados até o momento, não há evidências que comprovem a ABI da INH em baixas doses no modelo de granuloma humano. No entanto, é necessário reavaliar os dados da literatura que predizem tal fato, bem como considerar outros parâmetros que podem estar envolvidos no mecanismo bactericida do fármaco.

6 Conclusões

Os resultados apresentados nos levam a concluir que a INH exerce seu efeito bactericida durante as fases iniciais do tratamento agindo de maneira direta sobre o bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, parcialmente dependente de Katg, sem a influência das células que compõem o granuloma ou seus mediadores pró-inflamatórios.

7 Referências Bibliográficas

ABE, C.; KOBAYASHI, I.; MITARAI, S.; WADA, M.; KAWABE, Y.; TAKASHIMA, T.; SUZUKI, K.; SNG, L.-H.; WANG, S.; HTAY, H. H.; OGATA, H. Biological and molecular characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates with low-level resistance to isoniazid in Japan. **J. Clin. Microbiol.** 2008, 46, 2263–2268.

ABEL B, THIEBLEMONT N, QUESNIAUX VJ, BROWN N, MPAGI J, MIYAKE K, BIHL F, RYFFEL B. Toll-like receptor 4 expression is required to control chronic *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. **J Immunol.** 2002,169(6):3155-62.

ADAMS, DO. The granulomatous inflammatory response: a review. **Am J Pathol** . 1976. 84:164–192.

AHMAD Z, KLINKENBERG LG, PINN ML, FRAIG MM, PELOQUIN CA, BISHAI WR, NUERMBERGER EL, GROSSET JH, KARAKOUSIS PC. Biphasic kill curve of isoniazid reveals the presence of drug-tolerant, not drug-resistant, *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig. **J Infect Dis.** 2009; 200, 1136-43.

ALBERT A. The affinity of isonicotinic hydrazide for metals. **Experientia.** 1953, 9(10):370.

ALGOOD HM, CHAN J, FLYNN JL. Chemokines and tuberculosis. **Cytokine Growth Factor Rev** 2003. 14: 467–477.

ALGOOD, H. M., FLYNN, JL. CCR5-Deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. **J. Immunol.** 2004. 173: 3287–3296.

ALEXOPOULOU L, THOMAS V, SCHNARE M, LOBET Y, ANGUITA J, SCHOEN RT, et al. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. **Nat Med.** 2002;8:878–84.

ARMSTRONG, J. A.; HART, P. D. Response of cultured macrophages to *mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. **J Exp Med**, 1971, 134, 713-40.

ASSELINÉAU, J. Sur la structure chimique des acides mycoliques isolés de *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*; détermination de la position de l'hydroxyle. C.R. **Hebd. Seances Acad. Sci.**, 1950, 230.

BAFICA, A. et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. **J Clin Invest**, 2005. v. 115, n. 6, p. 1601-6.

BAFICA, A., SCANGA, C. A, FENG, C. G., LEIFER, C., CHEEVER, A., & SHER, A. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **The Journal of Experimental Medicine**, 2005. 202, 1715–24.

BALASUBRAMANIAN V et al. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. **Tuber Lung Dis** . 1994. 75:168–178.

BALDWIN DR1, WISE R, ANDREWS JM, ASHBY JP, HONEYBOURNE D. Azithromycin concentrations at the sites of pulmonary infection. **Eur Respir J**. 1990, 886-90

BALDWIN SL, CHING LK, PINE SO, MOUTAFTSI M, LUCAS E, VALLUR A, ORR MT, BERTHOLET S, REED SG, COLER RN. Protection against tuberculosis with homologous or heterologous protein/vector vaccine approaches is not dependent on CD8+ T cells. **J Immunol**. 2013; 2514-25.

BARCLAY WR, EBERT RH, LE ROY GV, MANTHEI RW, ROTH LJ. Distribution and excretion of radioactive isoniazid in tuberculous patients. **JAMA** 1953; 151:1384–1388.

BARDOU, F et al. Mechanism of isoniazid uptake in *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology** 1998. 144.9, 2539–2544.

BEGUM D, UMEMURA M, YAHAGI A, OKAMOTO Y, HAMADA S, OSHIRO K, MATSUZAKI G. Accelerated induction of mycobacterial antigen-specific CD8+ T cells in the *Mycobacterium tuberculosis*-infected lung **Immunology**. 2009 Dec;128(4):556-63.

BEHAR SM, MARTIN CJ, NUNES-ALVES C, DIVANGAHI M, REMOLD HG. Lipids, apoptosis, and cross-presentation: links in the chain of host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbes Infect**. 2011; 13(8-9):749-56.

BEKKER LG, MAARTENS G, STEYN L, KAPLAN G. Selective increase in plasma tumor necrosis factor- α and concomitant clinical deterioration after initiating therapy in patients with severe tuberculosis. **J Infect Dis** 1998. 178: 580–584.

BERNARDES-GÉNISSON V, DERAÈVE C, CHOLLET A, BERNADOU J, PRATVIEL G. Isoniazid: an update on the multiple mechanisms for a singular action. **Curr Med Chem**. 2013;20(35):4370-85. Review.

BERNSTEIN JW, LOTT A, STEINBERG BA, YALE HL. Chemotherapy of experimental tuberculosis. **Am. Rev. Tuberc**. 1952, 65:357–74.

BEUTLER, B., D. GREENWALD, J. D. HULMES, M. CHANG, Y. C. PAN, J. MATHISON, R. ULEVITCH, A. CERAMI. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. **Nature** 1985. 316:552. 61.

BIRKNESS KA, GUARNER J, SABLE SB, TRIPP RA, KELLAR KL, BARTLETT J, QUINN FD. An *in vitro* model of the leukocyte interactions associated with granuloma formation in *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Immunol Cell Biol**. 2007; 85(2):160-8.

BLOMGRAN R, DESVIGNES L, BRIKEN V, ERNST JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. **Cell Host Microbe** 2012;11:81–90.

BLOOM BR, MURRAY CJ. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. **Science**. 1992; 257(5073):1055-64.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **J Exp Med**. 1991, 174, n. 6, p. 1549-55.

BOURIGAULT,ML, VACHER,R, ROSE,S, OLLEROS, SL et al., Tumor necrosis factor neutralization combined with chemotherapy enhances Mycobacterium tuberculosis clearance and reduces lung pathology. **Journal of Clinical and Experimental Immunology**, 2013. vol.2,no. 1, pp.124–134.

BÖYUM A. Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose, dextran, and ficoll as erythrocyte aggregating agents. **Scand J Clin Lab Invest Suppl.** 1968;97:31-50.

BRANDT, FA; LLOYD, DL. Differential staining for *M. tuberculosis* and *M. leprae*; a modification of the Ziehl-Neelsen stain. **Lab Invest.** 1954 Jul-Aug;3(4):296-302.

BRASIL. Programa nacional de controle da tuberculose PNCT. Brasília: DIVE 2009.

BRENNAN, P.J., NIKAIIDO, H. The envelope of mycobacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 1995. 64, 29–63.

BRIEGER EM, COSSLETT VE, GLAUERT AM. Action of antibiotics on avian tubercle bacilli studied with the electron microscope. **Nature.** 1953 , 171(4344):211-2.

BRODSKYN C, BEVERLEY SM, TITUS RG. Virulent or avirulent (dhfr-ts-) *Leishmania major* elicit predominantly a type-1 cytokine response by human cells *in vitro*. **Clin Exp Immunol.** 2000, 299-304.

BROSCH, R. et al. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 6, p. 3684-9, Mar 19 2002. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424.

BULUT Y, MICHELSEN KS, HAYRAPETIAN L, ET AL. *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. **J Biol Chem.** 2005;280(22):20961–7.

BURHAN E, RUESEN C, RUSLAMI R, GINANJAR A, MANGUNEGORO H, ASCOBAT P, DONDEERS R, VAN CREVEL R, AARNOUTSE R. Isoniazid, rifampin, and pyrazinamide plasma concentrations in relation to treatment response in Indonesian pulmonary tuberculosis patients. **Antimicrob Agents Chemother.** 2013 Aug;57(8):3614-9.

CASETTI, R, MARTINO, A. The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. **Cellular & Molecular Immunology**, 2008. vol. 5, no. 3, pp. 161–

170.

CHEN AM, KHANNA N, STOHLMAN SA, BERGMANN CC. Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis. **J. Virol.** 2005; 79, 4700–4708.

CHIDEYA S, WINSTON CA, PELOQUIN CA, BRADFORD WZ, HOPEWELL PC, WELLS CD, REINGOLD AL, KENYON TA, MOETI TL, TAPPERO JW. Isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide pharmacokinetics and treatment outcomes among a predominantly HIV-infected cohort of adults with tuberculosis from Botswana. **Clin Infect Dis.** 2009; 48(12):1685-94.

CLAY H, VOLKMAN HE, RAMAKRISHNAN L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. **Immunity** 2008. 29:283–294 39.

COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature.** 1998; 393(6685):537-44.

COLEMAN CM. A proposed mode of action for isoniazid in the tubercle bacillus and other biological systems. **Am Rev Tuberc.** 1954, 1062-3.

CONTE JE JR, GOLDEN JA, MCQUITTY M, KIPPS J, DUNCAN S, MCKENNA E, ZURLINDEN E. Effects of gender, AIDS, and acetylator status on intrapulmonary concentrations of isoniazid. **Antimicrob Agents Chemother.** 2002, 2358-64.

COOK, G. M. et al. Physiology of mycobacteria. **Adv Microb Physiol**, v. 55, p. 81-182, 318-9, 2009. ISSN 0065-2911 (Print)0065-2911.

COOPER AM, MAGRAM J, FERRANTE J, ORME IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Exp Med** 1997; 186:39 45.

COOPER, A. M.; MAYER-BARBER, K. D.; SHER, A. Role of innate cytokines in mycobacterial infection. **Mucosal Immunol**, 2011. v. 4, n. 3, p. 252-60.

COURT, N. et al. Partial redundancy of the pattern recognition receptors, scavenger receptors, and C-type lectins for the long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. **J Immunol**, 2010. v. 184, n. 12, p. 7057-70.

CUNNINGHAM RS, SABIN FR, SUGIYAMA S, KINDWALI JA. The role of the monocyte in tuberculosis. **Bull Johns Hopkins Hosp** 1925;37:231.

CYMERMAN-CRAIG, J.; WILLIS, D.; RUBBO, S.D.; EDGAR, J. Mode of action of isonicotinic hydrazide. **Nature**, 1955, 176(4470), 34-35.

DAMBUZA I, KEETON R, ALLIE N, HSU NJ, RANDALL P, SEBESHO B, FICK L, QUESNIAUX VJ, JACOBS M. Reactivation of *M. tuberculosis* infection in trans-membrane tumour necrosis factor mice. **PLoS One**. 2011;6(11):e25121.

DAVIS JM, RAMAKRISHNAN L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. **Cell** 2009;136:37– 49.

DE LIBERO G, MORI L. How T cells get grip on lipid antigens. **Curr. Opin. Immunol**. 2008. 20:96–104.

DE STEENWINKEL JE, DE KNEGT GJ, TEN KATE MT, VAN BELKUM A, VERBRUGH HA, KREMER K, VAN SOOLINGEN D, BAKKER-WOUDENBERG IA. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **J Antimicrob Chemother**. 2010; 65(12):2582-9.

DERRICK SC, MORRIS SL. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression. **Cell Microbiol**. 2007. 9:1547–1555.

DESVIGNES L, WOLF AJ, ERNST JD. Dynamic roles of type I and type II IFNs in early infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**. 2012 Jun 15;188(12):6205-15.

DINARELLO CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annu Rev Immunol** 2009. 27:519–550 295.

DIVANGAHI M, BEHAR SM, REMOLD H. Dying to live: how the death modality of the infected macrophage affects immunity to tuberculosis. **Adv Exp Med Biol.** 2013;783:103-20.

DIVANGAHI M, CHEN M, GAN H, DESJARDINS D, HICKMAN TT, LEE DM, FORTUNE S, BEHAR SM, REMOLD HG. *Mycobacterium tuberculosis* evades macrophage defenses by inhibiting plasma membrane repair. **Nat Immunol.** 2009; 10(8):899-906.

DIVANGAHI M, et al. NOD2-deficient mice have impaired resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection through defective innate and adaptive immunity. **J Immunol,** 2008, v. 181, n. 10, p. 7157-65.

DONALD PR, SIRGEL FA, VENTER A, PARKIN DP, SEIFART HI, VAN DE WAL BW, WERELY C, VAN HELDEN PD, MARITZ JS. The influence of human N-acetyltransferase genotype on the early bactericidal activity of isoniazid. **Clin Infect Dis.** 2004 Nov 15;39(10):1425-30.

DONALD PR, SIRGEL FA, BOTHA FJ, SEIFART HI, PARKIN DP, VANDENPLAS ML, VAN DE WAL BW, MARITZ JS, MITCHISON DA. 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.

DUBNAU E, CHAN J, RAYNAUD C, MOHAN VP, LANÉELLE MA, YU K, QUÉMARD A, SMITH I, DAFFÉ M. Oxygenated mycolic acids are necessary for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Mol Microbiol.** 2000 May;36(3):630-7.

DYE C, WILLIAMS BG. The population dynamics and control of tuberculosis. **Science.** 2010; 328(5980):856-61.

EGEN JG, ROTHFUCHS AG, FENG CG, WINTER N, SHER A, GERMAIN RN. Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. **Immunity.** 2008; 28:271–284.

ELVANG T, CHRISTENSEN JP, BILLESKOV R, THI KIM THANH HOANG T, HOLST P, THOMSEN AR, ANDERSEN P, DIETRICH J. CD4 and CD8 T cell responses to the *M. tuberculosis* Ag85B-TB10.4

promoted by adjuvanted subunit, adenovector or heterologous prime boost vaccination. **PLoS One**. 2009; 4(4):e5139.

ELY, K. H. *et al.* Nonspecific recruitment of memory CD8⁺ T cells to the lung airways during respiratory virus infections. **J. Immunol**. 2003; 170, 1423–1429.

ENGELE, M. *et al.* Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol** 2002;168, 1328–1337.

ERUSLANOV EB, LYADOVA IV, KONDRATIEVA TK, *et al.* Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. **Infect Immun**. 2005;73:1744-1753

EUM, SY, *et al.* Neutrophils are the predominant infected phagocytic cells in the airways of patients with active pulmonary TB. **Chest** 2010;137:122–128.

FABRI, M. *et al.* Vitamin D is required for IFN-gamma-mediated antimicrobial activity of human macrophages. **Sci Transl Med**, 2011. v. 3, n. 104, p. 104ra102.

FALLAHI-SICHANI M, FLYNN JL, LINDERMAN JJ, KIRSCHNER DE. Differential risk of tuberculosis reactivation among anti-TNF therapies is due to drug binding kinetics and permeability. **J Immunol**. 2012 Apr 1;188(7):3169-78.

FELDMANN, M., MAINI, RN. Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? **Annu. Rev. Immunol**. 2001. 19:163.

FLYNN JL, CHAN J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr. Opin. Immunol*. 2003; pp. 450–455.

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, CHAN J, TRIEBOLD KJ, PFEFFER K, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. **Immunity**. 1995; 2: 561–572.

FLYNN JL, GOLDSTEIN MM, TRIEBOLD KJ, SYPEK J, WOLF S, BLOOM BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *M. tuberculosis* infection. **J Immunol** 1995; 155:2515-24.

FORTUNE SM, SOLACHE A, JAEGER A, HILL PJ, BELISLE JT, BLOOM BR, RUBIN EJ, ERNST JD. Mycobacterium tuberculosis inhibits macrophage responses to IFN-gamma through myeloid differentiation factor 88-dependent and -independent mechanisms. **J Immunol**. 2004 May 15;172(10):6272-80.

FOX HH.. The chemical approach to the control of tuberculosis. **Science** 1952;116:129-34.

GARDAM, M.A., KEYSTONE, E.C., MENZIES, R., MANNERS, S., SKAMENE, E., LONG, R., AND VINH, D.C. Anti-tumour necrosis factor agents and tuberculosis risk: Mechanisms of action and clinical management. **Lancet Infect. Dis.**2003. 3, 148-155.

GEIJTENBEEK, T.B., VAN VLIET, S.J., KOPPEL, E.A., SANCHEZ-HERNANDEZ, M., VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M., APPELMELK, B., AND VAN KOOYK, Y. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. **J Exp Med** . 2003 197: 7-17.

GENGENBACHER, M.; KAUFMANN, S.H.E. *Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy. **FEMS Microbiol Rev**. 2012 May;36(3):514-32.

GILLESPIE SH, GOSLING RD, UIISO L, SAM NE, KANDUMA EG, MCHUGH TD. Early bactericidal activity of a moxifloxacin and isoniazid combination in smear-positive pulmonary tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**. 2005 Dec;56(6):1169-71.

GLICKMAN MS, JACOBS WR Jr. Microbial pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis: dawn of a discipline. **Cell**. 2001; 104(4):477-85.

GRIFFIN JE, PANDEY AK, GILMORE SA, MIZRAHI V, MCKINNEY JD, BERTOZZI CR, SASSETTI CM. Cholesterol catabolism by Mycobacterium tuberculosis requires transcriptional and metabolic adaptations. **Chem Biol**. 2012 Feb 24;19(2):218-27. doi: 10.1016/j.chembiol.2011.12.016. Erratum in: Chem Biol. 2012 Sep 21;19(9):1210.

GROSSET J, ALMEIDA D, CONVERSE PJ, TYAGI S, LI S, AMMERMAN NC, PYM AS, WALLENGREN K, HAFNER R, LALLOO U, SWINDELLS S, BISHAI WR. Modeling early bactericidal activity in murine tuberculosis provides insights into the activity of isoniazid and pyrazinamide. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2012 September 11; 109(37): 15001–15005.

GROSSET JH, SINGER TG, BISHAI WR. New drugs for the treatment of tuberculosis: hope and reality. **Int J Tuberc Lung Dis**. 2012; 16(8):1005-14.

GUIRADO E, SCHLESINGER LS. Modeling the *Mycobacterium tuberculosis* Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease. **Front Immunol**. 2013; 22:4:98.

GUMBO T, LOUIE A, LIU W, AMBROSE PG, BHAVNANI SM, BROWN D, DRUSANO GL. 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 Jan 15;195(2):194-201.

GUO, H.; SEET, Q.; DENKIN, S.; PARSONS, L.; ZHANG, Y. Molecular characterization of isoniazid- resistant clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from the USA. **J. Med. Microbiol**. 2006, 55, 1527–1531.

GUPTA KC, VISWANATHAN R. Electronmicroscopic and phase contrast studies of effects of para-aminosalicylic acid, isoniazid, and viomycin on tubercle bacilli. **Am Rev Tuberc**. 1956 Feb;73(2):296-300.

GUPTA RK, SRIVASTAVA BS, SRIVASTAVA R. Comparative expression analysis of *rpf*-like genes of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv under different physiological stress and growth conditions. **Microbiology**. 2010 Sep;156(Pt 9):2714-22. doi: 10.1099/mic.0.037622-0.

HAAS, W.H.; SCHILKE, K.; BRAND, J.; AMTHOR, B.; WEYER, K.; FOURIE, P.B.; BRETZEL, G.; STICHTGROH, V.; BREMER, H.J. Molecular analysis of *katG* gene mutations in strains of *Mycobacterium tuberculosis* complex from Africa. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 1997, 41(7), 1601-1603.

HAWKES, M., LI, X., CROCKETT, M., DIASSITI, A., FINNEY, C., MIN-OO, G., *et al.* CD36 deficiency attenuates experimental mycobacterial infection. **BMC Infect Dis.** 2010, 10: 299.

HARARI A, ROZOT V, ENDERS FB, PERREAU M, STALDER JM, *et al.* Dominant TNF-alpha+ Mycobacterium tuberculosis-specific CD4+ T cell responses discriminate between latent infection and active disease. **Nat Med** 2011. 17: 372– 376.

HASAN Z, JAMIL B, KHAN J, ALI R, KHAN MA, NASIR N, YUSUF MS, JAMIL S, IRFAN M, HUSSAIN R. Relationship between circulating levels of IFN-gamma, IL-10, CXCL9 and CCL2 in pulmonary and extrapulmonary tuberculosis is dependent on disease severity. **Scand J Immunol.** 2009;69(3):259-67.

HAZBÓN, M. H. *et al.* Population genetics study of isoniazid resistance mutations and evolution of multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob. Agents Ch.** 2006, 50, 2640– 2649.

HERBST, S. *ET AL.* INTERFERON GAMMA ACTIVATED MACROPHAGES KILL MYCOBACTERIA BY NITRIC OXIDE INDUCED APOPTOSIS. **PLOS ONE**, V. 6, N. 5, 2011/5/2 2011. ISSN 1932-6203.

HEYM, B.; ZHANG, Y.; POULET, S.; YOUNG, D.; COLE, S. Characterization of the *katG* gene encoding a catalase-peroxidase required for the isoniazid susceptibility of Mycobacterium tuberculosis. **J. Bacteriol.** 1993, 175, 4255–4259.

HWANG TJ, CARPENTER D, KESSELHEIM AS. Paying for innovation: Reimbursement incentives for antibiotics. **Sci Transl Med.** 2015 Feb 25;7(276):276fs9.

ITANO AA, MCSORLEY SJ, REINHARDT RL, EHST BD, INGULLI E, RUDENSKY AY, JENKINS MK. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. **Immunity.** 2003;19(1):47-57.

JACOBS, M. *et al.* Correction of defective host response to Mycobacterium bovis BCG infection in TNF-deficient mice by bone

marrow transplantation. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.** 2000. 80, 901–914.

JAIN M, PETZOLD CJ, SCHELLE MW, LEAVELL MD, MOUGOUS JD, BERTOZZI CR, LEARY JA, COX JS. Lipidomics reveals control of *Mycobacterium tuberculosis* virulence lipids via metabolic coupling. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007 Mar 20;104(12):5133-8.

JAMIL B, SHAHID F, HASAN Z *ET AL.* Interferon γ :IL10 ratio defines the severity of disease in pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis. **Tuberculosis** 2007;87:279–87.

JAYARAMAN P, SADA-OVALLE I, NISHIMURA T, ANDERSON AC, KUCHROO VK, et al. IL-1 β promotes antimicrobial immunity in macrophages by regulating TNFR signaling and caspase-3 activation. **J Immunol** 2013. 190: 4196–4204.

JINDANI A, ABER VR, EDWARDS EA, MITCHISON DA. The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. **Am. Rev. Respir. Dis.** 1980; 121:939–949.

JINDANI A, DORÉ CJ, MITCHISON DA. Bactericidal and sterilizing activities of antituberculosis drugs during the first 14 days. **Am J Respir Crit Care Med.** 2003 May 15;167(10):1348-54.

JOHNSON JL, HADAD DJ, BOOM WH, DALEY CL, PELOQUIN CA, EISENACH KD, JANKUS DD, DEBANNE SM, CHARLEBOIS ED, MACIEL E, PALACI M, DIETZE R. Early and extended early bactericidal activity of levofloxacin, gatifloxacin and moxifloxacin in pulmonary tuberculosis. **Int J Tuberc Lung Dis.** 2006 Jun;10(6):605-12.

JUFFERMANS NP, FLORQUIN S, CAMOGLIO L, VERBON A, KOLK AH, et al. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. **J Infect Dis.** 2000; 182: 902–908.

KAMATH AB, ALT J, DEBBABI H, BEHAR SM. Toll-like receptor 4-defective C3H/HeJ mice are not more susceptible than other C3H substrains to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **Infect Immun.** 2003;71:4112–8.

KANG TJ, LEE SB, CHAE GT. A polymorphism in the Toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. **Cytokine**. 2002;20:56–62.

KARAKOUSIS PC, WILLIAMS EP, BISHAI WR. Altered expression of isoniazid-regulated genes in drug-treated dormant Mycobacterium tuberculosis. **J Antimicrob Chemother**. 2008 Feb;61(2):323-31.

KAUFMANN SH. Understanding immunity to tuberculosis: guidelines for rational vaccine development. **Kekkaku**. 2001; 76(9):641-5

KEANE J, GERSHON S, WISE RP, MIRABILE-LEVENS E, KASZNICA J, SCHWIETERMAN WD, SIEGEL JN, BRAUN MM. Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent. **N Engl J Med**. 2001; 345:1098–1104.

KEANE J, SHURTLEFF B, KORNFELD H. TNF-dependent BALB/c murine macrophage apoptosis following Mycobacterium tuberculosis infection inhibits bacillary growth in an IFN-gamma independent manner. **Tuberculosis**. 2002. 82:55–61

KEANE, J. et al. Infection by Mycobacterium tuberculosis promotes human alveolar macrophage apoptosis. **Infect. Immun**. 1997. 65, 298–304.

KIEMER, A. K., SENARATNE, R. H., HOPPSTÄDTER, J., DIESEL, B., RILEY, L. W., TABETA, K., BAUER, S., BEUTLER, B., ZURAW, B. L. Attenuated activation of macrophage TLR9 by DNA from virulent mycobacteria. **Journal of Innate Immunity**, 2009, 1(1), 29–45.

KIM JJ, LEE HM, SHIN DM, KIM W, YUK JM, JIN HS, LEE SH, CHA GH, KIM JM, LEE ZW, SHIN SJ, YOO H, PARK YK, PARK JB, CHUNG J, YOSHIMORI T, JO EK. Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action. **Cell Host Microbe**. 2012 May 17;11(5):457-68.

KISLITSYNA NA. Comparative evaluation of rifampicin and isoniazid penetration into the pathological foci of the lungs in tuberculosis patients. **Probl. Tuberk.**, 1985. p 55–57.

KJELLSSON MC, VIA LE, GOH A, WEINER D, LOW KM, KERN S, PILLAI G, BARRY CE 3RD, DARTOIS V. Pharmacokinetic

evaluation of the penetration of antituberculosis agents in rabbit pulmonary lesions. **Antimicrob Agents Chemother.** 2012 Jan;56(1):446-57.

KLEINNIJENHUIS J, JOOSTEN LA, VAN DE VEERDONK FL, SAVAGE N, VAN CREVEL R, KULLBERG BJ, et al. Transcriptional and inflammasome-mediated pathways for the induction of IL-1 β production by *Mycobacterium tuberculosis*. **Eur J Immunol.** 2009;39(7):1914–22.

KLEINNIJENHUIS, J. et al. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. **Clin Dev Immunol**, 2011. v. 2011, p. 405310.

KOCH, R. Die aetiologie der tuberculose. **Berliner Klinische Wochenschrift.** 1882.19;221-30.

KRUTZIK SR, OCHOA MT, SIELING PA, UEMATSU S, NG YW, LEGASPI A, et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. **Nat Med.** 2003;9:525–32.

LADEL CH, BLUM C, DREHER A, REIFENBERG K, KOPF M, KAUFMANN SHE. Lethal tuberculosis in interleukin-6-deficient mutant mice. **Infect Immun** 1997. 65:4843-4849.

LAWSON L, ZHANG J, GOMGNIMBOU MK, ABDURRAHMAN ST, LE MOULLEC S, MOHAMED F, UZOEWULU GN, SOGAOLU OM, GOH KS, EMENYONU N, REFRÉGIER G, CUEVAS LE, SOLA C. A molecular epidemiological and genetic diversity study of tuberculosis in Ibadan, Newi and Abuja, Nigeria. **PLoS One.** 2012; 7(6):e38409.

LAZAREVIC, V, NOLT, D, FLYNN, JL. Long-term control of *Mycobacterium tuberculosis* infection is mediated by dynamic immune responses. **The Journal of Immunology**, 2005. vol.175,no. 2, pp. 1107–1117.

LEAL IS, FLORIDO M, ANDERSEN P, APPELBERG R. Interleukin-6 regulates the phenotype of the immune response to a tuberculosis subunit vaccine. **Immunology.** 2001. 103:375-381.

LEE J, REPASY T, PAPAVIDASASUNDARAM K, SASSETTI C, KORNFELD H. *Mycobacterium tuberculosis* induces an atypical cell

death mode to escape from infected macrophages. **PLoS One.** 2011; 6(3):e18367.

LEE Y, MOOTIEN S, SHOEN C, DESTEFANO M, CIRILLO P, ASOJO OA, YEUNG KR, LEDIZET M, CYNAMON MH, ARISTOFF PA, KOSKI RA, KAPLAN PA, ANTHONY KG. Inhibition of mycobacterial alanine racemase activity and growth by thiadiazolidinones. **Biochem Pharmacol.** 2013 Jul 15;86(2):222-30. doi: 10.1016/j.bcp.2013.05.004.

LEE, R.E.; BRENNAN, P.J.; BESRA, G.S. Mycobacterium tuberculosis cell envelope. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, 1996, 215, 1-27.

LI F, MIAO Y, ZHANG L, NEUENSWANDER SA, DOUGLAS JT, MA X. Metabolomic analysis reveals novel isoniazid metabolites and hydrazones in human urine. **Drug Metab Pharmacokinet.** 2011;26(6):569-76.

LIN, P. L., MYERS, A., SMITH, L., BIGBEE, C., BIGBEE, M., FUHRMAN, C., GRIESER, H., CHIOSEA, I., VOITENEK, N. N., CAPUANO, S. V. ET AL. Tumor necrosis factor neutralization results in disseminated disease in acute and latent Mycobacterium tuberculosis infection with normal granuloma structure in a cynomolgus macaque model. **Arthritis Rheum.** 2010. 62, 340-350.

LING LL, SCHNEIDER T, PEOPLES AJ, SPOERING AL, ENGELS I, CONLON BP, MUELLER A, SCHÄBERLE TF, HUGHES DE, EPSTEIN S, JONES M, LAZARIDES L, STEADMAN VA, COHEN DR, FELIX CR, FETTERMAN KA, MILLETT WP, NITTI AG, ZULLO AM, CHEN C, LEWIS K. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature.** 2015 Jan 22;517(7535):455-9.

LIU J, NIKAIDO H. A mutant of Mycobacterium smegmatis defective in the biosynthesis of mycolic acids accumulates meromycolates. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1999 Mar 30;96(7):4011-6.

LOPEZ RAMIREZ GM, ROM WN, CIOTOLI C ET AL. Mycobacterium tuberculosis alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. **Infect Immun** 1994; 62:2515–20.

MACHADO D, COUTO I, PERDIGÃO J, RODRIGUES L, PORTUGAL I, BAPTISTA P, VEIGAS B, AMARAL L, VIVEIROS M.

Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**. 2012 ;7(4):e34538.

MAGLIOZZO RS, MARCINKEVICIENE JA. Evidence for Isoniazid Oxidation by Oxyferrous Mycobacterial Catalase2Peroxidase. **J Am Chem Soc** 1996. 118. 7.

MAHAPATRA S, WOOLHISER LK, LENAERTS AJ, JOHNSON JL, EISENACH KD, JOLOBA ML, BOOM WH, BELISLE JT. A novel metabolite of antituberculosis therapy demonstrates host activation of isoniazid and formation of the isoniazid-NAD⁺ adduct. **Antimicrob Agents Chemother**. 2012 Jan;56(1):28-35.

MANCA C, PAUL S, BARRY III CE, FREEDMAN VH, KAPLAN G. *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes *in vitro*. **Infect. Immun**. 1999; 67:74-79.

MARRAKCHI, H.; LANÉELLE, M.-A.; DAFFÉ, M. Mycolic Acids: Structures, Biosynthesis, and Beyond. **Chemistry & Biology**, v. 21, n. 1, p. 67-85, January 16 2014 2014. ISSN 1074-5521.

MARTINEAU AR, NEWTON SM, WILKINSON KA, KAMPMANN B, HALL BM, NAWROLY N, PACKE GE, DAVIDSON RN, GRIFFITHS CJ, WILKINSON RJ. Neutrophil-mediated innate immune resistance to mycobacteria. **J Clin Invest**. 2007 Jul;117(7):1988-94.

MARTTILA HJ, SOINI H, HUOVINEN P, VILJANEN MK. *katG* mutations in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates recovered from Finnish patients. **Antimicrob Agents Chemother** 1996. 40:2187–2189.

MATTEELLI A, CARVALHO AC, DOOLEY KE, KRITSKI A. TMC207: The first compound of a new class of potent anti-tuberculosis drugs. **Future Microbiol**. 2010;5:849–58.

MAYER-BARBER KD, ANDRADE BB, OLAND SD, AMARAL EP, BARBER DL, GONZALES J, DERRICK SC, SHI R, KUMAR NP, WEI W, YUAN X, ZHANG G, CAI Y, BABU S, CATALFAMO M, SALAZAR AM, VIA LE, BARRY CE 3RD, SHER A. Host-directed therapy of tuberculosis based on interleukin-1 and type I interferon crosstalk. **Nature**. 2014 Jul 3;511(7507):99-103.

MAYER-BARBER, K. D., et al. Caspase-1 independent Il-1beta production is critical for host resistance to Mycobacterium tuberculosis and does not require TLR signaling *in vivo*. **J. Immunol.** 2010. 184:3326–3330.

MCCLATCHY, J.K. Mechanism of Action of Isoniazid on Mycobacterium bovis Strain BCG. **Infect. Immun.**, 1971, 3(4), 530-534.

MCKINNEY JD, HÖNER ZU BENTRUP K, MUÑOZ-ELÍAS EJ, MICZAK A, CHEN B, CHAN WT, SWENSON D, SACCHETTINI JC, JACOBS WR JR, RUSSELL DG. Persistence of Mycobacterium tuberculosis in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. **Nature.** 2000 Aug 17;406(6797):735-8.

MCSHANE, H. et al. BCG: myths, realities, and the need for alternative vaccine strategies. In: (Ed.). **Tuberculosis (Edinb).** Scotland, v.92, 2012. p.283-8.

MDLULI, K.; SLAYDEN, R. A.; ZHU, Y.; RAMASWAMY, S.; PAN, X.; MEAD, D.; CRANE, D. D.; MUSSER, J. M.; BARRY, C. E., III. Inhibition of a Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl ACP synthase by isoniazid. **Science** 1998, 280 (5369), 1607–1610.

MEANS TK, WANG S, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK DT, FENTON MJ. Human toll-like receptors mediate cellular activation by Mycobacterium tuberculosis. **J Immunol.** 1999 Oct 1;163(7):3920-7.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, 1997, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997-07-24.

MIDDLEBROOK, G. Isoniazid-resistance and catalase activity of tubercle bacilli; a preliminary report. **Am. Rev. Tuberc.**, 1954, 69(3), 471-472.

MINION J, GALLANT V, WOLFE J, JAMIESON F, LONG R. Multidrug and extensively drug-resistant tuberculosis in Canada 1997-2008: demographic and disease characteristics. **PLoS One.** 2013; 8(1):e53466.

MUAKKASSAH SF, BIDLACK WR, YANG WC. Mechanism of the inhibitory action of isoniazid on microsomal drug metabolism. **Biochem Pharmacol.** 1981 Jun 15;30(12):1651-8.

MURDOCH MB, PETERSON LR. Antimicrobial penetration into polymorphonuclear leukocytes and alveolar macrophages. **Semin Respir Infect.** 1991 Jun;6(2):112-21.

MURRAY PJ, YOUNG RA. Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. **Infect Immun** 1999;67:3087–95.

MUSSER, JM. Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. **Emerg Infect Dis** 1996. 2:1–17.

NGUYEN, L.; PIETERS, J. Mycobacterial subversion of chemotherapeutic reagents and host defense tactics: challenges in tuberculosis drug development. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 49, p. 427-53, 2009. ISSN 0362-1642 (Print)0362-1642.

NIEDERWEIS, M. et al. Mycobacterial outer membranes: in search of proteins. **Trends Microbiol**, 2010. v. 18, n. 3, p. 109-16, ISSN 0966-842x.

NIKAIDO, H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. **Science**, v. 264, n. 5157, p. 382-8, Apr 15 1994. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

NORTH RJ, JUNG YJ. Immunity to tuberculosis. **Annu. Rev. Immunol.** 2004; 22:599–623.

NOSS EH, HARDING CV, BOOM WH. Mycobacterium tuberculosis inhibits MHC class II antigen processing in murine bone marrow macrophages. **Cell Immunol.** 2000 Apr 10;201(1):63-74.

NOVIKOV A, CARDONE M, THOMPSON R, SHENDEROV K, KIRSCHMAN KD, MAYER-BARBER KD, MYERS TG, RABIN RL, TRINCHIERI G, SHER A, FENG CG. *Mycobacterium tuberculosis* triggers host type I IFN signaling to regulate IL-1 β production in human macrophages. **J Immunol**, 2011; 187, pp. 2540–2547.

O'BRIEN JK, DOERFLER ME, HARKIN TJ, ROM WN. Isoniazid levels in the bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary

tuberculosis. **Lung**. 1998;176(3):205-11.

ORME IM, COOPER AM. Cytokine/chemokine cascades in immunity to tuberculosis. **Immunol Today** 1999; 20:307–312.

PARTHÉ S, HAGMANN W. Inhibition of leukotriene omega-oxidation by isonicotinic acid hydrazide (isoniazid). **Eur J Biochem**. 1990 Jan 12;187(1):119-24.

PELOQUIN CA. Therapeutic drug monitoring of the antimycobacterial drugs. **Clin Lab Med**. 1996 Sep;16(3):717-29.

PICARD C, PUEL A, BONNET M, ET AL. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. **Science**. 2003;299(5615):2076–9

PICCARO G, GIANNONI F, FILIPPINI P, MUSTAZZOLU A, FATTORINI L. Activities of drug combinations against *Mycobacterium tuberculosis* grown in aerobic and hypoxic acidic conditions. **Antimicrob Agents Chemother**. 2013; 57(3):1428-33.

PINHEIRO MB, ANTONELLI LR, SATHLER-AVELAR R, VITELLI-AVELAR DM, SPINDOLA-DE-MIRANDA S, GUIMARÃES TM, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO OA, TOLEDO VP. CD4-CD8- $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells display inflammatory and regulatory potentials during human tuberculosis. **PLoS One**. 2012;7(12):e50923.

POLLOCK KM, WHITWORTH HS, MONTAMAT-SICOTTE DJ, GRASS L, COOKE GS, KAPEMBWA MS, KON OM, SAMPSON RD, TAYLOR GP, LALVANI A. T-cell immunophenotyping distinguishes active from latent tuberculosis. **J Infect Dis**. 2013 Sep;208(6):952-68.

POMPEI L, JANG S, ZAMLYNNY B, ET AL. Disparity in IL-12 release in dendritic cells and macrophages in response to *Mycobacterium tuberculosis* is due to use of distinct TLRs. **J Immunol**. 2007;178(8):5192–9.

PUISSEGUER MP, BOTANCH C, DUTEYRAT JL, DELSOL G, CARATERO C, ALTARE F. An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. **Cell Microbiol**. 2004; 6(5):423-

33.

RAFFETSEDER J, PIENAAR E, BLOMGRAN R, EKLUND D, PATCHA BRODIN V, ANDERSSON H, WELIN A, LERM M. Replication rates of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages do not correlate with mycobacterial antibiotic susceptibility. **PLoS One**. 2014 Nov 11;9(11):e112426.

RASTOGI, N.; LEGRAND, E.; SOLA, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. **Rev Sci Tech**, v. 20, n. 1, p. 21-54, Apr 2001. ISSN 0253-1933 (Print)0253-1933.

RAY JC, FLYNN JL, KIRSCHNER DE. Synergy between individual TNF- dependent functions determines granuloma performance for controlling mycobacterium tuberculosis infection. **J Immunol** 2009.182: 3706–3717. 30.

REILING N, HÖLSCHER C, FEHRENBACH A, et al. Cutting edge: toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. **J Immunol**. 2002;169(7):3480–4.

RILEY, RL. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis. **Am Rev Tuberc**. 1957; 76(6):931-41.

ROOK, G. A. W. Progress in the immunology of the mycobacterioses. **Clin. exp. Immun.**1987. 69, 1-9.

ROTHFUCHS, A.G., BAFICA, A., FENG, C.G., EGEN, J.G., WILLIAMS, D.L., BROWN G.D., SHER, A. Dectin-1 interaction with *Mycobacterium tuberculosis* leads to enhanced IL-12p40 production by splenic dendritic cells. **J Immunol** 2007. 179:3463–3471 135.

RUSSELL DG, VANDERVEN BC, LEE W, ABRAMOVITCH RB, KIM MJ, HOMOLKA S, NIEMANN S, ROHDE KH. *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. **Cell Host Microbe**. 2010 Jul 22;8(1):68-76.

RUSSELL, D. G. Who puts the tubercle in tuberculosis? **Nat Rev Microbiol**, 2007. v. 5, n. 1, p. 39-47.

SABIN FR, DOAN CA. The relation of monocytes and clasmatocytes to early infection in rabbits with bovine tubercle bacilli. **J Exp Med.** 1927 Sep 30;46(4):627-44.

SANDOR, M., WEINSTOCK, J.V., AND WYNN, T.A. Granulomas in schistosome and mycobacterial infections: a model of local immune responses. **Trends Immunol** .2003. 24: 44– 52.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 3, p. 170-81, Mar 2010. ISSN 1474-1733.

SAUNDERS BM, BRITTON WJ. Life and death in the granuloma: immunopathology of tuberculosis. **Immunol. Cell Biol.** 2007; 85, pp. 103–111.

SAUNDERS BM, FRANK AA, ORME IM. Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with Mycobacterium tuberculosis. **Immunology** 1999. 98:324–328.

SAUNDERS BM, FRANK AA, ORME IM, COOPER AM. Interleukin-6 induces early gamma interferon production in the infected lung but is not required for generation of specific immunity to Mycobacterium tuberculosis infection. **Infect Immun** 2000. 68:3322-3326.

SAUNDERS, B. M., BRISCOE, H. & BRITTON,W. J. T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against Mycobacterium tuberculosis infection. **Clinical and experimental immunology** . 2004.137, 279–287.

SCANGA, C. A. et al. MyD88-Deficient Mice Display a Profound Loss in Resistance to Mycobacterium tuberculosis Associated with Partially Impaired Th1 Cytokine and Nitric Oxide Synthase 2 Expression. **Infect Immun**, 2004. v. 72, n. 4, p. 2400-4.

SCHAFER, G. et al. Non-opsonic recognition of Mycobacterium tuberculosis by phagocytes. **J Innate Immun**, 2009. v. 1, n. 3, p. 231-43.

SCHAIBLE, U. E., H. L. COLLINS, S. H. KAUFMANN. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. **Adv. Immunol.** 1999. 71:267.

SCHLESINGER, L.S., KAUFMAN, T.M., IYER, S., HULL, S.R., AND MARCHIANDO, L.K. Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* by human macrophages. **J Immunol** 1996.157: 4568–4575.

SCHREIBER T, EHLERS S, ALY S, HOLSCHER A, HARTMANN S, LIPP M, ET AL. Selectin ligand-independent priming and maintenance of T cell immunity during airborne tuberculosis. **Journal of Immunology**. 2006;176:1131–40.

SCIOR T, MENESES MORALES I, GARCÉS EISELE SJ, DOMEYER D, LAUFER S. Antitubercular isoniazid and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*--a review. **Arch Pharm (Weinheim)**. 2002;335(11-12):511-25. Review.

SEITZER U, GERDES J. Generation and characterization of multicellular heterospheroids formed by human peripheral blood mononuclear cells. **Cells Tissues Organs**. 2003; 174(3):110-6.

SHALER CR, HORVATH CN, JEYANATHAN M, XING Z. Within the Enemy's Camp: contribution of the granuloma to the dissemination, persistence and transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. **Front Immunol**. 2013; 4:30.

SHEN,Y, ZHOU, D, QIU,L et al., Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. **Science**, 2002. vol. 295, no. 5563, pp. 2255–2258.

SHENOI S, HEYSELL S, MOLL A, FRIEDLAND G. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: consequences for the global HIV community. **Curr Opin Infect Dis**. 2009 Feb;22(1):11-7. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283210020. Review.

SINAN. Tuberculose: Casos notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Sistema de Informação de Agravos de Notificação 2011.

SIQUEIRA, H. R. et al. O tratamento atual da tuberculose (para adolescentes e adultos) comentado. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 9, n. 6, p. 61-71, 2010.

SIRGEL F, VENTER A, MITCHISON D. Sources of variation in studies of the early bactericidal activity of antituberculosis drugs.

SIRGEL FA, DONALD PR, ODHIAMBO J, GITHUI W, UMAPATHY KC, PARAMASIVAN CN, TAM CM, KAM KM, LAM CW, SOLE KM, MITCHISON DA. A multicentre study of the early bactericidal activity of anti-tuberculosis drugs. **J Antimicrob Chemother.** 2000 Jun;45(6):859-70.

SORKIN, E.; ROTH, W.; ERLNMEYER, H. Über die Beeinflussung tuberkulostatischer Wirkungen durch Cu. Metallionen und biologische Wirkung, 7. Mitteilung. *Helv. Chim. Acta*, 1952, 35(5), 1736-1741.

SRIVASTAVA S, ERNST JD, DESVIGNES L. Beyond macrophages: the diversity of mononuclear cells in tuberculosis. **Immunol Rev.** 2014 Nov;262(1):179-92.

SRIVASTAVA S, ERNST JD. Cutting edge: Direct recognition of infected cells by CD4 T cells is required for control of intracellular *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. **J Immunol.** 2013; 191(3):1016-20.

STENGER, S., HANSON, D. A., TEITELBAUM, R., DEWAN, P., NIAZI, K. R., FROELICH, C. J., et al. . An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. **Science** 1998. 282, 121–125.

STURGILL-KOSZYCKI, S. et al. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. **Science**, v. 263, n. 5147, p. 678-81, Feb 4 1994. ISSN 0036-8075 (Print)0036-8075.

SUGAWARA I, YAMADA H, HUA S, MIZUNO S. Role of interleukin (IL)-1 type 1 receptor in mycobacterial infection. **Microbiol Immunol.** 2001; 45: 743–750.

SUGAWARA I, YAMADA H, KANEKO H, MIZUNO S, TAKEDA K, et al. Role of interleukin-18 (IL-18) in mycobacterial infection in IL-18-gene-disrupted mice. **Infect Immun.** 1999; 67: 2585–2589.

TAILLEUX L, SCHWARTZ O, HERRMANN JL, PIVERT E, JACKSON M, AMARA A et al. DC-SIGN is the major Mycobacterium tuberculosis receptor on human dendritic cells. **JExp Med** 2003; 197: 121–127.

TAKAYAMA K, ARMSTRONG EL, DAVIDSON LA, KUNUGI KA, KILBURN JO. Effect of low temperature on growth, viability, and synthesis of mycolic acids of Mycobacterium tuberculosis strain H37Ra. **Am Rev Respir Dis**. 1978 Jul;118(1):113-7.

TAKAYAMA K, WANG L, DAVID HL. Effect of isoniazid on the *in vivo* mycolic acid synthesis, cell growth, and viability of Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrob. Agents Chemother**. 1972. 2:29–35 76.

TAKAYAMA K, WANG L, MERKAL RS. Scanning electron microscopy of the H37Ra strain of Mycobacterium tuberculosis exposed to isoniazid. **Antimicrob Agents Chemother**. 1973 Jul;4(1):62-5.

TANAKA Y, MORITA CT, TANAKA Y, NIEVES E, BRENNER MB, BLOOM BR. Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells. **Nature**. 1995; 375:155–58.

TANNE, A. et al. A murine DC-SIGN homologue contributes to early host defense against Mycobacterium tuberculosis. **J Exp Med**, 2009.v. 206, n. 10, p. 2205-20, Sep 28.

TAPPERO JW, BRADFORD WZ, AGERTON TB, HOPEWELL P, REINGOLD AL, LOCKMAN S, OYEWU A, TALBOT EA, KENYON TA, MOETI TL, MOFFAT HJ, PELOQUIN, CA. Serum concentrations of antimycobacterial drugs in patients with pulmonary tuberculosis in Botswana. **Clin. Infect. Dis**. 2005; 41:461-469.

TOBIAN AA, POTTER NS, RAMACHANDRA L, PAI RK, CONVERY M, BOOM WH, HARDING CV. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by Toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. **J Immunol**. 2003 Aug 1;171(3):1413-22.

TOUSIF S, SINGH DK, AHMAD S, MOODLEY P, BHATTACHARYYA M, VAN KAER L, DAS G. Isoniazid induces

apoptosis of activated CD4⁺ T cells: implications for post-therapy tuberculosis reactivation and reinfection. **J Biol Chem.** 2014 Oct 31;289(44):30190-5.

TSUKAMURA M, TSUKAMURA S, NAKANO E. The uptake of isoniazid by mycobacteria and its relation to isoniazid susceptibility. **Am Rev Respir Dis.** 1963 Feb;87:269-75

TUFARIELLO JM, CHAN J, FLYNN JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. **Lancet Infect Dis** 2003; 3:578–90.

TURNER OC, BASARABA RJ, FRANK AA, ORME IM. Granuloma formation in mouse and guinea pig models of experimental tuberculosis. In: Boros DL, ed. Granulomatous infections and inflammations: cellular and molecular mechanisms. Washington, D.C.: **ASM Press.** 2003. pp 65–84.

ULRICHS T, KAUFMANN SH. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. **J Pathol** . 2006. 208:261–269.

URBASCHEK R1, MÄNNEL DN, URBANCZIK R. Isoniazid protects mice against endotoxin lethality without influencing tumor necrosis factor synthesis and release. **Antimicrob Agents Chemother.** 1991 Aug;35(8):1666-8.

US Food and Drug Administration. FDA news release. 2013. Disponível em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm333695.htm>

VERBON A, JUFFERMANS N, DEVENTER S, SPEELMAN P, DEUTEKOM H, VAN DER POLL T. Serum concentrations of cytokine in patients with active tuberculosis (TB) and after treatment. **Clin Exp Immunol** 1999;115:110–3.

VERGNE, I. et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 11, p. 4033-8, Mar 15 2005. ISSN 0027-8424 (Print)0027-8424

- VILCHÈZE C, JACOBS WR JR. The Mechanism of Isoniazid Killing: Clarity Through the Scope of Genetics. **Annu. Rev. Microbiol.** 2007. 61:35–50.
- WAKAMOTO, Y. et al. Dynamic persistence of antibiotic- stressed mycobacteria. **Science**, 2013. 339, 91–95.
- WALLIS RS. Reconsidering adjuvant immunotherapy for tuberculosis. **Clin Infect Dis.** 2005. 41: 201–208.
- WEI CJ, LEI B, MUSSER JM, TU SC. Isoniazid activation defects in recombinant *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase (KatG) mutants evident in InhA inhibitor production. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003 Feb;47(2):670-5.
- WELINDER, K. G. Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. **Curr. Opin. Struct. Biol.** 1992, 2, 388–393.
- WHO. **Global tuberculosis report 2014.** Geneva, Switzerland: WHO Press 2014.
- WILMING M, JOHNSON K. Spontaneous formation of the bioactive form of the tuberculosis drug isoniazid. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.** 1999.38:2588–90.
- WIMPENNEY, J. W. T. Effect of isoniazid on biosynthesis in *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* BCG. **J. Gen. Microbiol.** 1967. 47:379-388. 30.
- WINDER FG, COLLINS PB. 1970. Inhibition by isoniazid of synthesis of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Gen. Microbiol.** 63:41–48 91.
- WOLF AJ et al. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. **J Immunol** 2007. 179:2509–2519.
- WOODLAND DL, KOHLMEIER JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. **Nat Rev Immunol.** 2009 Mar;9(3):153-61.

YAMASHIRO LH, OLIVEIRA SC, BÁFICA A. Innate immune sensing of nucleic acids from mycobacteria. **Microbes Infect.** 2014 Dec;16(12):991-7.

YOSHIDA N. Role of gamma/delta T-cells in the peripheral blood of patients with pulmonary tuberculosis. **Kurume Med J.** 2001;48(2):175-81.

YOSHIKAWA, T.T. Tuberculosis in aging adults, **Journal of the American Geriatrics Society**, 1992. vol.40, no.2,pp. 178–187.

YOSHIMORI, T.,NODA, T. Toward unraveling membrane biogenesis in mammalian autophagy. **Curr. Opin. Cell Biol.** 2008. 20, 401–407.

YOUATT, J. A review of the action of isoniazid. **Amer. Rev. Resp. Dis.** 1962. 99:729-749.

YOUNG, D. B. et al. Confronting the scientific obstacles to global control of tuberculosis. **J Clin Invest**, v. 118, n. 4, p. 1255-65, Apr 1 2008.

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 May;8(3):521-4.

ZHANG, Y.; HEYM, B.; ALLEN, B.; YOUNG, D.; COLE, S. The catalase–peroxidase gene and isoniazid resistance of Mycobacterium tuberculosis. **Nature** 1992, 358.

ZUMLA A, NAHID P, COLE ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. **Nat Rev Drug Discov.** 2013; 12(5):388-404.