



ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DE *Mycobacterium tuberculosis* APÓS A EXPOSIÇÃO AO ETAMBUTOL

Jean Eduardo Meneguello (PIBIC/CNPq/UEM), Luciana Dias Ghiraldi Lopes, Paula Aline Zannetti Campanerut-Sá, Rosilene Fressatti Cardoso (orientadora), e-mail: jan.meneguello@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde

Microbiologia - Bacteriologia

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, proteômica, etambutol

Resumo:

A tuberculose é uma doença infecto contagiosa crônica, ligada a fatores socioeconômicos e a baixa resistência imunológica do indivíduo, principalmente no caso de HIV/AIDS. O etambutol (ETB) integra o esquema terapêutico de primeira escolha da terapia anti-tuberculose, atuando de maneira sinérgica com os demais fármacos sobre a morte do bacilo. Em uma célula, as principais funções vitais são desempenhadas por proteínas, as quais possuem sua expressão sujeita às condições ambientais, e desta forma a proteômica é uma importante abordagem para evidenciar as alterações na regulação da expressão gênica diante da exposição a um fármaco. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil proteico do *M. tuberculosis* após 12, 24 e 48 horas de exposição ao ETB, por meio da geração de géis de eletroforese bidimensional (2D). Todos os géis apresentaram *spots* proteicos com diferença estatística significativa, com maior número de *spots* presentes e ausentes no tempo de 48 horas, indicando que as condições de crescimento, exposição e extração foram adequadas para a geração dos géis de eletroforese que evidenciassem alterações na expressão proteica, que posteriormente serão identificados por espectrometria de massas MALDI TOFF.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa conhecida há séculos e seu desenvolvimento e evolução são dependentes de fatores relacionados aos aglomerados humanos, a desnutrição e a baixa resistência imunológica, estando este último fator intimamente relacionado com casos de infecção provocada pelo HIV (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).



O ETB é um fármaco com ação bactericida de primeira linha usado no tratamento da TB, que exerce um efeito sinérgico quando combinado a outros fármacos do esquema terapêutico, uma vez que aumenta a permeabilidade da parede celular micobacteriana. O ETB atua inibindo especificamente a síntese de arabinogalactano (RATTAN, 1998), com isso, sugere-se que seu alvo seja uma arabinosil transferase.

Acredita-se que a maioria dos fenômenos biológicos encontrados em um organismo possa ser explicada pelo seu transcriptoma e conseqüentemente pelo seu perfil proteômico, uma vez que, é pela regulação da atividade gênica que cada organismo pode suprir ou super-expressar a quantidade necessária de um determinado produto em um momento específico em resposta aos diferentes sinais ambientais aos quais é submetido. (KATO-MAEDA; GAO; SMALL, 2001)

O objetivo deste estudo foi analisar o perfil proteico do *M. tuberculosis* após diferentes tempos de exposição ao ETB.

Materiais e métodos

A cepa *M. tuberculosis* H37Rv foi cultivada em 80 mL de meio Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI, USA) acrescido de 0,05% de tween 80 e suplementado com 10% de Oleic acid, Bovine Albumin, Dextrose and Catalase Enrichment (OADC) (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA), a 35°C por 15 dias. Após este período, a suspensão bacteriana foi exposta ao ETB, na concentração final de ½ da concentração inibitória mínima (CIM) (1 µg/mL), pelos tempos de 12, 24 e 48 horas, a 35 C°, sob agitação de 120 rpm/min. O controle do crescimento bacteriano foi realizado em cultura isenta de ETB, sob as mesmas condições de crescimento (denominado tempo 0).

Ao fim do período de exposição ao fármaco, a suspensão bacteriana foi lavada com solução salina 0,85% e água destilada por meio de centrifugação a 4500 rpm por 5 minutos.

As proteínas foram extraídas com a adição de 1000 µl de tampão de lise (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, DTT 50 mM) com auxílio de sonicação, e quantificadas pelo método de Bradford. Aproximadamente 450 µg de proteínas foram purificadas pelo 2D Clean-up kit (GE Healthcare Life Sciences, USA).

A primeira dimensão do gel, ocorreu com a focalização isoeletrica da solução de proteínas em tiras de gradiente de pH (3-10), utilizando o equipamento EttanIPGphor 3 (GE Healthcare, USA). A segunda dimensão da eletroforese bidimensional foi realizada em gel de poli(acrilamida) (SDS-PAGE) a 12,5 % em sistema de 600 Ruby (GE Healthcare, USA). Foram utilizados 12µL do padrão de proteínas Prestained Collor Plus ProteinLadder (Biolabs) em cada gel. A eletroforese foi realizada em tampão de



eletroforese (Tris base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1 %) a 10° C, com voltagem inicial de 100 V e 20 mA por 20 minutos seguido de voltagem de 300V e 100 mA, para dois géis, por aproximadamente 4 horas e 45 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados pela coloração Coomassie Blue G-250, e escaneados por meio do sistema Image Scanner II (Amersham Biosciences, USA) e analisados pelo software Image Master (Amersham Biosciences, USA).

Resultados e Discussão

Após a exposição ao ETB, os géis apresentaram 12, 4 e 6 *spots* de proteínas expressos sub ou supra regulados em comparação ao controle, nos tempos de 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Destes *spots*, todos os géis apresentaram 3 *spots* com diferença estatística ($p < 0,05$). Quanto a presença ou ausência de *spots* de proteínas o gel obtido após a exposição de 48 horas, foi o que apresentou o maior número de *spots* ($n=36$).

Wang e Marcotte (2008), utilizaram a eletroforese em gel bidimensional acoplada com espectrometria de massa (2D-MS) em estudo realizado com *M. smegmatis* após exposição à isoniazida, ETB e um análogo da pirazinamida, e observaram que o perfil proteico após a exposição a esses fármacos demonstrou alterações na expressão de enzimas importantes em algumas vias metabólicas. Durante a exposição a isoniazida, ETB e N-Geranil -N'-(2-adamantyl)etano-1,2-diamino (SQ109), Jia et al.(2005), encontraram 13 *spots* com significância estatística, em *M. tuberculosis*, quando exposto somente ao ETB. Entretanto, sua análise foi voltada exclusivamente ao tempo de 24 horas utilizando a concentração de uma vez a CIM do ETB.

Desta forma para uma confirmação do tempo ideal de exposição pode ser realizado com a identificação das proteínas alteradas em 12, 24 e 48 horas pela espectrometria de massa (MALDI-TOFF), o que deverá contribuir para decisão do melhor tempo de exposição à concentração sub-inibitória de ETB em *M. tuberculosis*, visto que para se estudar a ação de um determinado fármaco, em um micro-organismo através do perfil proteico, é preciso evitar situações de estresse, como a indução de resistência, além de garantir que o mesmo esteja exposto apenas à substância escolhida para estudo

Conclusões

Todos os géis apresentaram *spots* proteicos com diferença estatística, com maior número de *spots* presentes e ausentes no tempo de 48 horas, indicando que as condições de crescimento, exposição e extração foram adequadas para a obtenção dos géis de eletroforese bidimensional de



maneira que se evidenciassem as alterações na expressão proteica, para orientar a identificação para análises posteriores e compreensão do mecanismo de ação do fármaco.

Agradecimentos

Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências

JIA, L. Pharmacoproteomic Effects of Isoniazid, Ethambutol, and N-Geranyl-N'-(2-adamantyl)ethane-1,2-diamine (SQ109) on Mycobacterium tuberculosis H37Rv. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 315, n. 2, p. 905–911, 2005.

KATO-MAEDA, M.; GAO, Q.; SMALL, P. M. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. In: **Cell Microbiol.** England: [s.n.]. v. 3p. 713–719.

RATTAN, A. Multidrug-Resistant Mycobacterium tuberculosis: Molecular Perspectives. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 195–209, 1998.

WANG, R.; MARCOTTE, E. M. The Proteomic Response of Mycobacterium smegmatis to Anti-Tuberculosis Drugs Suggests Targeted Pathways. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 3, p. 855–865, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. H. O. **Global tuberculosis report 2013**. Geneva: WHO, 2013. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/91355/1/9789241564656_eng.pdf>.