



ATIVIDADE INIBITÓRIA DO VERAPAMIL NA EXPRESSÃO GÊNICA DE BOMBAS DE EFLUXO EM *Mycobacterium tuberculosis* MULTIRRESISTENTE.

João Vítor Perez de Souza (PIBIC/FA)¹, Pedro Henrique Canezin¹, Katiany Rizzieri Caleffi- Ferracioli¹, Rosilene Fressatti Cardoso¹
e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina.

Microbiologia - Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, transportadores transmembrana, verapamil.

Resumo

O papel das bombas de efluxo na resistência de micobactérias aos fármacos anti-tuberculose tem recebido maior atenção nos últimos tempos. Assim, alguns inibidores de bombas de efluxo vêm sendo estudados na tentativa de minimizar a resistência bacteriana. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inibitória do verapamil (VP) na expressão de genes que codificam para bombas de efluxo de fármacos em *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv e em isolados clínicos multirresistentes. A concentração inibitória mínima (CIM) do VP para os bacilos foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA). O tempo de exposição e concentração do inibidor utilizado no ensaio de expressão gênica foram determinados pelo método curva de tempo de morte bacteriana. Doze genes que codificam bombas de efluxo foram escolhidos e a expressão observada por meio da PCR quantitativa em tempo real. A expressão gênica relativa foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Foi observada semelhante CIM (125µg/mL) de VP para todas os isolados clínicos estudados. Os tempos de 16 e 72h foram escolhidos para exposição de *Mtb* ao VP pela curva de tempo de morte bacteriana. Foi observada uma baixa expressão relativa ($p \leq 0.05$) de genes que codificam para bombas de efluxo comparada ao controle após exposição ao VP para a maioria dos genes testados. Novos estudos *in vivo* e *in vitro* ainda são necessários para melhor compreensão da atividade do VP e suas vantagens como fármaco adjunto na terapia contra tuberculose, a fim de buscar opções terapêuticas mais seguras e eficazes, principalmente para casos de multirresistência.



Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Um dos maiores desafios enfrentados no tratamento dessa doença, é o surgimento e disseminação de cepas resistentes aos medicamentos anti-TB.

Recentemente, a resistência mediada por proteínas transportadoras de membrana conhecidas como bombas de efluxo (BEs) que podem conferir resistência natural a um ou vários compostos, foi descrita em micobactérias. O aumento da atividade dos sistemas de efluxo resulta na redução dos níveis intracelulares de antibióticos, o que pode contribuir para a seleção de bactérias resistentes (MACHADO *et al*, 2012). A análise sequencial do genoma mostra que o *M. tuberculosis* possui múltiplas bombas de efluxo e diversas delas já foram identificadas em várias espécies.

Pesquisas recentes utilizando inibidores de bomba de efluxo têm mostrado que a utilização dessas drogas em associação com fármacos antituberculosos clássicos, principalmente em *M. tuberculosis* multirresistentes, pode se tornar uma alternativa terapêutica promissora (RODRIGUES *et al*, 2012).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade inibitória do VP na expressão de genes que codificam para bombas de efluxo de fármacos em isolados clínicos de *M. tuberculosis* multirresistentes.

Materiais e métodos

Foram utilizados 2 isolados clínicos de *Mtb* resistentes e a *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) H37Rv, provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

A concentração inibitória mínima (CIM) de VP para *Mtb* H37Rv e para os isolados de *Mtb* resistentes foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* - REMA com modificações (PALOMINO *et al*, 2002). O tempo de exposição de *Mtb* aos fármacos para avaliar a expressão gênica foi determinado pela curva de tempo de morte utilizando a cepa H₃₇Rv conforme descrito por Steenwinkel *et al*, 2010 com modificações.

A extração do RNA de *Mtb* foi realizada com Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) e utilizando o kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) como descrito pelo fabricante. Os RNAs foram tratados com DNase I (Ambion, Austin, TX) e quantificado pelo Qubit® Fluorometric Quantitation. A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada por iniciadores randômicos de RNA total usando a enzima RT Superscript III (Invitrogen Life Technologies, CA, USA) de acordo



com as instruções do fabricante. Doze iniciadores para genes relacionados com bombas de efluxo foram sintetizados.

Para a quantificação relativa da expressão gênica em tempo real (PCRq) foi utilizado o Fast SYBR® green PCR master mix (Applied Biosystems by Life Technologies, Foster City, CA, USA). Como controle, foi realizada a curva de *melting* em todas as reações, e as amostras foram amplificadas em triplicata. O gene 16S RNAr foi utilizado como controle endógeno em todas as reações. As reações foram realizadas no instrumento Applied Biosystems StepOne™ com ciclos determinados de acordo com os iniciadores empregados. A expressão gênica relativa das bombas de efluxo foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK *et al*, 2001). A análise dos dados obtidos foi realizada pelo software BioEstat 5.0 usando o teste estatístico ANOVA one-way seguido pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

A CIM observada para o VP com os isolados clínicos de *Mtb* MDR e cepa *Mtb* H₃₇Rv foi de 125µg/mL. Baseado nos resultados do ensaio de curva de tempo de morte bacteriana, os tempos 16 e 72h foram escolhidos para o ensaio de expressão gênica.

No tempo de 16h de exposição ao VP foi observada uma diferença significativa ($p \leq 0.05$) na expressão relativa comparada ao controle em 8 genes que codificam para BEs em *Mtb* 71A (Rv1456, Rv3065, Rv1458, Rv1218, Rv1457, Rv1819, Rv1258 e Rv2459), 7 genes em *Mtb* 73A (Rv3065, Rv1218, Rv1819, Rv2846, Rv1258, Rv 1217 e Rv1410) e 8 genes em *Mtb* H₃₇Rv (Rv1456, Rv1458, Rv1218, Rv1457, Rv1819, Rv2846, Rv1258 e Rv1410). Já em 72h de exposição, foi detectada expressão relativa significativa em 11 genes em *Mtb* 71A (Rv1456, Rv3065, Rv1458, Rv1218, Rv1457, Rv1819, Rv2846, Rv1258, Rv1217, Rv2459 e Rv1410), 6 genes em *Mtb* 73A (Rv1456, Rv3065, Rv1458, Rv1457, Rv1217 e Rv1410) e 3 genes em *Mtb* H₃₇Rv (Rv3065, Rv1457 e Rv1410).

Uma baixa expressão relativa foi observada na maioria dos genes de BEs estudados em 16h de exposição ao VP comparado com 72h, tanto para a cepa de referência *Mtb* H₃₇Rv quanto para os isolados clínicos MDR. Não houve expressão relativa do gene Rv 2942 no isolado *Mtb* 71A; para este mesmo gene, foi detectada expressão gênica em 16h de exposição no isolado *Mtb* 73A ($p > 0.05$) e para a cepa *Mtb* H₃₇Rv foi observada expressão relativa em ambos os tempos (16 e 72h) com significância apenas em 16h ($p \leq 0,01$).

Algumas mudanças na expressão gênica de BEs podem ser observadas entre os isolados clínicos de *Mtb* 71A e 73A, apesar de ambos serem multiressistentes. No entanto, estas divergências podem estar relacionadas



ao fato de Mtb 71A apresentar CIMs muito mais elevadas para INH e RIF quando comparado ao isolado Mtb 73A.

Conclusões

A CIM do VP encontrada neste estudo foi a mesma entre os isolados clínicos multirresistentes e a cepa de referência. A atividade inibitória do VP foi observada na maioria dos genes que codificam para as BEs estudadas, incluindo aquelas não pertencentes à família ABC, para os isolados clínicos e cepa de referência, principalmente no tempo de 16h de exposição comparado ao 72h.

Novos estudos *in vivo* e *in vitro* ainda são necessários para melhor compreensão da atividade do VP e suas vantagens como fármaco adjunto na terapia contra TB, a fim de buscar novas opções terapêuticas mais seguras e eficazes, principalmente para os casos de multirresistência.

Agradecimentos

Agradecemos ao Programa de Iniciação Científica PIBIC/CNPq/FA.

Referências

- LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**. 2001.
- MACHADO, D; COUTO, I; PERDIGÃO, J; RODRIGUES, L; PORTUGAL, I; BAPTISTA, P. Contribution of efflux to the emergence of isoniazid and multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS One**. 2012.
- PALOMINO, J; MARTIN, A; CAMACHO, M; GUERRA, H; SWINGS, J; PORTAEULS, F. Resazurin microtitre assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob Agents Chemother** 2002.
- RODRIGUES, L; MACHADO, D; COUTO, I; AMARAL, L; VIVEIROS, M. Contribution of efflux activity to isoniazid resistance in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. **Infect Genet Evol**. 2012.
- STEENWINKEL, J. E; KANEGT, G. J; TEN KATE, M. T; VAN BELKUM, A; VERBRUGH, H. A; KREMER, K. et al. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob Chemother**. 2010.