



ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E REDUÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Mycobacterium tuberculosis* EXPOSTO À ISONIAZIDA

Carolina Trevisolli Palomo, Jean Eduardo Meneguello, Paula Aline Zannetti Campanerut-Sá, Luciana Dias Ghiraldi Lopes, Rosilene Fressatti Cardoso
e-mail: carolina_trevisolli@hotmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá,
PR

Área e subárea do conhecimento conforme tabela do [CNPq/CAPES](#):
Microbiologia/Bacteriologia

Palavras-chave: Tuberculose, microscopia eletrônica de varredura, curva de morte

Resumo:

A tuberculose, ao lado do HIV/AIDS, corresponde a doença infecciosa com maior taxa de mortalidade mundialmente, tornando-se uma preocupação global devido à emergência da multirresistência aos fármacos utilizados para tratamento. O objetivo deste estudo foi avaliar a redução da população de *Mycobacterium tuberculosis* e as alterações morfológicas provocadas pela ação da isoniazida. Foi realizado o ensaio da curva de morte nos tempos de 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas utilizando-se a cepa de referência *M. tuberculosis* H37Rv exposta a 1x Concentração Inibitória Mínima (CIM) e verificou-se o início da redução da população micobacteriana a partir de 24 horas de exposição. Em seguida, a cepa de referência foi exposta a $\frac{1}{2}$ da CIM de INH (0,03 ug/mL) para confecção das fotomicrografias de varredura, utilizando-se os tempos de 12 e 24 horas, baseado nos resultados da curva de morte. As principais mudanças observadas na morfologia foram alteração no formato e na divisão do bacilo, além da presença de células intumescidas com a superfície irregular e aspecto retorcido. Esses resultados servirão de referência para novos estudos utilizando esses tempos de exposição para avaliação do perfil de ação de compostos candidatos a novos fármacos anti-TB.





Introdução

Mundialmente, a Tuberculose (TB) ao lado do HIV/AIDS é considerada a doença infectocontagiosa crônica com as maiores taxas de mortalidade. O desenvolvimento e evolução da doença são dependentes de fatores como, aglomerados humanos, cepas multirresistentes, desnutrição, fatores socioeconômicos e ao imunocomprometimento, destacando-se os causados pelo HIV/AIDS.

O tratamento da TB é realizado pela combinação de quatro fármacos num esquema que dura no mínimo seis meses. Nos dois primeiros meses são utilizados isoniazida (INH), rifampicina (RIF), pirazinamida (PZA) e etambutol (ETB) e nos 4 meses seguintes INH e RIF, com 85% de taxa de sucesso na terapia combinada. Entretanto, a emergência de isolados multirresistentes aos fármacos de primeira linha (MDR-TB), agrava o prognóstico, aumenta o tempo de tratamento e leva a uma maior toxicidade e complexidade do tratamento da doença.

A INH é previamente ativada pela enzima bacteriana catalase-peroxidase (KatG) para exercer seus efeitos, e atua impedindo a biossíntese dos ácidos micólicos presentes na parede celular micobacteriana pela inibição da enzima Enoil-ACP redutase (InhA). O bacilo então, se torna susceptível às espécies reativas de oxigênio e outros fatores ambientais, que acarretam na morte celular.

Os estudos de cinética de morte bacteriana associados a outras abordagens, orientam a compreensão do perfil de ação de fármacos já utilizados na terapêutica da doença assim como compostos candidatos a fármacos anti-TB. Desta forma, objetivo deste estudo foi avaliar a redução da população de *Mycobacterium tuberculosis* e as alterações morfológicas provocadas pela ação da isoniazida.

Materiais e métodos

Condições de crescimento e exposição a INH

A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 foi cultivada em 80 mL de meio Middlebrook 7H9 acrescido de 10% de suplemento de ácido oleico, albumina, dextrose e catalase - OADC e 0,05% de tween 80, a 37° C por 15 dias. Após este período, as suspensões bacterianas foram agitadas com fagulhas de vidro estéreis e realizada a leitura da densidade óptica em comprimento de onda de 625 nm. A CIM de INH foi previamente determinada pela técnica de REMA (PALOMINO et al., 2002).





Curva de Morte

A ação da INH sobre a população bacilar foi avaliada pela adição de INH à cultura, previamente padronizada para obter 1x da CIM de INH (0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e incubadas nos tempos 24, 48, 72, 96, 120, 144 horas conforme descrito por De Steenwinkel et al., 2010) com modificações. Após cada período, as suspensões bacilares foram diluídas serialmente (10^{-1} , 10^{-3} , 10^{-5}) em PBS, semeadas em meio Middlebrook 7H11 suplementado com OADC (e incubadas a 35°C por 21 dias e então realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs).

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para realização de MEV, foi adicionado INH à cultura, previamente padronizada para obter $\frac{1}{2}$ da CIM de INH (0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As suspensões bacterianas foram incubadas sob agitação a 35°C por 12 e 24 horas. Um controle do crescimento bacteriano sem a adição do fármaco foi incubado sob as mesmas condições. Após o tempo de exposição à INH, 2 mL dos cultivos foram centrifugados com PBS (pH 7,4), a 10.000 rpm, por 2 minutos. O sedimento foi fixado em solução de glutaraldeído 2,5%, diluído em tampão cacodilato 0,1 M overnight a 4° C e então novamente lavadas por 3 vezes com tampão cacodilato 0,1 M, e centrifugadas a 10.000 rpm por 3 minutos. As células bacterianas homogeneizadas foram aderidas a uma lamínula com poli-L-lisina (Sigma) e desidratadas pela da imersão em solução de etanol em escala crescente de concentração (50%, 70%, 80%, 90% e 100%) durante 15 minutos cada solução. Em seguida, as lamínulas foram secas por meio de fluido supercrítico de dióxido de carbono. A metalização foi realizada em película de ouro, em três ciclos de 5 minutos a 6 mA, e as imagens registradas em Microscópio Shimadzu 55-550 (Kyoto, Japão), numa voltagem acelerada de 10 15 kV. O mesmo procedimento foi realizado para o cultivo não exposto a INH.

Resultados e Discussão

A INH é o principal fármaco utilizado na fase exponencial de crescimento de *M. tuberculosis* diminuindo o número de bacilos no escarro durante os primeiros 2 a 5 dias da doença embora a exposição contínua à possa apresentar decréscimo da população susceptível e emergência de uma população resistente (GUMBO et al., 2007). Na curva de morte após a



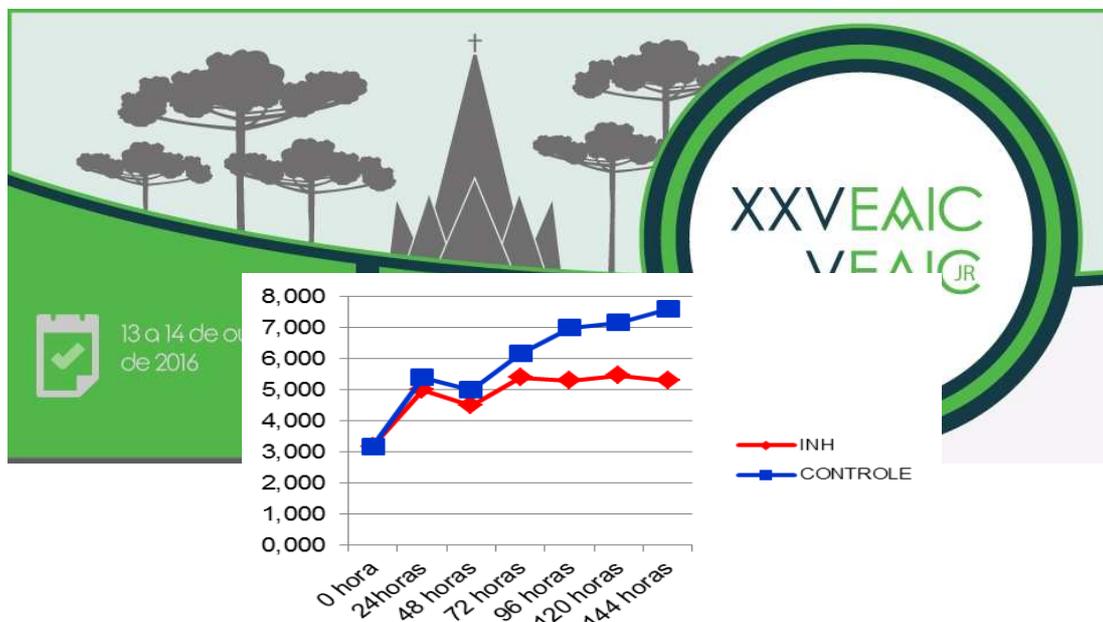


Figura 1: Curva de morte de *Mycobacterium tuberculosis* exposto à concentração inibitória mínima de INH (0,06)

exposição à INH verificou-se o início da redução da população micobacteriana em 24 horas de exposição (Figura 1).

Baseados nos resultados da curva de morte foram escolhidos os tempos de 12 e 24 horas de exposição à INH para as análises morfológicas. As principais mudanças observadas na morfologia de *M. tuberculosis* sob efeito da concentração subinibitória de INH (0,03 µg/mL), após os referidos tempos de exposição, foram alterações no formato e na divisão do bacilo, além da presença de células intumescidas com a superfície irregular e aspecto retorcido (Figura 2). Takayama; Wang; Merkal (1973) observaram as mesmas alterações morfológicas utilizando 1x CIM em 24 horas. Quando exposto a um fármaco, as camadas mais externas do bacilo são suscetíveis a alterações no equilíbrio osmótico, na síntese de DNA, no transporte iônico e no pH interno das células. Tais alterações estruturais, observadas na morfologia da parede celular bacteriana ou no seu padrão de crescimento, ocorrem concomitantemente às alterações quali e quantitativas no perfil proteico, observando-se alterações em proteínas relacionadas à formação da parede e ao metabolismo micobacteriano (SOCHOROVA et al., 2014).

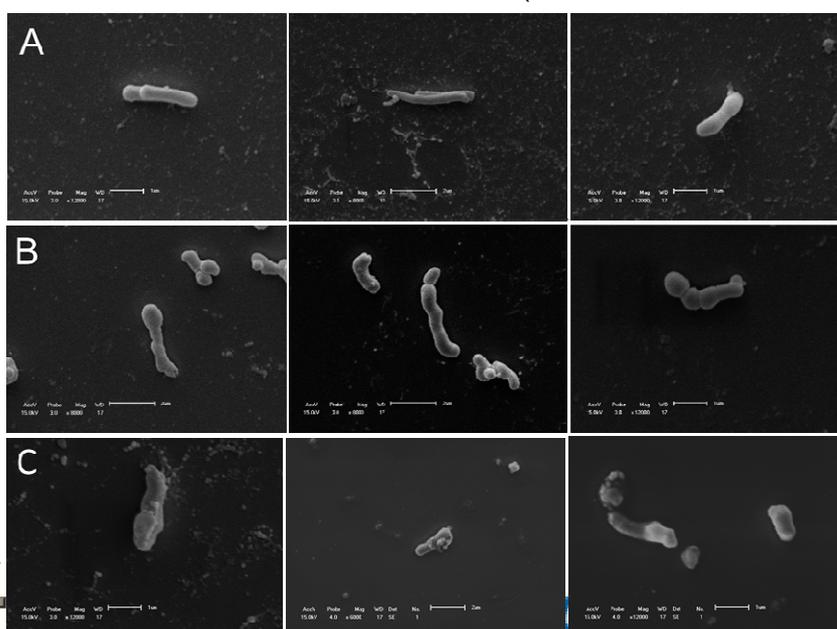




Figura 2. Microscopia eletrônica de varredura de *M. tuberculosis* H₃₇Rv **A)** Células bacterianas não expostas ao fármaco (Controle). **B)** Células expostas a concentração subinibitória 0,03µg/mL de INH por 12 horas. **C)** Células expostas a concentração subinibitória 0,03µg/mL de INH por 24 horas

Conclusões

Os resultados sugerem que a INH inicia sua ação sob a população de *M. tuberculosis* entre 12 e 24 horas, como foi observado pelas alterações morfológicas na parede celular do bacilo e redução da população na curva de morte. Baseado nisso, novos estudos serão realizados utilizando esses tempos de exposição para avaliação do perfil de ação de compostos candidatos a novos fármacos anti-TB.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e PPG/UEM.

Referências

- DE STEENWINKEL, J. E. M. et al. Time-kill kinetics of anti-tuberculosis drugs, and emergence of resistance, in relation to metabolic activity of *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2582–2589, 2010.
- GUMBO, T. et al. Isoniazid's bactericidal activity ceases because of the emergence of resistance, not depletion of *Mycobacterium tuberculosis* in the log phase of growth. **Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 2, p. 194–201, 2007.
- PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.
- SOCHOROVA, Z. et al. Morphological and proteomic analysis of early stage air-liquid interface biofilm formation in *Mycobacterium smegmatis*. **Microbiology-Sgm**, v. 160, p. 1346–1356, 2014.
- TAKAYAMA, K.; WANG, L.; MERKAL, R. S. SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY OF H37RA STRAIN OF MYCOBACTERIUM-TUBERCULOSIS EXPOSED TO ISONIAZID. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 4, n. 1, p. 62–65, 1973.

