

## CONTRIBUIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO NA RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* À ISONIAZIDA

Carolina Trevisolli Palomo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), João Vítor Perez de Souza<sup>1</sup>; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli<sup>1</sup>; Regiane Bertin de Lima Scodro<sup>1</sup>; Vera Lúcia Dias Siqueira<sup>1</sup>; Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

**Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada, Microbiologia Médica**

**Palavras-chave:** Tuberculose, bombas de efluxo, expressão gênica

### 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 no tratamento. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão gênica de bombas de efluxo de fármacos na resistência à isoniazida (INH) em *M. tuberculosis* multirresistente. A extração de RNA dos isolados bacterianos após exposição à INH foi realizada e a primeira fita de cDNA sintetizada. A expressão gênica das principais bombas de efluxo de *M. tuberculosis* foi determinada por PCR em tempo real e a fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$  utilizada para a análise dos resultados. Ao comparar com a amostra controle, nenhum gene, entre os 12 estudados, apresentou expressão significativamente aumentada após a exposição à INH. Dessa forma, estes resultados indicam que a resistência a INH está mais relacionada a mutações nos genes alvo do fármaco, do que pela atividade de bombas de efluxo.

### Introdução

A alta mortalidade e morbidade associadas à tuberculose (TB), doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, é um dos aspectos que caracteriza a doença como um importante problema de saúde pública em todo o mundo. O desenvolvimento e evolução da TB dependem de fatores como aglomerados humanos, a desnutrição e a baixa resistência imunológica do indivíduo, estando este último fator intimamente relacionado com casos de infecção provocada pelo HIV (WHO, 2016). A resistência aos medicamentos anti-TB ocorre principalmente por mutações espontâneas no genoma do *M. tuberculosis*. No caso da isoniazida (INH), a resistência está associada, principalmente, a mutações no gene *katG*, que codifica a enzima catalase-peroxidase, diminuindo sua atividade e impedindo a conversão do pró-

fármaco INH em seu metabólito ativo. Outro mecanismo de resistência que pode ser utilizado pelo bacilo é a atividade de bombas de efluxo de fármacos que são proteínas transportadoras envolvidas na eliminação de substâncias tóxicas da célula, permitindo que a bactéria sobreviva em ambientes hostis, inclusive durante a administração de fármacos no tratamento de infecções. Sistemas de efluxo podem diminuir a concentração intracelular de diversos fármacos, reduzindo a sua eficácia clínica e contribuindo para a seleção de isolados resistentes (Zhang, 2005). Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da atividade de bombas de efluxo na resistência à INH em *M. tuberculosis* multidroga resistente.

## **Materiais e métodos**

### **Microrganismos estudados**

Foram utilizados a cepa de referência H<sub>37</sub>Rv e isolado clínico de *M. tuberculosis* previamente identificado como resistente à INH pelo método das proporções, provenientes da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

### **Preparo do inóculo bacteriano**

Os isolados de *M. tuberculosis* foram semeados em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) enriquecido com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubados por 15 dias a 35°C. As suspensões bacterianas foram padronizadas com escala de McFarland nº 1 e diluída 1:20 em Middlebrook 7H9 suplementado com OADC.

### **Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A solução de INH foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração inibitória mínima (CIM) para os isolados de *M. tuberculosis* foi determinada pelo método *Resazurin Microtiter Plate Assay* (REMA) em microplacas de 96 orifícios como descrito por Palomino et al (Palomino *et al.*, 2002).

### **Avaliação da expressão de bombas de efluxo por PCR em tempo real**

Os isolados testados foram incubados em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) adicionado de OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) até atingirem a fase logarítmica de crescimento (turbidez da escala de McFarland nº1). A suspensão bacteriana foi ajustada para a concentração final de 10<sup>6</sup> células/mL (intervalo de 4-6 × 10<sup>6</sup>). Foi adicionado a esta suspensão bacteriana ½ CIM de INH. Foi também utilizada uma amostra controle, sem adição de fármacos.

### **Extração de RNA e síntese de cDNA**

A extração de RNA dos isolados bacterianos após exposição à INH foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen), como descrito pelo

fabricante. Os RNAs foram tratados com DNaseI (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 o Kit Pharmacia TimerSaver cDNA synthesis (Qiagen) de acordo com modificações realizadas por Bowler et al. (1999).

### Seleção dos genes e desenho dos primers

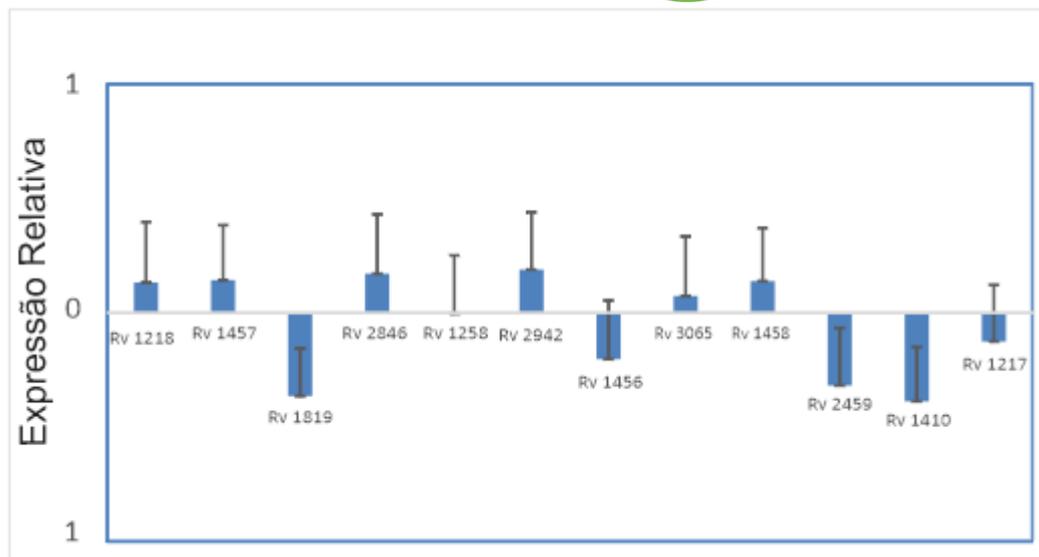
Os genes relacionados com bombas de efluxo foram selecionados do banco de dados do genoma do *M. tuberculosis* e as sequências dos iniciadores da PCR foram confeccionadas.

### PCR Real-time

A reação de amplificação foi realizada em Applied Biosystems StepOne™ utilizado o kit SYBER® Green (Invitrogen) com ciclos determinados de acordo com os iniciadores empregados. O gene 16S rRNA foi utilizado como controle endógeno para calcular os valores de  $\Delta\Delta C_T$ . A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada utilizando a fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Livak; Schmittgen, 2001).

### Resultados e Discussão

A CIM de INH para a cepa padrão H<sub>37</sub>Rv e o isolado clínico 14 BRF foi de 0,06 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente. Ao comparar com a amostra controle, nenhum gene, entre os 12 estudados, apresentou expressão significativamente aumentada após a exposição à INH (Figura 1). Estes resultados condizem com estudos similares encontrados na literatura, onde não houve aumento da expressão dos genes de bombas de efluxo de fármacos após exposição do bacilo à INH. Estes resultados de baixa expressão pode estar relacionado ao fato de que o isolado clínico estudado ter mutações no gene *katG*, mutação relacionada com altos níveis de resistência à INH. Outra possível justificativa se refere ao fato de que a INH é uma molécula pequena e por isso tem sua difusão facilitada através da membrana bacteriana, não precisando de transportadores ativos.



. \*Escala logarítmica

**Figura 1** – Gráfico da expressão de bombas de efluxo do isolado clínico 14 BRF após exposição à isoniazida por 48h.

### Conclusões

Nossos dados indicam que a resistência a INH está mais relacionada a mutações nos genes alvo do fármaco, do que pela atividade de bombas de efluxo. No entanto, novas bombas de efluxo deverão ser estudadas para melhor compreensão do papel das mesmas na resistência a INH principalmente em isolados de *M. tuberculosis* multidroga resistente e com mutação no gene *KatG*.

### Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a PPG/UEM e a Fundação Araucária (FA) pela oportunidade de desenvolver esse projeto.

### Referências

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- 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, ago. 2002.
- WHO. **Global tuberculosis report 2015**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://goo.gl/NsJ28E>>.
- ZHANG, Y. the Magic Bullets and Tuberculosis Drug Targets. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, n. 1, p. 529–564, 2005.