

CONTRIBUIÇÃO DE BOMBAS DE EFLUXO NA RESISTÊNCIA DE *Mycobacterium tuberculosis* À RIFAMPICINA.

Leonardo de Oliveira Figueiredo (PIBIC/CNPq)¹; João Vítor Perez de Souza¹; Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli¹; Regiane Bertin de Lima Scodro¹; Vera Lúcia Dias Siqueira¹; Rosilene Fressatti Cardoso¹ (Orientadora), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá – Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina - Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Microbiologia Aplicada, Microbiologia Médica

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, bombas de efluxo, rifampicina.

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A resistência aos medicamentos anti-TB é geralmente decorrente de mutações espontâneas no genoma do bacilo, no entanto, outros mecanismos, como as bombas de efluxo de fármacos (BEs), podem ser responsáveis pela resistência. Deste modo, o presente trabalho visou ampliar o conhecimento sobre os sistemas de efluxo de fármacos na resistência a rifampicina (RIF) pela determinação da expressão gênica de algumas bombas de efluxo em *Mtb* resistente. Foi estudado um isolado de *Mtb* monorresistente a RIF. O bacilo foi semeado em meio Middlebrook 7H9, posteriormente realizada a extração do RNA, síntese do cDNA e PCR *Real time* para analisar a atividade das BEs. A exposição à RIF mostrou maior impacto na expressão de BEs no tempo de 72h, evidenciado superexpressão de 4 dos 12 genes testados ($p < 0,05$). Dessa forma, os resultados confirmam que a atividade das BEs é um mecanismo importante de resistência a RIF e indicam um efeito negativo e limitado na utilização de monoterapia com RIF no tratamento da TB resistente.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada principalmente pelo bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). A alta mortalidade e morbidade associadas à TB é um dos aspectos que caracteriza a doença como um importante problema de saúde pública em todo o mundo (WHO, 2016). Se devidamente tratada, a TB é uma doença curável, no entanto, pacientes portadores de bacilos resistentes a isoniazida

(INH) e rifampicina (RIF), que constituem um grupo de doentes portadores de TB multidroga resistente (TB-MDR) tem seu tratamento muito dificultado.

A resistência aos medicamentos anti-TB é geralmente decorrente de mutações espontâneas no genoma do *Mtb*. Entretanto, outros mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo (BEs) de fármacos também tem papel importante (Zhang, 2005). Focando neste mecanismo alternativo de resistência, a inativação ou mesmo alterações na ação das BEs surge como grande expectativa como um mecanismo para controlar a resistência bacteriana a determinados fármacos.

Neste sentido, o presente estudo teve como objetivo ampliar o conhecimento sobre os sistemas de efluxo de fármacos na resistência à rifampicina pela determinação da expressão gênica das principais BEs em *Mtb* resistente.

Materiais e métodos

Micobactérias estudadas

Foi estudada a cepa de referência H₃₇Rv e um isolado clínico de *Mtb* monorresistente a RIF e com mutação no gene *rpoB* pertencente a micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

Preparo do inóculo bacteriano

O isolado clínico foi semeado em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, USA) enriquecido com OADC (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubado por 15 dias a 35°C. Após o tempo de crescimento, a cultura foi exposta a 1/2 concentração inibitória mínima (CIM) de RIF por 16 e 72h. Foi também utilizado uma cultura como controle, sem adição de qualquer fármaco.

Extração de RNA e síntese de cDNA

A extração de RNA dos isolados bacterianos, após exposição aos fármacos, 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.* (Bowler *et al.*, 1999).

Seleção dos genes e desenho dos primers

Os genes relacionados com BEs foram selecionados do banco de dados do genoma de *Mtbe* as sequências dos iniciadores foram confeccionadas.

PCR Real-time

A reação de amplificação foi realizada no equipamento Applied Biosystems StepOne™ com ciclos determinados de acordo com os iniciadores empregados. Foi utilizado o kit SYBER® Green (Invitrogen) para a quantificação relativa da expressão gênica. O gene 16S rRNA foi utilizado como controle endógeno das reações. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Resultados e Discussão

A CIM de RIF para H₃₇Rv e o isolado clínico CF98 foi de 0,004 e >128 ug/mL. Ao analisar os resultados da exposição à RIF, 6 genes se mostraram superexpressos ($p < 0,05$) em relação ao controle, sendo um (Rv3065) após 16h e cinco (Rv1218, Rv3065, Rv1258, Rv1458 e Rv1217) após 72h. Dos genes remanescentes, 8 se mostraram subexpressos ($p < 0,05$) quando comparados ao controle, sendo cinco (Rv1218, Rv1457, Rv1819, Rv2846 e Rv1456) após 16h, e três (Rv1819, Rv2846 e Rv2942) após 72h de exposição (Figura 1).

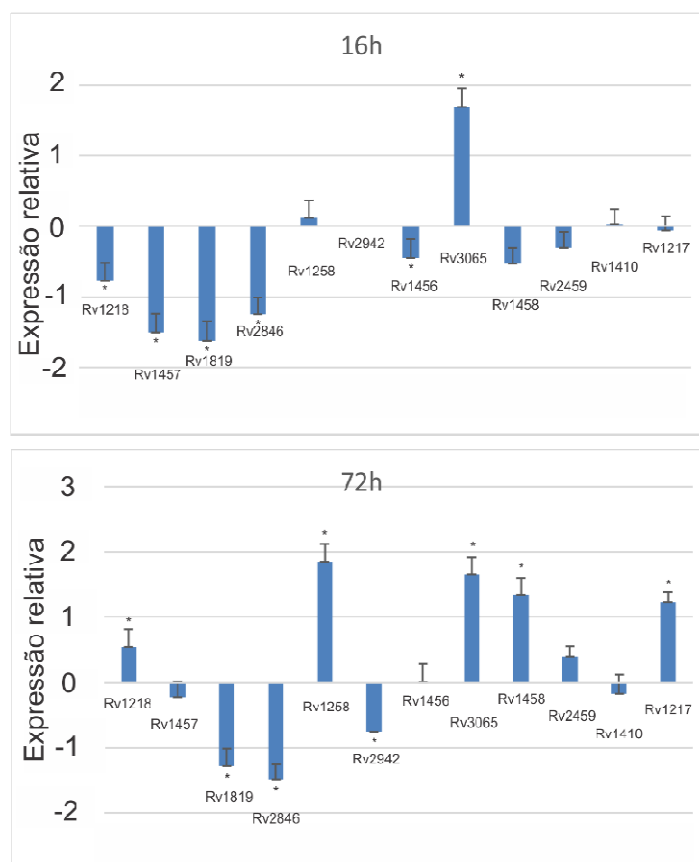


Figura 1. Gráficos da análise da expressão relativa de bombas de efluxo do isolado CF98 após exposição à rifampicina por 16 e 72h. * $p < 0,05$

Os resultados de expressão gênica indicam que nem todos os genes que codificam para BEs respondem iguais durante a exposição a RIF, no entanto, fica evidente a participação da BEs na resistência a RIF. Podemos atribuir parte desta resposta pelo isolado clínico testado, principalmente em 16h, ao fato que o bacilo testado possuía mutações no gene *rpoB*, responsável por contribuir pela alta CIM para RIF. É interessante observar que em 72h a RIF pode ter causado maior estresse no bacilo, o que favoreceu o aumento da expressão de BEs como mecanismo auxiliar de resistência na tentativa de se defender do fármaco nocivo.

Conclusões

Em nosso estudo, o isolado clínico monoresistente a RIF mostrou diferenças no perfil de expressão de acordo com as BEs estudadas e ao tempo de exposição. Os resultados confirmam que a atividade das BEs é um mecanismo importante de resistência a RIF principalmente após 72h de exposição, e indicam um possível efeito negativo e limitado na utilização de monoterapia com RIF, reforçando assim a necessidade de politerapia no tratamento da TB resistente.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da Fundação Araucária (FA), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Referências

- BOWLER, L. D.; HUBANK, M.; SPRATT, B. G. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. **Microbiology (Reading, England)**, v. 145 (Pt 1, p. 3529–3537, dez. 1999.
- DE OLIVEIRA DEMITTO, F. et al. In vitro activity of rifampicin and verapamil combination in multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2015.
- 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.