

ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO DE *Mycobacterium tuberculosis* APÓS EXPOSIÇÃO À RIFAMPICINA.

Fábio Henrique Bento da Costa (PIC/CNPq/FA/Uem), Jean Eduardo Meneguello, Luciana Dias Ghiraldi-Lopes, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador), e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

Microbiologia, Bacteriologia.

Palavras-chave: Tuberculose, proteômica, rifampicina.

Resumo:

A tuberculose (TB) é uma doença infecto-contagiosa conhecida há séculos que continua sendo um importante problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento. A doença apresenta uma forte correlação com a infecção pelo vírus HIV sendo bastante prevalente em pacientes portadores de HIV/AIDS. O tratamento recomendado para casos novos de TB consiste no uso por dois meses de isoniazida, rifampicina, etambutol e pirazinamida, seguido de quatro meses de isoniazida e rifampicina. A análise da resposta celular à exposição a fármacos utilizando análise proteômica pode ajudar na compreensão do mecanismo e dinâmica da atividade dos medicamentos anti-TB. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil proteico do *M. tuberculosis* após diferentes tempos de exposição à rifampicina. A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv foi cultivada em meio líquido por 15 dias e exposta a concentração inibitória mínima de rifampicina (0,04 µg/mL) por 12 horas e 24 h. Em seguida, as proteínas foram extraídas, purificadas e separadas por eletroforese bidimensional. Os géis foram então analisados pelo software ImageMaster 6.0 para comparação dos spots proteicos. Após 12 h de exposição, 21 spots foram ausentes. Em 24 horas, foram encontrados 36 spots ausentes e 5 presentes. Nossos resultados revelam que o perfil proteico do *M. tuberculosis* é alterado após a exposição à RIF por 12 h e 24h e que essas proteínas, após identificação, podem indicar alterações até então não propostas ou mesmo atuarem como alvos sinérgicos para um avanço no tratamento da TB.

Introdução

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa conhecida há séculos e seu desenvolvimento e evolução são dependentes de fatores como aglomerados humanos, desnutrição e baixa resistência imunológica, estando este último fator intimamente relacionado com casos de infecção provocada pelo HIV (WHO, 2014). O tratamento recomendado para casos novos de TB consiste no uso por dois meses de isoniazida (INH), rifampicina (RIF), etambutol (BEM) e pirazinamida (PZA), seguido de quatro meses de INH e RIF (WHO, 2014).

Físico ou funcionalmente as proteínas de uma célula relacionam-se com outras

proteínas ou biomoléculas numa estrutura denominada proteoma, adaptando-se dinamicamente a estímulos internos (genéticos) e externos que definem o estado celular e o fenótipo (AEBERSOLD; MANN, 2016).

As proteínas localizadas na membrana, parede celular, citoplasma ou secretadas para o os filtrados de cultura mediam processos celulares como ação de fármacos e desenvolvimento de resistência, dormência, virulência, interações com sistema imunológico e na relação patógeno-hospedeiros. Quando associada com ferramentas de bioinformática, a proteômica pode prever interações entre fármacos e proteínas diferencialmente expressas como alvos alternativos e complementares aos mecanismos de ação primários desses fármacos (SHARMA et al., 2015). Neste sentido, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil protéico do *M. tuberculosis* após diferentes tempos de exposição à rifampicina.

Materiais e métodos

A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 foi cultivada em 180 mL de Sauton Broth, a 35 °C, por 21 dias. Uma alíquota do crescimento foi agitada com fagulhas de vidro, e foi cuidadosamente transferido para outro tubo. Em seguida, a densidade óptica (DO) foi mensurada por espectrofotômetro a 625 nm. A partir da DO, uma solução de RIF (500 µg/mL) foi adicionada a suspensão bacteriana de modo que a concentração final fosse proporcional a concentração inibitória mínima (0,004 µg/mL). A cultura foi reincubada a 35 °C por 12 horas (h) e 24 h, juntamente com um controle de crescimento bacteriano sem a adição da droga (tempo 0).

Os tubos contendo as culturas bacterianas foram centrifugados a 4400 rpm por 5 minutos e posteriormente lavados uma vez com salina estéril (NaCl 0,85%) e outra com água destilada estéril. Após a lavagem, foram adicionados 1,25 mL de tampão de lise contendo agentes redutores (7 M uréia, 4% CHAPS, 0,5% IPG buffer, 40 mM DTT). A solução foi transferida para tubos tipo falcon e sonicados por 10 minutos. Os *debris* celulares foram removidos por centrifugação a 4800 rpm por 10 min.

As proteínas foram quantificadas segundo a técnica de Bradford (BRADFORD, 1976). Aproximadamente 450 µg de proteínas foram purificadas pelo 2D Clean-up kit (GE Healthcare Life Sciences), conforme instruções do fabricante. O *pellet* formado após a purificação foi ressuspenso com 250 µL de solução de reidratação. As tiras para focalização isoeletrica (Immobiline Drystrip pH 4-7, GE Healthcare) foram reidratadas com 250µL de proteínas em solução de reidratação e incubadas em temperatura ambiente por 12 horas, em aparato adequado para reidratação. As proteínas foram focalizadas utilizando o equipamento Ettan IPGphor 3 (GE Healthcare) a 20° C em quatro etapas: a) 500 Volts (V) por 1 hora; b) 1000 V por 1 hora; c) 8000 V por 2,5 horas e d) 8000 V por 1 hora. Após a focalização isoeletrica, as tiras foram equilibradas por 20 minutos em solução contendo Tris-HCl pH 8,8, 75 mM; uréia 6 M; glicerol 30 %, SDS 0,002 %, azul de bromofenol 0,002 %, com 100 mg de DTT e em seguida, por mais 20 minutos na mesma solução adicionado 250 mg de iodoacetamina. A segunda dimensão foi realizada em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12,5 % em sistema de 600 Ruby (GE Healthcare). As tiras foram posicionadas ao topo dos géis de poliacrilamida e

fixadas com agarose (Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1 %, agarose 0,5 % e azul de bromofenol 0,002 %). Foram utilizados 12 µL do padrão de proteínas Prestained Collor Plus Protein Ladder (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 300 V e 100 mA, para dois géis, por aproximadamente 4 horas e 45 minutos. Após a eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue G-250 segundo Neuhoff *et al.*, (1988).

Após a eletroforese 2D, os géis corados foram escaneados através do sistema Image Scanner II (Amersham Biosciences) e analisados através do software Image-Master 2D 6.0 para detecção e comparação dos “spots” protéicos.

Resultados e Discussão

As análises no ImageMaster demonstraram 21 spots ausentes após 12 horas de exposição. Em 24 horas, foram encontrados 36 spots ausentes e 5 presentes (Figura 1).

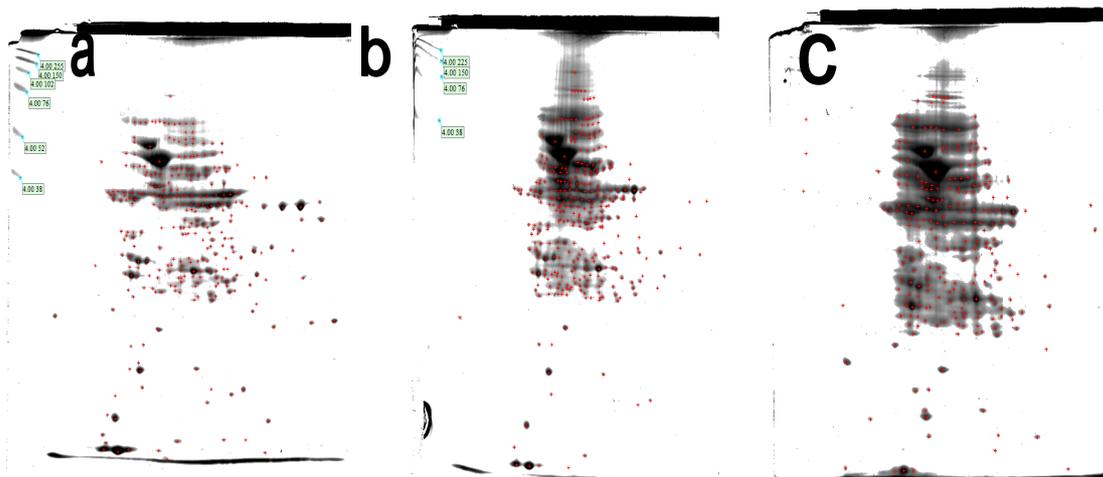


Figura 1 – Eletroforese bidimensional de proteínas extraídas de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. a) Controle. b e c) Exposições a concentração inibitória mínima de rifampicina (0,004 µg/mL) por 12 horas e 24 horas, respectivamente.

A análise proteômica é uma ferramenta que auxilia na compreensão dos mecanismos celulares desencadeados pelo stress da exposição do bacilo ao fármaco. A RIF é um fármaco que atinge um efeito bactericida após 72 horas de exposição, e embora a redução da população bacteriana seja de 99,9% (DE STEENWINKEL *et al.*, 2010), poucas alterações morfológicas são observadas no bacilo nesse período e nos que o antecedem (CALEFFI-FERRACIOLI *et al.*, 2016). Um estudo de transcriptoma de *M. tuberculosis* após a exposição a RIF revelou alterações na expressão de *clusters* de genes associados com efluxo, transporte e virulência, com uma participação provável de outras proteínas no desenvolvimento de resistência, de acordo com o tempo de exposição e concentração da RIF (DE KNEGT *et al.*, 2013).

Em outro estudo proteômico realizado com isoniazida, foram encontradas proteínas diferencialmente expressas não relacionadas ao seu mecanismo de ação primário (CAMPANERUT-SÁ *et al.*, 2016). Desta forma, a abordagem proteômica

da resposta celular desencadeada pela RIF pode direcionar um melhor entendimento no mecanismo de ação desse fármaco assim como novos alvos de fármacos que atuem em sinergismo com a RIF e que melhorem a eficácia do tratamento.

A espectrometria de massas detecta de maneira sensível e específica, diversas proteínas com alto grau de reprodutibilidade que permite a identificação de perturbações nos processos celulares que até então não foram alcançadas nas pesquisas com ácidos nucleicos (AEBERSOLD; MANN, 2016). Sendo assim, os spots diferencialmente expressos, após identificação das proteínas são úteis para a discussão das perturbações nos processos celulares desencadeados pela RIF.

Conclusões

A análise proteômica por eletroforese bidimensional revela que o perfil proteico do *M. tuberculosis* é alterado após a exposição à RIF por 12 h e 24 h e que essas proteínas podem indicar uma via de ação até então não proposta ou mesmo atuarem como alvos sinérgicos para um avanço no tratamento da TB.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Bacteriologia Médica-UEM pelo apoio técnico-científico

Referências

- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature**, v. 537, n. 7620, p. 347–355, 2016.
- CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. et al. Morphological changes and differentially expressed efflux pump genes in Mycobacterium tuberculosis exposed to a rifampicin and verapamil combination. **Tuberculosis**, v. 97, p. 65–72, 2016.
- CAMPANERUT-SÁ, P. A. et al. Proteomic and morphological changes produced by subinhibitory concentration of isoniazid in Mycobacterium tuberculosis. **Future microbiology**, v. 11, p. 1123–32, 2016.
- DE KNEGT, G. J. et al. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant Mycobacterium tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 93, n. 1, p. 96–101, 2013.
- 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.
- SHARMA, D. et al. Comparative Proteomic analysis of Aminoglycosides resistant and susceptible Mycobacterium tuberculosis clinical isolates for exploring potential drug targets. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139414, 2015.