

SELEÇÃO DE MUTANTES DE *Mycobacterium tuberculosis* RESISTENTES A RIFAMPICINA

Vivian Damares Figueiral (PIC/ Uem), Jean Eduardo Meneguello, Paula Aline Zanetti Campanerut-Sá, Luciana Dias Ghiraldi-Lopes, Rosilene Fressatti Cardoso (orientadora) e-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

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

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, resistência, rifampicina.

Resumo: A tuberculose (TB) atualmente é um importante problema de saúde pública no mundo. Em 2015 ocorreram 480 mil novos casos de multirresistência aos fármacos e 100 mil novos casos de resistência a rifampicina. Como o número de isolados clínicos resistente a RIF vem aumentando a cada ano, se faz necessário criar modelos *in vitro* para ampliar o conhecimento sobre esse tipo de resistência. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da metodologia de indução de resistência a rifampicina em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv por semeadura em ágar. Diferentes inóculos da cepa de referência de *M. tuberculosis* foram semeados em ágar 7H10 adicionado de 4 µg/mL de rifampicina. Em seguida, foi determinado a concentração inibitória mínima das colônias que cresceram após exposição a rifampicina. Apenas o inóculo sem padronização prévia apresentou colônias visíveis após 28 dias de incubação. A concentração inibitória mínima das 14 colônias que cresceram encontraram-se no intervalo de 0,002-0,008 µg/mL, mantendo, assim, o padrão de sensibilidade. A metodologia de indução de resistência a rifampicina por semeadura em ágar não mostrou-se eficiente para a obtenção de um mutante resistente a RIF a partir da cepa padrão *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv.

Introdução

A tuberculose (TB) atualmente é um importante problema de saúde pública no mundo. Em 2015 foram estimados 10.4 milhões de novos de casos e apesar do seu tratamento ser bem estabelecido, muitos casos de resistência vem sendo registrados. Em 2015 ocorreram 480 mil novos casos de multirresistência aos fármacos e 100 mil novos casos de resistência a rifampicina (RIF) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016).

A RIF é um fármaco que age ligando-se ao sítio ativo da RNA polimerase dependente de DNA (RNAP), bloqueando o processo de

elongação quando o transcrito alcança 2 ou 3 nucleotídeos de comprimento, desta forma inibindo a transcrição gênica (CAMPBELL et al., 2001). As mutações na região de 81 pares de bases do gene da subunidade β da RNAP representam o principal mecanismo atribuído à resistência a RIF, sendo denominada *Rifampicin Resistance Determining Region* (RRDR). Estima-se que 95% dos isolados resistentes a RIF abrigam mutações dirigidas ao alvo codificado pelo *rpoB* (TELENTI et al., 1993). As trocas de aminoácidos, e conseqüentemente a substituição por cadeias laterais mais volumosas, afetam a dobragem e empacotamento da estrutura tridimensional da RNAP, causando distorções no sítio de ligação RIF-RNAP (CAMPBELL et al., 2001). Tais mudanças implicam em alterações da energia de ligação e flexibilidade das cadeias laterais que prejudicam a interação RIF-RNAP (CAMPBELL et al., 2001) resultando em isolados menos suscetíveis ou resistentes à RIF. Como o número de isolados clínicos resistente a RIF vem aumentando a cada ano, se faz necessário desenvolver modelos *in vitro* para ampliar o conhecimento sobre esse tipo de resistência. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da metodologia de indução de resistência a RIF em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv por semeadura em ágar.

Materiais e métodos

A cepa de referência de *M. tuberculosis* H37Rv foi cultivada em Middlebrook 7H9 por 15 dias. Em seguida, foram preparados 500 μ L de três inóculos bacterianos: Uma alíquota obtida diretamente do cultivo bacteriano (sem padronização prévia), uma suspensão bacteriana padronizada segundo o padrão de turvação do tubo nº 1 da escala de McFarland e uma terceira alíquota obtida após padronização com escala de McFarland 1 seguida de diluição 1:20 do inóculo. Os inóculos foram então semeados em Middlebrook 7H10 contendo 4 μ g/mL de RIF de acordo com o ponto de corte para resistência estipulado pelo Center of Diseases Control and Prevention (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2012). Após 28 dias de incubação a 35 °C, foi realizado contagem de colônias, utilizando como controle um crescimento bacteriano semeado em meio sem adição de droga.

As colônias com crescimento visível nos meios adicionados de RIF foram semeadas novamente em meio 7H9, e seu crescimento foi visualmente monitorado até o 15º dia. Em seguida a concentração inibitória mínima (CIM) foi avaliada pela metodologia de REMA descrita por Palomino et al., 2002. Brevemente, os isolados cultivados em Middlebrook 7H9 foram padronizados até atingir a turvação igual à escala McFarland nº 1. O inóculo bacteriano foi diluído 20 vezes e 100 μ L da diluição foi inoculado em cada um dos orifícios contendo a solução de RIF diluída na razão 2 (0,032-0,00005 μ g/mL). As microplacas foram seladas e incubadas a 35 °C por sete dias. Após este período, 30 μ L de solução de resazurina (0,01%) foram adicionados em todos os orifícios e as placas foram reincubadas por 24 horas a 35°C.

A mudança da cor do azul para o rosa pela redução da resazurina foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da RIF capaz de visualmente impedir a viragem da cor de azul para rósea.

Resultados e Discussão

Ao fim dos 28 dias de incubação dos inóculos bacterianos em meio contendo RIF, foram recuperadas 14 colônias apenas na amostra sem padronização prévia. As placas semeadas com inóculos padronizados não apresentaram nenhum crescimento visível.

As CIMs das colônias provenientes do inóculo sem padronização encontram-se descritas na tabela 1, sendo que a CIM dessas colônias variou de 0,002 a 0,008 $\mu\text{g/mL}$.

Não houveram variações significativas na CIM, das colônias recuperadas após a exposição a RIF, ou seja, as CIM obtidas após exposição não ultrapassaram a concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$, que é a concentração utilizada para determinar resistência a RIF. Desta forma, o crescimento na placa foi devido à sobrecarga microbiana do inóculo e não desencadeada por mecanismos de resistência moleculares. Diferentemente do exposto por Bisson et al., 2012; e De Knecht et al., 2013, seguindo um design experimental semelhante.

Tabela 1– Concentração inibitória mínima de colônias isoladas após exposição de *Mycobacterium tuberculosis* a 4 $\mu\text{g/mL}$ de rifampicina

ID colônia	CIM da RIF $\mu\text{g/mL}$	ID colônia	CIM da RIF $\mu\text{g/mL}$	ID colônia	CIM da RIF $\mu\text{g/mL}$
A1	0,002	B1	0,002	B12	0,004
A2	0,002	B2	0,002	C1	0,008
A3	0,002	B4	0,002	C6	0,008
A4	0,002	B6	0,008	C7	0,002
A6	0,002	B11	0,004	H37Rv	0,004

CIM: Concentração inibitória mínima

A RIF possui ação esterilizante sobre o bacilo da TB, apresentando menor índice de mutantes resistentes, sobre uma população de bacilos sensíveis (Penna 2011). Naturalmente, a resistência a RIF apresenta-se com 1 mutante resistente a cada 10^7 - 10^8 bacilos (PENNA 2011), visto que a mutação no *rpoB* tem um custo adaptativo maior sobre a fisiologia bacilar (Comas et al. 2011). Dessa forma, a ausência de crescimento nos meios sólidos com inóculo padronizado pode ser esperada, uma vez que a

concentração de bacilos no inóculo encontra-se em torno de 3×10^8 para a escala de McFarland, e $1,5 \times 10^7$ para o inóculo diluído. Sendo assim, diminui-se a probabilidade de recuperação de mutantes resistentes.

Além das mutações esperadas no *rpoB*, a resistência a RIF pode estar relacionada a mutações compensatórias em outras regiões do genoma do *M. tuberculosis* (Comas et al. 2011). Aparentemente tais mutações contribuem para a adaptação do bacilo ao fenótipo de resistência, embora a maioria não esteja primariamente associada a funções ligadas a resistência (Bergval et al. 2015). Diferentemente de bactérias de crescimento rápido, tal qual *Escherichia coli*, a maquinaria transcricional do *M. tuberculosis* realiza os processos de alongação e transcrição dez vezes mais lento (HARSHEY; RAMAKRISHNAN, 1977) de forma que o aparecimento de resistência pode resultar de um processo lento de exposições sucessivas a oscilação nas concentrações de fármacos.

Conclusões

A metodologia de indução de resistência a RIF em *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv por semeadura em ágar não mostrou-se eficiente para a obtenção de mutante resistente a RIF.

Referências

- BISSON, G. P. et al. Upregulation of the phthiocerol dimycocerosate biosynthetic pathway by Rifampin-resistant, *rpoB* mutant *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 23, p. 6441–6452, 2012.
- CAMPBELL, E. A. E. A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial rna polymerase. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 901–12, 2001.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. MTB DST Report for November 2012 Samples Survey. n. November, p. 1–27, 2012.
- DE KNEGT, G. J. et al. Rifampicin-induced transcriptome response in rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**, v. 93, n. 1, p. 96–101, 2013.
- 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.
- TELENTI, A. et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. **The Lancet**, v. 341, n. 8846, p. 647–651, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Tuberculosis Report**, 2016.